

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Camila Marina Verdi

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Gaultheria procumbens: ESTUDOS *in vitro* E *in vivo***

Santa Maria, RS
2022

Camila Marina Verdi

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL *DE Gaultheria procumbens*: ESTUDOS *in vitro* E *in vivo*

Tese de Doutorado, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos

Santa Maria, RS

2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Verdi, Camila Marina
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Gaultheria procumbens: ESTUDOS in vitro E in vivo /
Camila Marina Verdi.- 2022.
81 p.; 30 cm

Orientador: Roberto Christ Vianna Santos
Coorientador: Sydney Hartz Alves
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2022

1. Plantas Medicinais 2. Atividade Biológica 3. Óleo
Essencial 4. Resistência Antimicrobiana 5. Toxicidade I.
Santos, Roberto Christ Vianna II. Alves, Sydney Hartz
III. Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da unsm. dados fornecidos pelo autor(a). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca central. biblioteca responsável: paula schoenfeldt. data: 08/10/2024.

Declaro, CAMILA MARINA VERDI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Camila Marina Verdi

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL *DE Gaultheria procumbens*: ESTUDOS *in vitro* E *in vivo*

Tese de Doutorado, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada dia 14 de setembro de 2022

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)
Presidente Orientador

Leonardo Garcia Velasquez, Dr. (UNIPAR)

Leonardo Quintana Lopes, Dr. (UFSM)

Liliane de Freitas Bauermann, Dra. (UFSM)

Rodrigo de Almeida Vauche, Dr. (UFPEl)

Santa Maria, RS
2022

A minha família, vocês são minhas raízes e minhas asas.

Obrigada por tanto.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelo dom da vida, pela saúde e por dar aos seres humanos sabedoria.

Aos meus pais Amarildo e Rozane, pela paciência, amor, companheirismo e apoio de sempre, incentivando os estudos e a não desistir dos sonhos. Obrigada por eu realizar um sonho que iniciou com vocês: o estudo. A vocês minha eterna gratidão.

Ao meu noivo Eduardo por todo apoio nessa trajetória, pela paciência, amor e companheirismo em todos os momentos. Por estar ao meu lado principalmente nos dias mais difíceis. Não tenho palavras para agradecer.

Ao professor Dr. Roberto Christ Vianna Santos, por todos ensinamentos, conselhos e por ter “aberto as portas” do laboratório. Obrigada pela ajuda na realização de um sonho, serei eternamente grata.

A minha família, meu irmão Cris, meus sogros, minhas cunhadas pela amizade e apoio. Vocês foram fundamentais nessa caminhada.

Aos meus sobrinhos, Ana Lívia, Lara e Murilo, obrigada pela alegria que transmitem, por renovar a energia e serem um incentivo. Que a pureza de crianças permaneça em vocês sempre.

Aos meus avós, Lurdes por estar ao meu lado, rezar sempre por mim e ser além de tudo minha amiga. Egídio e Olivia (*in memoriam*) não conseguiram presenciar essa conquista, mas sei torciam pela realização dos meus sonhos, com certeza hoje vocês estão olhando por mim e dando forças aí de cima, nunca esquecerei de vocês meus noninhos.

Aos amigos que o doutorado trouxe, Vanessa, Matheus e Fabi pela paciência e ajuda, por me guiarem e me ajudarem em todos os experimentos, não tenho palavras para agradecer. Você tem minha admiração.

Ao professor Paulo por ter acolhido a todos no LAPEMICRO, pelas conversas, cafés e risadas nas tardes do laboratório.

A todos os colegas e amigos do LAPEMICRO e os que conheci em Santa Maria, obrigada pela amizade, que ela sempre permaneça. Vocês foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho e amigos de vida, Mi, Diego, Nathi, Dai e Carla obrigada pela troca diária e por trazerem leveza aos meus dias.

A família APSEN Farmacêutica, pela oportunidade no mercado de trabalho, pelo acolhimento e por fazer me sentir em casa. Ao meu GD Rafael pelo apoio diário, ensinamentos, paciência e por sempre exaltar o meu conhecimento, obrigada chefe.

A todos que direta e indiretamente me ajudaram nesses anos, e que tornaram este trabalho possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM.

Meus sinceros agradecimentos!

A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

APRESENTAÇÃO

Esta tese está estruturada em Introdução, Objetivos, Revisão Bibliográfica, Artigo I e Manuscrito I, Discussão e Conclusão. A seção Introdução inclui um breve relato sobre a dificuldade enfrentada com a resistência aos antimicrobianos, a planta e as possibilidades de utilização dos compostos naturais. Na seção Revisão Bibliográfica os conceitos infecções, micro-organismos, tratamentos das infecções, resistência, estresse oxidativo e novas alternativas no tratamento com óleos essenciais foram descritos buscando aprofundar os nossos conhecimentos. O Artigo I conta com a avaliação antimicrobiana do óleo essencial de *Gaultheria procumbens*, assim como a análise fotoquímica do óleo e os testes de toxicidade frente a células mononucleares de sangue periférico. Este artigo foi publicado no periódico *Natural Product Research*. A formatação que consta nessa tese está de acordo com a formatação exigida pelo periódico. O Manuscrito I foi submetido e sob revisão no periódico *Aquaculture*. A seção de Discussão e Conclusão apresenta a interpretação de todos os nossos resultados obtidos. A seção Referências contempla as citações dos tópicos Introdução, Revisão Bibliográfica e Discussão. As referências referentes aos artigos constam ao final dos mesmos. Na seção Anexos encontram-se a aprovação do comitê de ética da Universidade Franciscana para uso de células mononucleares de sangue periférico e a aprovação do comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Santa Maria. Encontram-se também a autorização da Revista *Natural Product Research* para que possa ser anexado a esta tese o artigo publicado e o comprovante de submissão do manuscrito I a revista *Aquaculture*.

RESUMO

A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Gaultheria procumbens*: ESTUDOS *in vitro* E *in vivo*

AUTOR: Camila Marina Verdi
ORIENTADOR: Roberto Christ Vianna Santos

O estudo farmacológico de plantas medicinais tem se destacado pela identificação de novas moléculas. Os metabólitos secundários das plantas são compostos bioativos produzidas em resposta a um estresse, muitas vezes relacionados a ataques de herbívoros, insetos ou fitopatógenos. Com base nesses metabólitos são extraídas substâncias que apresentam benefícios aos seres humanos. Essas substâncias muitas vezes possuem atividade biológica. Dentro do contexto, surge como alternativa o estudo de *Gaultheria procumbens* também conhecida como *Wintergreen*. Esta planta apresenta-se em forma de arbusto, podendo atingir 2 metros de altura e encontra-se distribuída por todo hemisfério norte. No entanto, para a elucidação de diferentes aspectos, muitos testes devem ser realizados, incluindo: toxicidade, atividade antimicrobiana e atividade antioxidante. Para tanto, o presente estudo foi desenvolvido para investigar os constituintes químicos do óleo essencial de *G. procumbens*, sua eficácia cito e genotóxica, sua atividade biológica contra bactérias, micobactérias e leveduras, além de seu potencial antioxidante. A análise cromatográfica GC / MS-GC / FID demonstrou salicilato de metila (99,96%) e linalol (0,04%) como as substâncias majoritárias. A partir dos testes de toxicidade realizados em células mononucleares do sangue periférico (CMSP), foi possível observar entre as concentrações testadas (1,82 a 58,34 mg/mL) as concentrações seguras para o uso do óleo essencial de *G. procumbens*, como dano celular os ensaios PicoGreen e cometa apenas nas concentrações mais altas. Além de níveis seguros de uso, o óleo essencial de *G. procumbens* e o salicilato de metila foram usados para testes de microdiluição no caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), concentração microbicida mínima (CMM) e cinética de tempo de eliminação do microrganismo. Os resultados demonstraram eficácia contra vários microrganismos, principalmente *Aeromonas caviae* (ATCC15468), *Candida albicans* (ATCC14053) e *Mycobacterium. fortuitum* (ATCC 6841), com valores de CIM variando de 1,82 a 3,16 mg/mL e CMM variando de 3,64 a 14,58 mg/mL , confirmada através do teste de curva de morte microbiana. Transcorrendo os testes *in vitro*, infecções em peixes da espécie *Rhamdia quelen* foram realizadas com a inoculação de *A. caviae*, e posteriormente, os peixes foram tratados com óleo essencial de *G. procumbens*, a fim de obter dados sobre aumento da longevidade desses animais infectados e potencial atividade antioxidante do óleo essencial. A partir dos resultados obtidos, foi demonstrado aumento da perspectiva de vida dos peixes, além de ser relatada atividade antioxidante através da análise do baço desses animais. Em nossos resultados, o óleo essencial de *G. procumbens* demonstra atividade biológica relevante em níveis não tóxicos. A fim de encontrar uma alternativa terapêutica eficaz contra resistência microbiana, como perspectivas futuras serão desenvolvidos testes antibiofilme utilizando o óleo essencial como tratamento.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Óleo essencial. Antimicrobiano. Resistência. Toxicidade. Antioxidante.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Gaultheria procumbens*: *in vitro* AND *in vivo* STUDIES

AUTHOR: Camila Marina Verdi

ADVISOR: Roberto Christ Vianna Santos

The pharmacological study of medicinal plants has been highlighted by the identification of new substances. Plant secondary metabolites are substances produced in response to stress, often related to attacks by herbivores, insects or phytopathogens. Based on these metabolites are extracted substances that present benefits to humans. These substances often have biological activity. In context, the study of *Gaultheria procumbens* also known as *Wintergreen* appears as an alternative. This plant is shrub-shaped, can reach 2 meters in height and is distributed throughout the northern hemisphere. However, for the elucidation of different aspects, many tests must be performed, including: toxicity, antimicrobial activity and antioxidant activity. Therefore, this study was developed to investigate the chemical constituents of *G. procumbens* essential oil, its cytotoxic and genotoxic efficacy, its biological activity against bacteria, mycobacteria and yeast, as well as its antioxidant potential. GC/MS-GC/FID chromatographic analysis demonstrated methyl salicylate (99.96%) and linalool (0.04%) as the major substances. From the toxicity tests performed on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), it was possible to observe among the tested concentrations (1.82 to 58.34 mg/mL) the safe concentrations for the use of *G. procumbens* essential oil, as cellular damage was observed in the PicoGreen and comet assays only at the highest concentrations. In addition to safe levels of use, the essential oil of *G. procumbens* and methyl salicylate were used for microdilution tests in broth to determine the minimal inhibitory concentration (MIC), minimal microbicidal concentration (MMC) and time-kill kinetics. The results showed efficacy against several microorganisms, mainly *Aeromonas caviae* (ATCC15468), *Candida albicans* (ATCC14053) and *M. fortuitum* (ATCC 6841) with MIC values ranging from 1.82 to 3.16 mg/mL and MMC values ranging from 3.64 to 14.58 mg/mL, confirmed through the time-kill kinetics. Following *in vitro* tests, infections in fish of the species *Rhamdia quelen* were performed with the inoculation of *A. caviae*, and subsequently the fish were treated with *G. procumbens* essential oil to obtain data on increased longevity of these infected animals. and potential antioxidant activity of the essential oil. From the obtained results, it was demonstrated an increase of the fish life perspective, besides being reported antioxidant activity through the spleen analysis of these animals. In our results, *G. procumbens* essential oil demonstrates relevant biological activity at non-toxic levels. In order to find an effective therapeutic alternative against microbial resistance, as future perspectives will be developed antibiofilm tests using the essential oil as treatment.

Keywords: Medicinal plants. Essential oil. Antimicrobial. Resistance. Toxicity. Antioxidant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

Figura 1. Características da planta <i>Gaultheria procumbens</i> , demonstrada na forma de arbusto e seus frutos.....	23
--	----

ARTIGO 1:

Figure S1: Chemical composition of the <i>G. procumbens</i> essential oil identified by GC-MS.	37
Figure S2: Fluorimetric DNA quantification assay using DNA-PicoGreen® with <i>G. procumbens</i> essential oil at different concentrations.	37
Figure S3: Comet assay after 24 h of incubation.	39
Figure S4: Dichlorofluorescein diacetate assay (DCFH-DA) was performed to evaluate free radical production levels after 24 h of incubation.	38
Figure S5: MTT assay after 24 h of incubation.	39
Figure S6: Nitric oxide assay after 24 h of incubation.....	39
Figure S7: Time-kill curve of <i>A. caviae</i> (A), <i>C. albicans</i> (B), and <i>M. fortuitum</i> (C) exposed to several concentrations (based on the MIC) of <i>G. procumbens</i> essential oil.	41

MANUSCRITO 1:

Figure 1. Longevity in days of <i>R. quelen</i> infected with <i>A. caviae</i>	50
Figure 2. TBARS evaluation in <i>R. quelen</i>	50
Figure 3. Evaluation of ROS in <i>R. quelen</i>	51
Figure 4. Evaluation of glutathione peroxidase (GPx) enzyme activity in <i>R. quelen</i>	52
Figure 5. Evaluation of superoxide dismutase (SOD) enzymatic activity in <i>R. quelen</i>	54
Figure 6. Evaluation of glutathione S-transferase (GST) enzymatic activity in <i>R. quelen</i>	55

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1:

Table S1: Antimicrobial activity of *G. procumbens* essential oil and methyl salicylate (the major compound) assessed by MIC (mg mL⁻¹) and MMC (mg mL⁻¹) tests. 40

MANUSCRITO 1:

Table 1. Experimental design of animals treated with *G. procumbens* essential oil and untreated.....46

Table 2. Experimental design to analyze the oxidative stress biomarkers.....47

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	14
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1.	INFECÇÕES E SEUS AGENTES ETIOLÓGICOS	15
3.1.1.	Infecções bacterianas	15
3.1.1.1.	Infecções Micobacterianas	16
3.1.2.	Infecções fúngicas	17
3.2.	TRATAMENTO DAS INFECÇÕES.....	19
3.3.	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	19
3.3.1.	Impacto da resistência dos antimicrobianos e dos compostos químicos sobre o ambiente	20
3.4.	RESGATE DAS SUBSTÂNCIAS NATURAIS	21
3.4.1.	Óleos Essenciais	21
3.4.1.1.	Óleo essencial de <i>G. procumbens</i>	22
3.5.	ESTRESSE OXIDATIVO E ENZIMAS ANTIOXIDANTES	23
4.	RESULTADOS	25
4.1.	ARTIGO 1: PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION, GENOTOXICITY, CYTOTOXICITY, AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF <i>Gautheria procumbens</i> ESSENTIAL OIL	25
4.2.	MANUSCRITO 1: <i>GAULTHERIA PROCUMBENS</i> ESSENTIAL OIL EFFECTS ON LONGEVITY AND OXIDANT/ANTIOXIDANT STATUS OF SILVER CATFISH <i>Rhamdia quelen</i> EXPERIMENTALLY INFECTED BY <i>Aeromonas caviae</i>	44
5.	DISCUSSÃO	61
5.1.	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO CEP- UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGUE PERIFÉRICO	75
	ANEXO B – AUTORIZAÇÃO NATURAL PRODUCT RESEARCH PARA ANEXO DE ARTIGO PUBLICADO	76
	ANEXO C – CERTIFICADO CEUA – UTILIZAÇÃO DE <i>Rhamdia quelen</i>	77

1. INTRODUÇÃO

A partir de 1930, por cerca de cinco décadas, diferentes classes de antimicrobianos foram estudadas e introduzidas no mercado, incluindo a penicilina em 1940. Entretanto, ainda no final da década de 30 foram relatados os primeiros casos de resistência (DAVIES; DAVIES, 2010; LEWIS, 2017; MIMICA; MENDES, 2007). O aumento da resistência microbiana, impulsionada pelo uso extensivo de fármacos anti-infecciosos, representa uma ameaça à saúde pública, uma vez que, associada à escassez de desenvolvimento de novos fármacos, limita as opções terapêuticas (MARTINS et al., 2013).

Estima-se que o aumento contínuo da resistência microbiana poderá induzir cerca de 10 milhões de mortes em 2050, tornando-se mais letal do que câncer (O'NEILL, 2014). As consequências de uma infecção causada por micro-organismos resistentes resultam em um complexo tratamento, aumentando a morbidade, mortalidade e os custos, o que na maioria das vezes torna a terapia inacessível (WHO, 2005).

Além disso, o descarte inadequado dos fármacos antimicrobianos no meio ambiente corrobora com o aumento da resistência, principalmente em ambiente aquático. Ademais, devido os antimicrobianos serem estáveis e não biodegradáveis os mesmos podem ter efeito residual nos animais presentes, como por exemplo em peixes, deixando a carne contaminada para o consumo, afetando a economia e reprodução desses animais, e contribuindo com a incidência de infecções resistentes no ambiente aquático (ZHANG et al., 2009; CABELLO, 2006).

Estima-se que 90% das bactérias encontradas na água do mar são resistentes a um antimicrobiano e 20% delas a pelo menos cinco (FINGERMAN, 2003). Analisando a resistência em ambiente aquático, Done e Halden (2015) dosaram níveis de tetraciclina, macrolídeos e sulfonamidas em carnes de tilápia e salmão e observaram presença desses fármacos nos animais, o que leva a crer em um favorecimento no mecanismo de seleção. Wang et. al., 2017, corroborou realizando análises em carne de animais aquáticos e detectando em 52,1% das amostras a presença de enrofloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, azitromicina e sulfametazina e trimetoprima.

Em busca de alternativas terapêuticas que apresentem atividade antimicrobiana, que consigam minimizar a dificuldade nos tratamentos e que não sejam agressivas ao meio ambiente, produtos naturais têm se tornado, de maneira cada vez mais frequente, objetos de estudo. O uso de óleos essenciais tem sido eficaz no controle de infecções bacterianas em peixes, como o uso do óleo de *Melaleuca alternifolia* em *Rhamdia quelen* infectados por

Aeromonas hydrophyla (SOUZA et. al., 2016) e *Ocimum gratissimum* e *Ocimum americanum* frente bactérias que infectam peixes como *A. hydrophyla* (SUTILI et.al., 2015).

O gênero *Gaultheria* pertence à família *Ericaceae* e encontra-se amplamente distribuída em todo hemisfério norte (LIU et al., 2013; NIKOLIĆ et al., 2013). Este gênero conta com aproximadamente 200 espécies, sendo uma delas *G. procumbens* (BANTAWA et al., 2011; LIU et al., 2013; MICHEL et al., 2014; NIKOLIĆ et al., 2013). *G. procumbens* também conhecida como *Wintergreen* apresenta-se em forma de arbusto, podendo atingir 2 metros de altura. Apresenta como componente majoritário o salicilato de metila (MIRICK; QUINN, 1981; NIKOLIĆ et al., 2013). O óleo essencial extraído das folhas é empregado como edulcorante em gomas de mascar, doces, pastas de dente e enxaguantes bucais. Há relatos de significativa ação anti-inflamatória e de utilização popular no tratamento de celulite bacteriana (LIU et al., 2013; MIDDLENTON, 1991; NIKOLIĆ et al., 2013).

Tendo em vista a atividade biológica dos óleos essenciais, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano (*in vivo* e *in vitro*) de *G. procumbens*, identificando a respectiva composição fitoquímica, verificando a toxicidade de diferentes concentrações do óleo frente a células mononucleares humanas. Este estudo também objetivou tratar peixes da espécie *Rhamdia quelen* infectados por *A. caviae*, avaliar longevidade e atividade antioxidante *in vivo* do óleo essencial, a fim de encontrar tratamento que impacte positivamente na economia sem denegrir o meio ambiente.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a citotoxicidade e genotoxicidade do óleo essencial de *G. procumbens*, bem como atividade antimicrobiana *in vitro*, assim como avaliar a longevidade e marcadores do estresse oxidativo *in vivo* em *Rhamdia quelen* infectados por *Aeromonas caviae*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização fotoquímica do óleo essencial de *G. procumbens*;
- Avaliar citotoxicidade e genotoxicidade do óleo essencial;
- Determinar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *G. procumbens* frente a bactérias, micobactérias e leveduras, sendo: *Escherichia coli*, *Aeromonas caviae*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium abscessus* ;
 - Verificar a longevidade e mortalidade de *Rhamdia quelen* infectados por *Aeromonas caviae* e tratados com o óleo de *G. procumbens*;
 - Avaliar a capacidade antioxidante (*in vivo*) do óleo essencial de *G. procumbens* em *R. quelen*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. INFECÇÕES E SEUS AGENTES ETIOLÓGICOS

No início do século XX as principais causas de mortes foram as doenças infecciosas (COHEN, 2000). As principais infecções fatais da época eram varíola, cólera, difteria, febre tifoide, peste bubônica, tuberculose, sarampo, caxumba, coqueluche, poliomielite e sífilis, devido escassa terapia farmacológica e dificuldade diagnóstico (YOSHIKAWA, 2002).

As infecções podem ser causadas por diferentes micro-organismos, que ao infectar o hospedeiro superam suas defesas (LEVINSON, 2016). Em razão da ativação do sistema imune, o processo infeccioso vem acompanhado de resposta inflamatória, envolvendo células de defesa, citocinas e consequentemente aumentando a oxidação celular através do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (AGITA; THAHA, 2017). Ao ser infectado, o indivíduo manifestará um grande número de sinais e sintomas, os quais ocorrem em razão ao desequilíbrio do organismo e consequentemente devido a resposta imunológica (LEVINSON, 2016).

Essas manifestações clínicas dependerão da patogenicidade do agente etiológico, que é definida através da virulência que o mesmo pode apresentar (LEVINSON, 2016). Além da virulência do patógeno, deve ser levado em consideração, o estado clínico do paciente, onde por exemplo, pacientes imunocomprometidos são mais suscetíveis a infecções, causadas muitas vezes por micro-organismos oportunistas (HINRICHSEN, 2004; SALOMÃO, 2017).

3.1.1. Infecções bacterianas

Entre os anos de 1665 e 1678 Anton Van Leeuwenhoek, a partir do aperfeiçoamento de lentes microscópicas observou os primeiros micro-organismos (GEST, 2004). Van Leeuwenhoek chamou esses seres de “animalículos”, descreveu a motilidade e os ilustrou com desenhos precisos de três padrões morfológicos: bacilos, cocos e formas espiraladas, que ainda hoje são utilizados na descrição de bactérias (NISSENGARD et al., 1997).

As infecções causadas por bactérias podem acometer diferentes sítios anatômicos. *E. coli*, por exemplo, anaeróbia facultativa é a principal causadora de infecções da família das Enterobacteriaceae. Esta bactéria está presente na microbiota normal intestinal de indivíduos, no entanto, em pacientes imunocomprometidos essa espécie comensal pode tornar-se patogênica, causando gastroenterites, infecções urinárias (cerca de 65% dos casos) e até

meningite neonatal (FRANCO, 2002; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RADHOUANI et al., 2014; WAWRYSIUK et al., 2019).

Já as espécies de *P. aeruginosa* e *Aeromonas* spp. são encontradas preferencialmente em ambientes aquáticos (CHAIX et al., 2017; PEREIRA, 2014; PEIXOTO et al., 2012). Imunocomprometidos, queimados e neutropênicos estão mais expostos ao risco de contrair infecções por *P. aeruginosa*, potencial produtora de biofilme, que pode ocasionar bacteremias, pneumonias, úlceras por pressão, infecções pós-operatórias, entre outras (PEREIRA, S.M.S.G.,2014). Pertencendo também às Gram-negativas, o gênero *Aeromonas* é capaz de causar infecções intestinais e até mesmo sepse, além de impactar negativamente à piscicultura, acometendo animais aquáticos, como peixes, e influenciando na economia (CHAIX et al., 2017; GONÇALVES et al., 2019; PEIXOTO et al., 2012).

Outrossim, bactérias comensais dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* pertencem a classe das Gram-positivas, as quais estão presentes na microbiota da pele e mucosa oral respectivamente (FEITOR, 2010). *Staphylococcus* spp. é capaz de causar infecção geralmente quando ocorre lesão na pele, por outro lado *Streptococcus* spp. é formador de biofilme e um grande cariogênico (especialmente *S. mutans*), quando disseminado pela corrente sanguínea é potencial causador de endocardites (FEITOR, 2010; KRETH et al., 2009; MOHAPATRA et al., 2017; PASCHOAL, 2013; SCHUENCK, 2009).

3.1.1.1. Infecções Micobacterianas

Micobactérias, denominadas bacilos álcool-ácidos resistentes, são assim chamadas devido ao alto teor lipídico de sua parede celular dificultando a descoloração da carbolfucsina. Esses micro-organismos podem apresentar crescimento lento ou rápido, sendo conhecidas por causar doenças altamente contagiosas como tuberculose e hanseníase, e apresentam resistência frente aos tratamentos (LEVINSON, 2016; NESSAR et al., 2012).

Considerada uma micobactéria de crescimento lento, *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose (TB), se replica, evolui e persiste em hospedeiros humanos, adaptando-se com sucesso aos desafios impostos pelo sistema imunológico. Este micro-organismo contém uma camada adicional, além da de peptidoglicano, que é excepcionalmente rica em lipídios, glicolipídeos e polissacarídeos (BRITES; GAGNEUX, 2015; COLE et al., 1998; ZHONG et al., 2019).

Com o mesmo padrão de crescimento, *M. leprae* causa hanseníase, uma doença infecciosa crônica e debilitante que envolve a pele e os nervos periféricos. As manifestações

clínicas da doença apresentam-se como um espectro no qual a imunidade celular protetora se correlaciona inversamente com a carga bacilar, como consequência, a terapia antimicrobiana deve ser mantida por longo período, geralmente vários anos (MURRAY et al., 2007). *M. leprae* não é cultivável em laboratório, entretanto pode se multiplicar em animais experimentais (LEVINSON, 2016).

Por outro lado, *M. fortuitum* e *M. abscessus* apresentam crescimento rápido, sendo o primeiro adquirido no ambiente natural, particularmente através do solo, poeira e produzir biofilmes na água da torneira. É capaz de causar infecções na pele, olhos, ossos e articulações (DI; CHEN, 2019; STOODLEY; SCOTT, 1998). *M. abscessus* é responsável por diversas infecções de tecidos moles e infecções disseminadas em pacientes imunocomprometidos (NESSAR et al., 2012).

3.1.2. Infecções fúngicas

Apesar do impacto positivo e inovador na era antimicrobiana, os fungos são grandes causadores de infecções e têm sido crescente os problemas associados para a saúde pública (JESUS, 2013; TSANG et al., 2018). Não diferentes das bactérias, os fungos e seus metabólitos são capazes de causar micoses, intoxicações, hipersensibilidades e micotoxicoses (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Os agentes patogênicos fúngicos geralmente se aproveitam da imunidade alterada do hospedeiro para causar doenças, o que geralmente determinará a gravidade da infecção. Tais infecções, oportunistas ou não, se disseminam, na maior parte das vezes para diversos sítios do organismo pela via hematogênica (SEGAL; BAUM, 1994). Dentro de uma vasta quantidade de gêneros e espécies fúngicas, filamentosas, leveduriformes ou dimórficas, destacam-se os principais gêneros causadores de infecções: *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus* (DOS SANTOS, 2008; HAZEN, 1995; PASQUALOTTO, 2010).

O gênero *Aspergillus* é responsável por causar diversas manifestações clínicas infecciosas no homem, todas elas conhecidas como aspergiloses (PASQUALOTTO, 2010). As principais espécies causadoras de aspergiloses são o *A. fumigatus* seguido de *A. flavus* e *A. niger*. Estas espécies podem ser encontradas no solo principalmente em climas quentes (HEDAYATI et al, 2007; MARR et al, 2002; STEINBACH et al, 2004).

A principal forma de contaminação por essas espécies de *Aspergillus* se dá através da inalação dos conídios, assim sendo, infecções pulmonares são as mais recorrentes (GUARRO et al, 2010; PARK; MEHRAD, 2009). Outra preocupação relacionada com esse gênero é a

produção de aflatoxinas, caracterizadas como metabólitos secundários potencialmente carcinogênicos (HEDAYATI et al, 2007; LI et al., 2019).

Outro gênero fúngico que se destaca como micro-organismo oportunista e grande produtor de biofilme, são as leveduras do gênero *Candida*, capazes de causar diferentes formas de candidíase. Esses fungos habitam a microbiota da pele, trato gastrointestinal e trato urinário (DOVNIK et al., 2015). O principal agente causador da candidíase é a espécie *C. albicans*, qual é responsável pela infecção fúngica invasiva mais comum e uma das mais frequentes infecção hospitalar. Entretanto outras espécies podem causar candidíase em humanos, como *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *C. guilliermondii* (WALL et al., 2019).

As infecções causadas pelas espécies do gênero *Candida* são denominadas superficiais ou invasivas. As infecções superficiais dos tecidos mais comuns incluem estomatite crônica atrófica, candidíase mucocutânea crônica e vulvovaginite. Em relação a candidíase invasiva as formas da doença são: candidíase aguda ou crônica disseminada por via hematogênica, e infecção a múltiplos órgãos profundos, seja por via hematogênica ou contato direto, por exemplo através de cirurgias (ABI-SAID et al., 1997). Os fatores de risco relacionados com essa doença incluem infecção por HIV, processos cirúrgicos, quimioterapia terapia antineoplásica, neutropenia e terapia antimicrobiana (ABI-SAID et al., 1997; KOJIC; DAROUICHE, 2004; MAVOR et al., 2005).

Outra forma de infecção leveduriforme é a causada por *Cryptococcus* spp. Conhecida como Criptococose, esta doença é responsável por acometer, na maior parte das vezes, pacientes imunodeprimidos, principalmente pacientes infectados pelo HIV (LI et al., 2019). Atualmente o gênero *Cryptococcus* apresenta duas espécies patogênicas: *C. neoformans* e *C. gattii*, que são encontradas principalmente na natureza, presentes no solo, em ninhos de aves, cascas e frutos de árvores (CORRÊA et al., 2019; HEITMAN, et al., 2010; LIN; HEITMAN, 2006).

As espécies de *Cryptococcus* spp. apresentam alguns fatores de virulência, dentre eles destacam-se: a produção de uma cápsula de polissacarídeo, formação do pigmento melanina na parede celular, crescimento a 37°C e secreção de enzimas como a fosfolipase B e urease. A infecção por *Cryptococcus* spp. ocorre através da inalação da forma infectante, afetando primeiramente a via pulmonar e, por via hematogênica pode atingir o cérebro e, conseqüentemente ocasionar meningite, apresentando sintomas que incluem dor de cabeça, febre, problemas visuais e estado mental alterado (KRONSTAD et al., 2011; LI et al., 2019).

3.2. TRATAMENTO DAS INFECÇÕES

O tratamento das infecções é realizado, preferencialmente, através de fármacos que são prescritos a partir de diagnóstico clínico e laboratorial. Estes fármacos podem ser de diferentes classes, como por exemplo antibacterianos e antifúngicos, que apresentam diversos grupos com distintos mecanismos de ação (GOODMAN et al., 1996). Os agentes antimicrobianos são essenciais para a medicina e a saúde pública, abrangendo o tratamento de infecções e auxiliando também na profilaxia como suporte em cirurgias, neoplasias e transplantes (KHAMENEH et al., 2019)

Além de tratar as infecções causadas em humanos, com a mesma finalidade os antimicrobianos são utilizados em animais, como tratamento ou, em alguns países como promotores de crescimento (WALSH; WU, 2016). Outrossim, os antimicrobianos podem ser utilizados em animais como profiláticos na prevenção de infecções, inclusive em peixes (RADHOUANI et al., 2014). Entretanto, o tratamento deve ser realizado de forma cautelosa, pois o uso inadequado de fármacos anti-infecciosos, representa uma ameaça à saúde pública, uma vez que, associada à escassez de desenvolvimento de novos fármacos, limita as opções terapêuticas futuras (MARTINS et al., 2013).

3.3. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência aos antimicrobianos foi originalmente relatada no final da década de 1930, e os mesmos mecanismos operam cerca de 90 anos depois (DAVIES; DAVIES, 2010). A resistência microbiana tem um impacto negativo na morbidade, mortalidade e economia. Neste contexto, estima-se que se continuar com o panorama atual, 10 milhões de mortes em todo o mundo estão previstas para 2050 (LUEPKE et al., 2017).

Embora todos os tipos de micro-organismos desenvolvam resistência, as bactérias são atualmente o maior motivo de preocupação (WOOLHOUSE; FARRAR, 2014). A resistência é decorrente de diversos fatores, que levam à transferência horizontal de material genético de outras espécies ou a mutação nos micro-organismos (ADAMS, 2004). Alguns mecanismos relacionados com a resistência incluem a ativação (super-expressão) de bomba de efluxo, produção de enzimas de destruição e modificação de sítios de ligação de agentes antimicrobianos, dentre outros (KHAMENEH et al., 2019). Estes fatores colaboram de forma significativa com a resistência às diferentes classes de antibacterianos, sendo relatadas resistência aos beta-lactâmicos, carbapenêmicos e polimixinas (RADHOUANI et al., 2014).

Em relação aos fungos, grande parte dos mecanismos estão relacionados com a inibição da síntese do ergosterol, o que inclui a modificação do gene da biossíntese do ergosterol (ERG11), expressão de bombas de efluxo de drogas específicas, alteração na biossíntese de esteróis e redução na concentração intracelular de enzimas alvo (BALKIS et al., 2002; GHANNOUM; RICE, 1999).

No entanto, os mecanismos acima descritos não são a única razão para o insucesso do tratamento antimicrobiano. Outra forma impactante de resistência microbiana é a capacidade de formação de biofilme, um dos mecanismos de resistência usados para sobrevivência dos micro-organismos, que pode acarretar em até 1.000 vezes a resistência frente aos fármacos escolhidos na terapêutica (CEPAS et al., 2019).

3.3.1. Impacto da resistência dos antimicrobianos e dos compostos químicos sobre o ambiente

A excreção dos anti-infecciosos ocorre na maioria das vezes por meio das fezes e urina, o que resulta em posterior descarte e contato com o meio ambiente, água, solo, e conseqüentemente com os animais que ali habitam (PAREEK et al., 2015) Devido aos antibióticos serem estáveis e não biodegradáveis os mesmos quando descartados no meio ambiente podem deixar resíduo na carne posteriormente utilizada para o consumo (CABELLO., 2006). Da mesma forma, o descarte incorreto no meio ambiente feito pelas indústrias farmacêuticas, mesmo em baixas doses, a longo prazo podem ocasionar reações adversas como destruição endócrina, toxicidade crônica e resistência antimicrobiana (DAGHRIR; DROGUI, 2013; FICK et al., 2009; KINRYS et al., 2018).

Muitos compostos utilizados para tratamentos de patologias são metabolizados pelos pacientes e despejados no esgoto hospitalar ou diretamente nas águas residuais municipais, se usados em casa. Esses metabolitos podem passar pelo sistema de esgoto e acabar no meio ambiente, principalmente no compartimento hídrico (KUMMERER, K. 2004). Ademais, muitos agentes antimicrobianos são utilizados na piscicultura intensiva, onde são diretamente adicionados à água, já foram relatados na literatura macrolídeos, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas, entre outros. No entanto, estima-se que 90% das bactérias encontradas na água do mar são resistentes a um antibiótico e 20% delas a pelo menos cinco (FINGERMAN, M., 2003).

Muitos estudos mostraram que bactérias resistentes a antibióticos podem ser isoladas de uma variedade de animais incluindo mamíferos como javalis e roedores, pássaros, peixes e insetos (BONNEDAHL, et al., 2009; GILLIVER, et al., 1999; POETA, et. al., 2009; VERNER-

JEFFREYS et al., 2009). Ademais, as substâncias antimicrobianas podem se depositar na carne do animal e, posteriormente ser ingerida (DONE E HALDEN, 2015).

Além dos antimicrobianos depositados na carne dos animais, outros compostos químicos podem permanecer na carne dos animais, como no caso dos peixes o Verde de Malaquita, uma substância que apresenta propriedades carcinogênica, mutagênica e teratogênica (SILVEIRA, J. G. F., 2019). Dessa forma torna-se imprescindível a pesquisa sobre novos compostos, de preferência naturais, que possam tratar esses animais e não depositar no meio ambiente.

3.4. RESGATE DAS SUBSTÂNCIAS NATURAIS

Devido a um grande número de fatores que induzem resistência nos micro-organismos e a escassez de novas opções terapêuticas, encontrar poderes de cura nas plantas impulsionam novas pesquisas. Pessoas em todos os continentes, há muito tempo aplicavam cataplasmas e ingeriam infusões de centenas, senão milhares, de plantas nativas, que remontam à pré-história (COWAN, 1999).

As plantas podem produzir metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários incluem produção de amino ácidos, açúcares, ácidos nucleicos e lipídeos quais são necessários para a sobrevivência vegetal. Por outro lado, os metabólitos secundários são compostos bioativos produzidas em resposta a um estresse, muitas vezes relacionados a ataques de herbívoros, insetos e/ou fitopatógenos, e com base nesses metabólitos são extraídas substâncias que apresentam benefícios aos seres humanos (HAMID et al., 2011).

Grande parte dos antimicrobianos foram gerados a partir de produtos naturais e/ou de compostos derivados de produtos naturais (SALEEM, 2015). Produtos naturais medicinais são, teoricamente, mais acessíveis financeiramente, mais seguros em termos de efeitos tóxicos indesejáveis e mais prontamente disponíveis em comparação com suas contrapartes sintéticas (HAYASHI et al., 2013; RÍOS; RECIO, 2005). A partir das plantas, diversas substâncias bioativas podem ser encontradas, como taninos, alcalóides, carboidratos e glicosídeos, terpenóides, esteróides, flavonóides e cumarinas, que apresentam grande atividade farmacológica. Essas moléculas podem ser obtidas através de extratos vegetais, óleos essenciais ou substâncias isoladas a partir deles (YADAV; AGARWALA, 2011).

3.4.1. Óleos Essenciais

Definido por Paracelso no século XVI, óleos essenciais são caracterizados como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores ou aromas. Os óleos essenciais têm aspecto incolor ou claro e apresentam-se líquidos em temperatura ambiente, podem ser extraídos por diferentes métodos, como hidrodestilação e arraste a vapor, e de diferentes partes da planta como folhas, frutos, flores, cascas e até mesmo a planta inteira (PROBST, 2012).

A caracterização dos óleos essenciais, devido a sua volatilidade, pode ser obtida por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Os óleos essenciais apresentam características de hidrofobicidade, são apolares, solúveis em álcool e geralmente apresentam densidade mais baixa que a água (DJILANI; DICKO, 2012).

Os óleos essenciais são empregados em perfumes, como edulcorantes em alimentos e bebidas, também apresentam uso na aromaterapia e no tratamento de doenças específicas, como artrite. Estudos revelaram que os óleos essenciais servem como poderosos antioxidantes que previnem mutações e danos oxidantes nas células (OLOYEDE, G. K., 2016). Ademais, esses produtos naturais auxiliam no combate de uma grande variedade de patógenos, incluindo bactérias, fungos e vírus. Há indícios que óleos essenciais agem contra bactérias sem dar origem a resistência (KAVANAUGH; RIBBECK, 2012; PROBST, 2012).

3.4.1.1. Óleo essencial de *G. procumbens*

Uma classe de plantas do gênero *Gaultheria* compreende cerca de 134 diferentes espécies que são amplamente distribuídas em todo hemisfério norte. Essas plantas apresentam atividade anti-inflamatória, antioxidante, além de atividades antibacterianas e analgésicas. O gênero apresenta mais de 109 substâncias identificadas, incluindo derivados do ácido salicílico, terpenóides e esteroides (LIU, et al., 2013).

Gaultheria procumbens L., conhecida como Teaberry oriental, Checkerberry, ou Wintergreen é uma espécie pertencente à família Ericaceae, nativa da América do Norte e cultivada em todo o Hemisfério Norte. É um arbusto aromático de porte pequeno (até 2 metros de altura), com folhas perenes e frutos vermelhos (Figura 1). Na medicina popular o óleo essencial de *G. procumbens* é utilizado para tratar distúrbios, especialmente artrite reumatoide, edemas e lombalgia crônica (ARUNA, et al., 2014; APTE, 2006; ; LIU, et al., 2013; MICHEL et al., 2014 MICHEL et al., 2017).

Essa planta tem sido estudada e apresenta biológica do óleo esencial de *G. procumbens* frente a micro-organismos presentes na cavidade oral e capazes de formar biofilme, como

Streptococcus mutans oral e *Candida albicans* (Nikolic et al., 2013). Segundo Kajur e colaboradores (2017) o óleo essencial microencapsulado foi eficaz ao inibir aflatoxina produzida por *Aspergillus flavus*, os autores acreditam que seja devido capacidade na inibição do ergosterol fúngico.

Acredita-se que as atividades analgésica e anti-inflamatória desta planta sejam influenciadas principalmente por derivados do ácido salicílico (principalmente salicilato de metila). A substância majoritária que representa grande porcentagem encontrada no óleo essencial de *G. procumbens* é o salicilato de metila, esse composto tem uma ampla gama de aplicações em aromas, intermediários de síntese orgânica e solventes. Além disso o salicilato de metila apresenta ação antioxidante (LIU et al., 2013; RIBNICKY et al., 2003).

Figura 1. Características da planta *Gaultheria procumbens*, demonstrada na forma de arbusto e seus frutos.



Fonte: figura retirada do site: <https://www.etsy.com/au/listing/1122756942/wintergreen-plant-gaultheria-procumbens>.

3.5. ESTRESSE OXIDATIVO E ENZIMAS ANTIOXIDANTES

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, o que leva a aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). As EROS desempenham um papel significativo nas células humanas e a produção excessiva de ERO gera dano a macromoléculas importantes, como ácidos nucleicos (BLOKHINA et al., 2003).

As causas do aumento da produção de EROs incluem causas endógenas (inflamação, elevação da concentração de O_2 e aumento do vazamento mitocondrial) e exógenas (poluição ambiental, exercício extenuante, tabagismo, nutrição, inflamação crônica, estresse psicológico e emocional, entre outros). As causas da diminuição das defesas antioxidantes incluem atividade reduzida de enzimas antioxidantes endógenas e redução da ingestão ou absorção de antioxidantes dos alimentos (BLOKHINA et al., 2003; POLJSAK et al., 2013;).

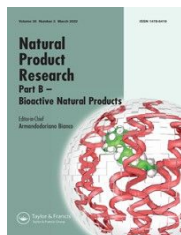
Enzimas antioxidantes tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicaais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (POLJSAK et al., 2013).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e xantina oxidoreductase (XOR) são responsáveis por manter o equilíbrio entre as funções de formação de radicais livres e eliminação de seu excesso (BARBOSA et al., 2010).

4. RESULTADOS

4.1. ARTIGO 1: PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION, GENOTOXICITY, CYTOTOXICITY, AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Gautheria procumbens* ESSENTIAL OIL

Publicado no periódico Natural Product Research – Qualis B2 – Fator de Impacto 2.488



Natural Product

Formerly Natural Product



ISSN: (Print) (Online) Journal <https://www.tandfonline.com/>

Phytochemical characterization, genotoxicity, cytotoxicity, and antimicrobial activity of *Gautheria procumbens* essential oil

Camila Marina Verdi, Vanessa Schopf Machado, Alencar Kolinsk Machado,
Bruna Klein, Pauline Cordenonsi Bonez, Eduardo Nascimento Correa de Andrade, Grazielle Rossi, Marli Matiko Campos, Roger Wagner, Michele Rorato Sagrillo & Roberto Christ Vianna Santos

To cite this article: Camila Marina Verdi, Vanessa Schopf Machado, Alencar Kolinsk Machado, Bruna Klein, Pauline Cordenonsi Bonez, Eduardo Nascimento Correa de Andrade, Grazielle Rossi, Marli Matiko Campos, Roger Wagner, Michele Rorato Sagrillo & Roberto Christ Vianna Santos (2022) Phytochemical characterization, genotoxicity, cytotoxicity, and antimicrobial activity of *Gautheria procumbens* essential oil, *Natural Product Research*, 36:5, 1327-1331, DOI: [10.1080/14786419.2020.1862832](https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1862832)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1862832>



View supplementary



Published online: 28 Dec 2020.



Submit your article to this journal



Article views:



View related



View CrossMark



Citing articles: 2 View citing articles

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gnpl20>

SHORT



Phytochemical characterization, genotoxicity, cytotoxicity, and antimicrobial activity of *Gaultheria procumbens* essential oil

Camila Marina Verdi^a, Vanessa Schopf Machado^a, Alencar Kolinsk Machado^b,
 Bruna Klein^c, Pauline Cordenonsi Bonez^a, Eduardo Nascimento Correa de Andrade^d, Grazielle
 Rossi^e, Marli Matiko Campos^e, Roger Wagner^c, Michele Rorato Sagrillo^b and Roberto Christ
 Vianna Santos^a

^aLaboratory of Oral Microbiology Research (LAPEMICRO), Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil; ^bLaboratory of Cell Culture, Graduate Program in Nanosciences –Franciscana University, Santa Maria, RS, Brazil; ^cIntegrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil; ^dCenter of Health Science – Medicine – UFSM, Santa Maria, RS, Brazil;

^eLaboratory of Mycobacteriology (LABIMYCO), Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

ABSTRACT

This study investigated the chemical constituents of *Gaultheria procumbens* essential oil and is the first to relate cytogenotoxicity with oxidative metabolism and antimicrobial activity. Chromatographic analysis of the essential oil showed methyl salicylate (99.96%) and linalool (0.04%) as the major compounds. The essential oil showed no signs of cytogenotoxicity at different concentrations (1.82 to 58.34 mg mL⁻¹). Furthermore, *G. procumbens* essential oil and methyl salicylate were used to evaluate the minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal microbicidal concentrations (MMC). The results showed efficacy against several microorganisms, including *Aeromonas caviae*, *Candida albicans*, and *Mycobacterium fortuitum* with MIC values ranging from 1.82 to 3.64 mg mL⁻¹ and MMC values ranging from 3.64 to 12.67 mg mL⁻¹, which were confirmed by time-kill kinetics. Based on our results, the essential oil is a promising alternative to developing future formulations to treat infections caused by microorganisms.


ARTICLE HISTORY

Received 19 June 2020
 Accepted 6 December 2020

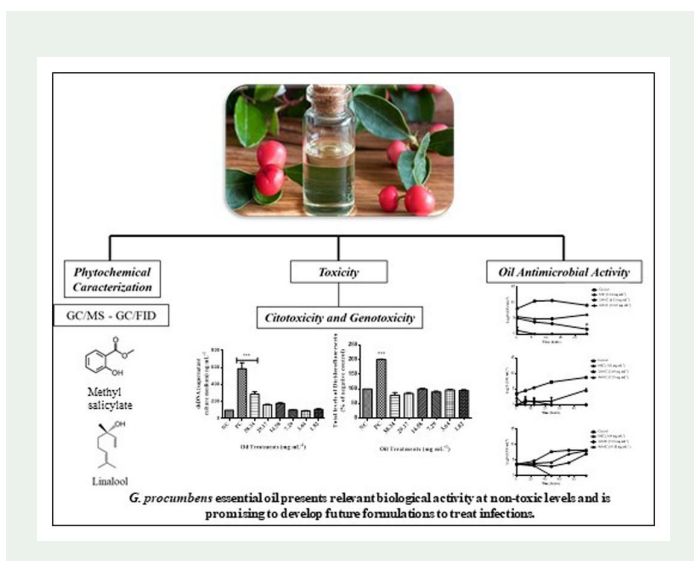
KEYWORDS

Toxicity; PBMCs; time-kill; MIC; methyl salicylate; microorganism; mycobacterium

CONTACT Camila Marina Verdi  milaverdi@hotmail.com

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1862832>.

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



3 Introduction

Medicinal plants have become increasingly popular by the scientific community to treat infectious diseases since numerous conventional antimicrobial agents have already demonstrated their inefficiency against resistant microorganisms (Bua et al. 2018). The plant *Gaultheria procumbens* belongs to the Ericaceae family, popularly known as wintergreen. The essential oil of this plant is traditionally used in folk medicine, and previous in vitro and in vivo studies have confirmed its anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial properties (Nikolic et al. 2013a; Michel et al. 2014). Moreover, research has shown the high prevalence of traditional medicine use and the belief that natural products pose no risk (van Andel and Carvalheiro 2013), although it is necessary to alert the population about the possible toxic effects of such plants. In this sense, the analysis of the safety profile of natural compounds is fundamental considering that the therapeutic dose can be near the toxic dose (Mounanga et al. 2015; Baldissera et al. 2016). Therefore, this study aimed to identify the composition of *G. procumbens* essential oil, verify the toxicity profile of different concentrations using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and evaluate its antimicrobial potential against bacteria, mycobacteria, and yeasts.

4 Results and discussion

4.2 Characterization of *G. procumbens* essential oil by GC-MS/GC-FID

The phytochemical characterization of the essential oil is of utmost importance, as the substances present can vary according to environmental factors such as soil, water, temperature, and harvesting time of the plant (Baser and Buchbauer 2015). In the quantitative essential oil analysis (gas chromatograph equipped with a flame

ionization detector - GC-FID), two compounds were observed and represented more than 99.9% of the essential oil compounds. The qualitative analysis (gas chromatograph coupled to a mass spectrometer - GC-MS) only revealed the presence of linalool (0.004%) and methyl salicylate (99.96%)

in the essential oil (Supplementary material Figure S1). Nikolic et al. (2013a) also reported the phytochemical characterization of *G. procumbens* essential oil, although some identified substances differ. This variation may be related to the place where the essential oil is obtained (Duarte et al. 2010). Other studies corroborate our findings and have shown that methyl salicylate is a major compound found at fairly high concentrations (70–99%) in essential oils of plants from the Ericaceae family (Michel et al. 2014).

4.3 Toxicity assay

2.2.1. Genotoxicity

In this study, double-stranded deoxyribonucleic acid (DNA) damage was not observed in the Picogreen assay at the concentration range of 1.8229.17 mg mL⁻¹ for *G. procumbens* essential oil compared to the positive control (Supplementary material Figure S2). Moreover, the comet test revealed that the *G. procumbens* essential oil did not induce DNA damage at the concentrations of 1.82 and 3.64 mg mL⁻¹ compared to the negative control. However, significant DNA damage occurred at the concentrations ranging from 7.29–58.34 mg mL⁻¹ compared to the negative control (Supplementary material Figure S3). These results corroborate Celik and Turkez (2016), who investigated the effects of *G. procumbens* essential oil in N2a neuroblastoma cells at various concentrations (0–400 mg L⁻¹) and reported that DNA damage only occurs at high concentrations.

2.2.2. Cytotoxicity

The results obtained in the dichlorofluorescein (DCFH-DA) test showed that the *G. procumbens* essential oil was unable to increase reactive oxygen species (ROS) at the concentration range of 1.82–58.34 mg mL⁻¹, maintaining cellular viability compared to the positive control (Supplementary material Figure S4). Other studies have demonstrated similar results regarding the antioxidant activity of plants of the Ericaceae family (Michel et al. 2014; Martin et al. 2015). Another method for assessing cell viability is the MTT assay, which showed that all tested concentrations of the essential oil (1.82 to 58.34 mg mL⁻¹) maintained cell viability compared to the negative control (Supplementary material Figure S5). Celik and Turkez (2016) did not observe alterations in neuroblastoma cell viability of rats with doses equal to or above 75 mg L⁻¹ of *G. procumbens* essential oil. In addition, nitrite detection was performed at the cellular level, and the high levels of nitrite (NO²⁻) suggested there was an induced inflammatory response (Samad et al. 2014). In the present study, it was possible to observe that none of the tested concentrations of *G. procumbens* essential oil increased NO²⁻ levels compared to the negative control (Supplementary material Figure S6). Samad et al. (2014) demonstrated that another plant in the Ericaceae family (*Vaccinium corymbosum* L.) was also able to keep nitrite levels low, thus confirming its potential use as an anti-inflammatory compound.

4.4 Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of *G. procumbens* essential oil (0.1050.76 mg mL⁻¹ bacterial; 0.05629.17 mg mL⁻¹ mycobacterial and yeast) was evaluated by testing the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal microbicidal concentration (MMC). These results showed potential antimicrobial activity that inhibited growth and caused the death of microorganisms at low concentrations of *G. procumbens* essential oil (Supplementary material Table S1). In this context, the *Gautheria yunnanensis* essential oil also showed antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* at low concentrations (0.3125%) (Zhizhen et al. 1999). In order to complement the data on

the antimicrobial activity of the essential oil, the time-kill curve assay was performed (Supplementary material Figure S7). The results confirmed the antimicrobial activity findings and revealed that the essential oil could eradicate microorganisms at different times. In the time-kill curve, it was possible to observe that, for *A. caviae* (American Type Culture Collection (ATCC) 15,468), the MMC (12.67 mg mL⁻¹) caused death after 6 h of incubation. In the case of *C. albicans* (ATCC14053), the MMC (3.64 mg mL⁻¹) caused death after 24 h of incubation. In the case of *M. fortuitum* (ATCC 6841), the MMC (14.58 mg mL⁻¹) was able to kill microbial cells after 48 h of incubation and at a concentration of 29.17 mg mL⁻¹ in 24 h. A recent study by Elhidar et al. (2019) demonstrated the susceptibility of mycobacteria, bacteria, and yeasts to essential oils. The majority of our results showed no differences between the action of the *G. procumbens* essential oil and its major compound (methyl salicylate). The possible mechanisms of antimicrobial action promoted by natural compounds are still being researched continuously. A study by Tiara et al. (2019) reported that methyl salicylate has anti-inflammatory properties and displays a wide range of antimicrobial activities mainly because of its ability to bind directly to proteins located in cell membranes, altering the process of cell signaling. In addition, the efficient antimicrobial action of essential oils can be attributed to their lipophilic character, which allows for strong interactions with the phospholipid bilayer of cell membranes, destroying the membrane and in alterations in the cytoplasm of bacteria and mycobacteria (Lahiri et al. 2019).

Nevertheless, it is assumed that, for yeasts, the antimicrobial activity of the oil occurs due to the inhibition of ergosterol biosynthesis (Nikolic et al. 2013b). Considering that the *G. procumbens* essential oil presented excellent antimicrobial activity against pathogenic microorganisms in the non-toxic range for PBMCs, this natural substance presents significant antimicrobial potential. Due to its action against microorganisms that cause superficial infections, we suggest a possible topical formulation. However, prospective *in vivo* studies are essential to elucidate the action of this essential oil to contribute to the therapeutic arsenal against resistant microorganisms.

Acknowledgments

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank Coordenac, ~ao de Aperfeic, oamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundac, ~ao de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for their support.

NATURAL PRODUCT RESEARCH  1331

Disclosure statement

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Baldissera MD, Souza CF, Grando TH, Sagrillo MR, De Brum GF, Nascimento K, Peres DS, Maciel MF, Silveira SO, Da SCA, et al. 2016. Memory deficit, toxic effects and activity of Na₂S₂O₃, K₂ATPase and NTPDase in brain of Wistar rats submitted to orally treatment with alpha-terpinene. *Environ Toxicol Pharmacol.* 46:1–8.
- Baser KHC, Buchbauer G, eds. 2015. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Bua A, Molicotti P, Donadu MG, Usai D, Le LS, Tran TTT, Ngo VQT, Marchetti M, Usai M, Cappuccinelli P, et al. 2018. “In vitro” activity of Melaleuca cajuputi against mycobacterial species. *Nat Prod Res.* 34(10) 1–4.
- Celik K, Turkez H. 2016. Investigation of in vitro cytotoxicity and genotoxicity of wintergreen oil in rat primary neurons and N2a neuroblastoma cells. *J Essen Oil Bearing Plants.* 19(6): 1340–1350.
- Elhidar N, Nafis A, Kasrati A, Goehler A, Bohnert JA, Abbad A, Hassani L, Mezrioui NE. 2019. Chemical composition, antimicrobial activities and synergistic effects of essential oil from *Senecio anteuphorbium*, a Moroccan endemic plant. *Ind Crops Prod.* 130:310–315.
- Duarte AR, Naves RR, Santos SC, Seraphin JC, Ferri PH. 2010. Genetic and environmental influence on essential oil composition of *Eugenia dysenterica*. *J Braz Chem Soc.* 21(8):1459–1467.

- Lahiri D, Dash S, Dutta R, Nag M. 2019. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *J Biosci.* 44(2):52.
- Martin MA, Ramos S, Mateos R, Marais JP, Bravo-Clemente L, Khoo C, Goya L. 2015. Chemical characterization and chemoprotective activity of cranberry phenolic powders in a model cell culture. Response of the antioxidant defenses and regulation of signaling pathways. *Food Res Int.* 71:68–82.
- Michel P, Dobrowolska A, Kicel A, Owczarek A, Bazylko A, Granica S, Piwowarski JP, Olszewska MA. 2014. Polyphenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory activity of eastern teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) leaf extracts. *Molecules.* 19(12):20498–20520.
- Mounanga MB, Mewono L, Angone AS. 2015. Toxicity studies of medicinal plants used in subSaharan Africa. *J Ethnopharmacol.* 174:618–627.
- Nikolic M, Markovic T, Mojovic M, Pejin B, Savic A, Peric T, Markovic D, Stevic T, Sokovic M. 2013a. Chemical composition and biological activity of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. *Ind Crops Prod.* 49:561–567.
- Nikolic M, Markovic T, Mojovic M, Pejin B, Savic A, Peric T, Markovic D, Saad NY, Muller CD, Lobstein A. 2013b. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Fragr J.* 28(5):269–279.
- Samad NB, Debnath T, Ye M, Hasnat MA, Lim BO. 2014. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of Korean blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts. *Asian Pacific J Trop Biomed.* 4(10):807–815.
- Tiara A, Widyarman AS, Rovani CA. 2019. Efficacy of disinfectants on microbial contaminated toothbrushes. *Sci Dental J.* 3(3):85.
- van Andel T, Carvalheiro LG. 2013. Why urban citizens in developing countries use traditional medicines: the case of Suriname. *Evid. Based Complement Altern Med.* 2013:1–13.
- Zhizhen Z, Dean G, Changling L, Junhua Z. 1999. Study on antibacterial, anti-inflammatory and analgesic activities of *Gaultheria yunnanensis*. *Northwest Pharmaceut J.* 14, 60-61.

SUPPLEMENTAL MATERIAL**Phytochemical characterization, genotoxicity, cytotoxicity, and antimicrobial activity of
Gautheria procumbens essential oil**

Camila Marina VERDI¹, Vanessa Schopf MACHADO¹, Alencar Kolinsk MACHADO², Bruna KLEIN³, Pauline Cordenonsi BONEZ¹, Eduardo Nascimento Correa de ANDRADE⁴, Grazielle ROSSI⁵, Marli Matiko CAMPOS⁵, Roger WAGNER³, Michele Rorato SAGRILLO⁶, Roberto Christ Vianna SANTOS^{1*}.

¹ Laboratory of Oral Microbiology Research (LAPEMICRO), Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

² Laboratory of Cell Culture, Graduate Program in Nanosciences –Franciscana University, 97010-491, Santa Maria, RS, Brazil.

³ Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

⁴ Center of Health Science – Medicine – UFSM, Brazil

⁵ Laboratory of Mycobacteriology (LABIMYCO), Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding author: Camila Marina Verdi (milaverdi@hotmail.com), Laboratório de Pesquisa em Microbiologia oral, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Campus UFSM, Prédio 20, Sala 4210, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Phone: +55 55 3220-8742

Abstract

This study investigated the chemical constituents of *Gaultheria procumbens* essential oil and is the first to relate cytogenotoxicity with oxidative metabolism and antimicrobial activity. Chromatographic analysis of the essential oil showed methyl salicylate (99.96%) and linalool (0.04%) as the major compounds. The essential oil showed no signs of cytogenotoxicity at different concentrations (1.82 to 58.34 mg mL⁻¹). Furthermore, *G. procumbens* essential oil and methyl salicylate were used to evaluate the minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal microbicidal concentrations (MMC). The results showed efficacy against several microorganisms, including *Aeromonas caviae*, *Candida albicans*, and *Mycobacterium fortuitum* with MIC values ranging from 1.82 to 3.64 mg mL⁻¹ and MMC values ranging from 3.64 to 12.67 mg mL⁻¹, which were confirmed by time-kill kinetics. Based on our results, the essential oil is a promising alternative to developing future formulations to treat infections caused by microorganisms.

Keywords: Toxicity; PBMCs; Time-kill; MIC; Methyl Salicylate; Microorganism; *Mycobacterium*.

Experimental section

Obtaining and characterizing the *G. procumbens* essential oil

The *G. procumbens* essential oil was obtained commercially from FERQUIMA® (São Paulo, Brazil), under lot number 103. The essential oil originally comes from China, and extraction was performed on the leaves by steam distillation. The essential oil storage followed the manufacturer's instructions, and the tests were carried out up to one month after the characterization. The *G. procumbens* essential oil was characterized on a Varian Star 3400CX (CA, USA) gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID). The commercial crude oil (1 µL) was diluted in hexane (1 ml), and an aliquot of the solution (1 µL) was inserted into the chromatograph injection port at a temperature of 250 °C in a 1:20 ratio split mode. The compounds were separated on a non-polar capillary column of fused silica, Phenyl Polysilphenylene Siloxane (BPX 5) (25 m × 0.22 mm × 0.25 µm) (SGE, Australia). Hydrogen was used as the entrainment carrier gas at a constant pressure of 15 psi. The initial column temperature was adjusted to 40 °C and maintained for one min. Then, the temperature gradient was started at 8 °C min⁻¹ and increased to 160 °C, followed by increasing at 1 °C min⁻¹ to 180 °C, then to 300 °C by increasing at 20 °C min⁻¹ and maintained under isothermal conditions for 10 min. The detector temperature was maintained at 280 °C. An n-alkane

homologous series was analyzed under the same chromatographic conditions to calculate the linear retention index (LRI).

The qualitative analysis of the compounds was performed using a Shimadzu QP2010 Plus gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC/MS, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The same chromatographic conditions previously described were used for these analyses, except helium gas was used as the carrier gas. The detector was operated in ionization mode with an electron impact ionization energy of 70 eV and a mass scan range of 35-350 m/z. The analytes were identified by comparing with mass spectra available in the National Institute of Standards and Technology (NIST) and comparing the linear retention indices calculated with those found in the literature. The relative percentage amount of each identified compound was obtained from the peak area detected in the flame ionization detector (FID).

Sample preparation for *G. procumbens* essential oil analysis

For the genotoxicity and cytotoxicity tests, the essential oil concentrations ranged from 1.82 to 58.34 mg mL⁻¹. The concentrations ranged from 0.10 to 50.76 mg mL⁻¹ (bacterial) and 0.056 to 29.17 mg mL⁻¹ (mycobacterial and yeast) for the antimicrobial activity test. The tested concentrations of *G. procumbens* essential oil were defined based on previous publications from our research group (Machado et al., 2020). The concentrations differed due to the characteristics of each method, which considered the characteristics of each microbial strain. To dilute the essential oil and major compound, water and polysorbate 80 (0.31 to 10%) were used as the diluent. The polysorbate 80 was applied separately in all tests to demonstrate that it does not interfere with the essential oil results (data not shown).

Toxicity assays

Blood collection for toxicological tests

Peripheral blood samples were obtained from three discarded samples from the Laboratory of Clinical Analysis of the Franciscan University and approved by the Ethical Committee (CAAE: 31211214.4.0000.5306) and with the absence of identification data. The samples were obtained by venipuncture using heparin vacutainer tubes, and the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were then separated for treatment and cell culture.

PBMC treatment in toxicity tests

To test the cytotoxic and genotoxic effects of the compounds on cell viability and deoxyribonucleic acid (DNA) damage, an experimental protocol similar to Wilms et al. (2005)

was used in the PBMCs. The culture medium containing the cells was used as a negative control, and the culture medium containing hydrogen peroxide (100 mM) was employed as a positive control. The lymphocytes were separated from the PBMC by density gradient (Histopaque®-1077) centrifugation. A concentration of 2×10^5 cells mL^{-1} was obtained by counting in a Neubauer chamber with 0.4% trypan blue. After seeding the cells, they were treated for 24 h with different doses of *G. procumbens* essential oil (1.82 to 58.34 mg mL^{-1}).

Fluorimetric DNA quantification using DNA-PicoGreen® reagent

In order to complement the determination of cell viability, a fluorimetric assay was carried to quantify free DNA in the medium using Invitrogen DNA-PicoGreen® reagent (Life Technologies), which is a fluorescent dye that binds to double-stranded DNA. This procedure was performed in the medium where the cells were treated to determine the presence of DNA in the medium due to possible cellular disruption and cell death. The dye was added to the samples in a black 96-well plate and incubated for 5 min before the fluorescence was read on a spectrofluorometer (excitation at 480 nm and emission at 520 nm).

Comet assay

The comet assay was performed according to Singh et al. (1988) and modified according to García et al. (2004). This test is highly sensitive and enables the levels of single-strand breaks of DNA to be quantified. On a glass slide previously covered with a 1.5% agarose layer, the PBMCs were isolated and suspended in low melting point agarose. The material was then immersed in lysis solution (89 mL of lysis solution for 10 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) and 1 mL of Triton X-100) to remove membranes and cytoplasm from the cells. Next, the slides were incubated in alkaline electrophoresis buffer (300 mM NaOH and 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) in distilled water) and electrophoresed for about 30 min at 25 V and 300 mA. After neutralization and fixation, staining was performed in order for the genetic material to be analyzed. Each slide was analyzed using an optical microscope, and the cells were classified into four classes of damage as proposed by García et al. (2004) and illustrated by Fronza (2010), ranging from 0 (no damage) to 4 (maximum damage). The classification of cellular apoptosis was also included.

Dichlorofluorescein diacetate test (DCFH-DA)

According to Esposti (2002), the 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate reagent (DCFH-DA) can cross the cell membrane, be deacetylated by mitochondrial enzymes, and create 2',7'-

dichlorodihydrofluorescein, which reacts with reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂). Additionally, this compound can produce 2',7'-dichlorofluorescein, which emits fluorescence. Fluorescence was assessed using a spectrofluorometer (excitation at 488 nm and emission at 525 nm).

Cell viability evaluation using MTT assay

In the MTT assay, the 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reagent is water-soluble, yellowish in color, and readily incorporated into viable cells, which reduce this compound via mitochondrial activity using the enzyme succinate dehydrogenase. After being reduced, MTT is converted into formazan crystals that are insoluble in water and bluish-purple in color, stored in the cell cytoplasm, and subsequently solubilized by adding DMSO. Then, the compound is quantified colorimetrically by spectrophotometry at a wavelength of 570 nm. The absorbance value is proportional to the number of viable cells compared to the negative control (Mosman, 1983; Denizot & Lang, 1986).

Nitric oxide test

The nitric oxide test detects the presence of organic nitrite (NO²⁻) in the sample. Nitrite is detected and analyzed by forming a pinkish color when the Griess reagent is added to a sample containing NO²⁻. In the Griess reagent, sulfanilamide is responsible for the diazonium salt formation by reacting with the nitrite in the sample. When the azo compound (N-1-naphthylenediamino-bichlorohydrate) interacts with diazonium salts, a pink color appears in the sample. Cell culture supernatants (100 µL) were used for this assay and performed on a 96-well plate. Next, 100 µL of the Griess reagent was added to the supernatant, and samples were incubated at room temperature for 15 min. Absorbance at 540 nm was read on a spectrophotometer (Choi et al., 2012; Noh et al., 2015).

Antimicrobial activity

Microorganism strains

The antibacterial activity of the *G. procumbens* essential oil was evaluated against standard strains of *Aeromonas caviae* (American Type Culture Collection (ATCC) 15468), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Serratia marcescens* (ATCC8100), *Staphylococcus aureus* (ATCCBAA1026), and *Streptococcus pneumoniae* (ATCC99619). Antifungal activity was tested in standard yeast strains: *Candida albicans* (ATCC14053), *Candida krusei* (ATCC6258), *Candida tropicalis* (ATCC750), and a clinical isolate of *Candida glabrata* (fluconazole

resistant). The antimycobacterial activity was evaluated against standard strains of *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841) and *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977). These strains belonged to the bacterial collection of the Laboratory of Oral Microbiology (LAPEMICRO), the fungi collection of the Laboratory of Mycological Research (LAPEMI), and the mycobacterial collection of the Laboratory of Mycobacteriology (LABMYCO) of the Federal University of Santa Maria (UFSM).

Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal microbicidal concentration (MMC) determination

The assays followed the standard protocols for each microbial group standardized by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), i.e., M7-A9 (2012) for bacteria, M24-A2 (2011) for mycobacteria, and M27-A3 (2008) for yeasts, with adaptations for the use of essential oil and its major compound. The microdilution method in broth was performed in sterile 96-well plates to determine the MIC. The plates were incubated at 37 °C, and after the incubation period, the presence or absence of growth was determined. After reading the MIC, 10 µL was removed from the well with no growth, seeded, and submitted to incubation at 37 °C. The absence of growth characterized the MMC in all tests with negative growth, besides the polysorbate 80 control. These tests were performed in triplicate and on three different days to ensure reliability in the results.

Time-kill kinetics

From the MMC test, the *A. caviae*, *C. albicans*, and *M. fortuitum* strains were selected for the death curve analysis because they were susceptible to lower concentrations. Tests were performed with the essential oil at the concentrations of 3.16 (MIC), 6.33 (2x MIC), and 12.67 (4x MIC). For each bacterial strain, the plates were incubated and seeded at 0, 6, 12, and 24 h, extended up to 48 h for yeast, and 72 and 96 h for mycobacteria. After incubation, the colonies were counted. The microbicidal activity was defined as a 99.9% reduction ($\geq 3 \log_{10}$) in the total number of colony forming unit (CFU) mL⁻¹ in the original inoculum. Death curves were constructed by plotting Log CFU versus time (Silva et al., 2011).

Statistical analysis

The statistical analysis for genotoxicity and cytotoxicity was performed using SPSS[®] software (version 19.0). One-way analysis variance (ANOVA) followed by Dunnett's *post hoc* test was applied at p<0.05 significance. The time-kill curve was prepared using GraphPad Prism[®] 5. All

tests were performed in three replicates and the results are expressed as mean \pm standard derivation.

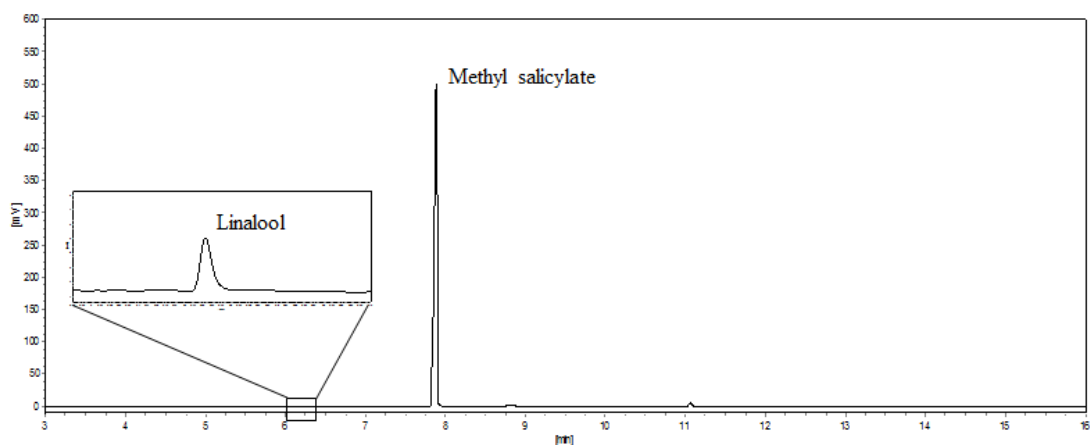


Figure S1: Chemical composition of the *G. procumbens* essential oil identified by GC-MS.

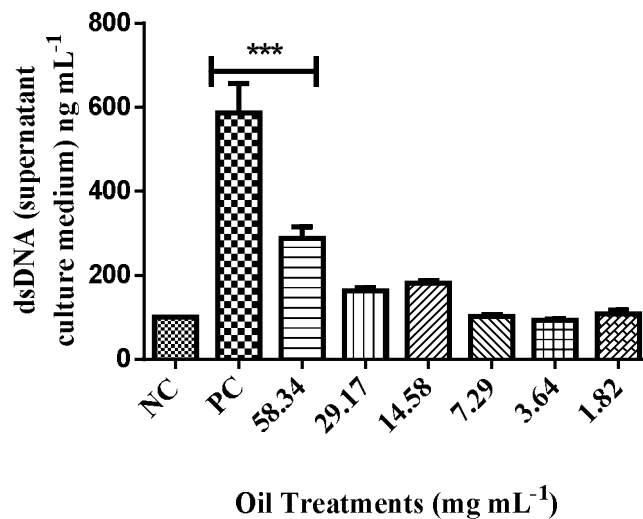


Figure S2: Fluorimetric DNA quantification assay using DNA-PicoGreen® with *G. procumbens* essential oil at different concentrations.

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The results indicated by *** show a statistically significant differences ($p < 0.001$). Negative control (NC) and positive control (PC).

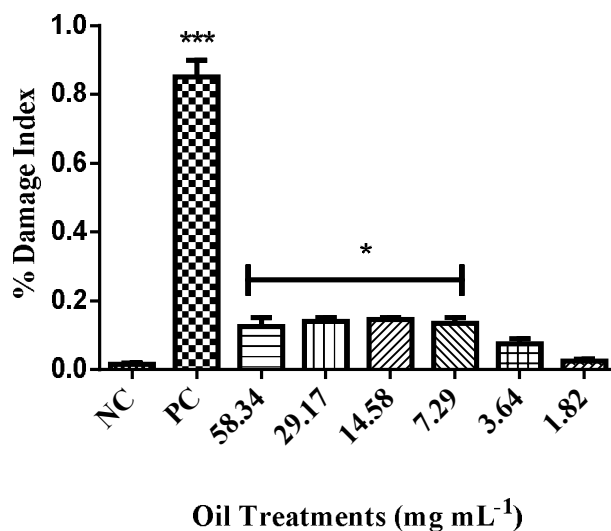


Figure S3: Comet assay after 24 h of incubation.

Results are expressed as a percentage of the negative control (100%). Data are presented as % of the untreated negative control group (NC). Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Analyses were performed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$. Negative control (NC) and positive control (PC – hydrogen peroxide).

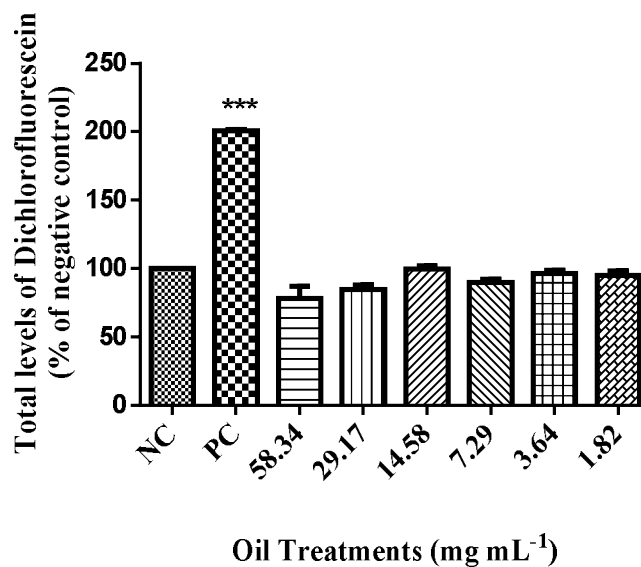


Figure S4: Dichlorofluorescein diacetate assay (DCFH-DA) was performed to evaluate free radical production levels after 24 h of incubation.

The results are expressed as a percentage of the negative control (100%). NC is the negative control (cells in culture medium). Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). The

analyses were performed by one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. *** $p < 0.001$.

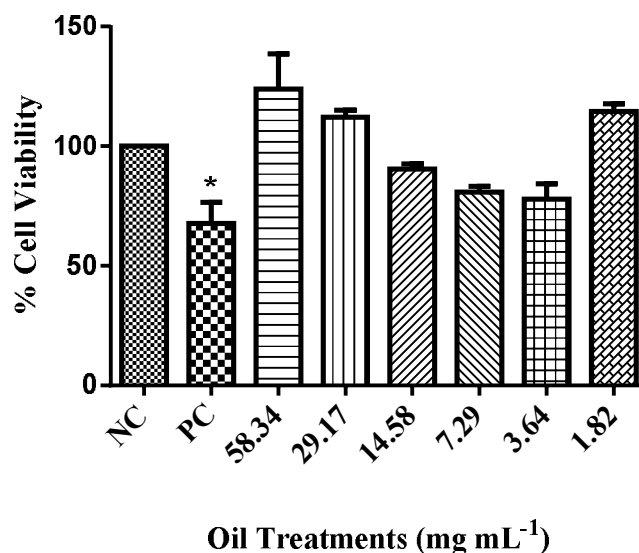


Figure S5: MTT assay after 24 h of incubation.

Results are expressed as a percentage of the negative control (100%). Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Analyses were performed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. * $p < 0.05$. Negative control (NC) and positive control (PC).

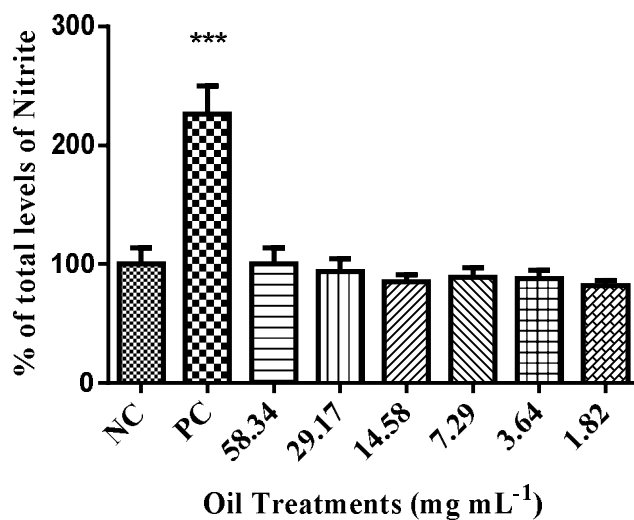


Figure S6: Nitric oxide assay after 24 h of incubation.

Results are expressed as a percentage of the negative control (100%). Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Analyses were performed by one-way ANOVA followed by

Dunnett's post hoc test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. *** $p < 0.001$.

Table S1: Antimicrobial activity of *G. procumbens* essential oil and methyl salicylate (the major compound) assessed by MIC (mg mL^{-1}) and MMC (mg mL^{-1}) tests.

Microorganism	<i>G. procumbens</i> essential oil		Methyl salicylate	
	MIC	MMC	MIC	MMC
Gram negative				
<i>Escherichia coli</i> (ATCC35218)	6.33	>50.73	6.33	>50.73
<i>Aeromonas caviae</i> (ATCC15468)	3.16	12.67	3.16	12.67
<i>Serratia marcescens</i> (ATCC8100)	6.33	12.67	6.33	12.67
Gram positive				
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCCBAA1026)	6.33	>50.73	6.33	>50.73
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC99619)	12.67	50.73	12.67	50.73
Yeast				
<i>Candida albicans</i> (ATCC14053)	1.82	3.64	1.82	3.64
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC750)	7.29	14.58	7.29	14.58
<i>Candida glabrata</i> (FR)	7.29	14.58	7.29	14.58
Mycobacteria				
<i>Mycobacterium fortuitum</i> (ATCC 6841)	3.64	14.58	3.64	14.58
<i>Mycobacterium abscessus</i> (ATCC 19977)	3.64	>29.17	3.64	>14.58

CI: Clinical Isolate, ATCC: American Type Culture Collection, FR: Fluconazole Resistant.

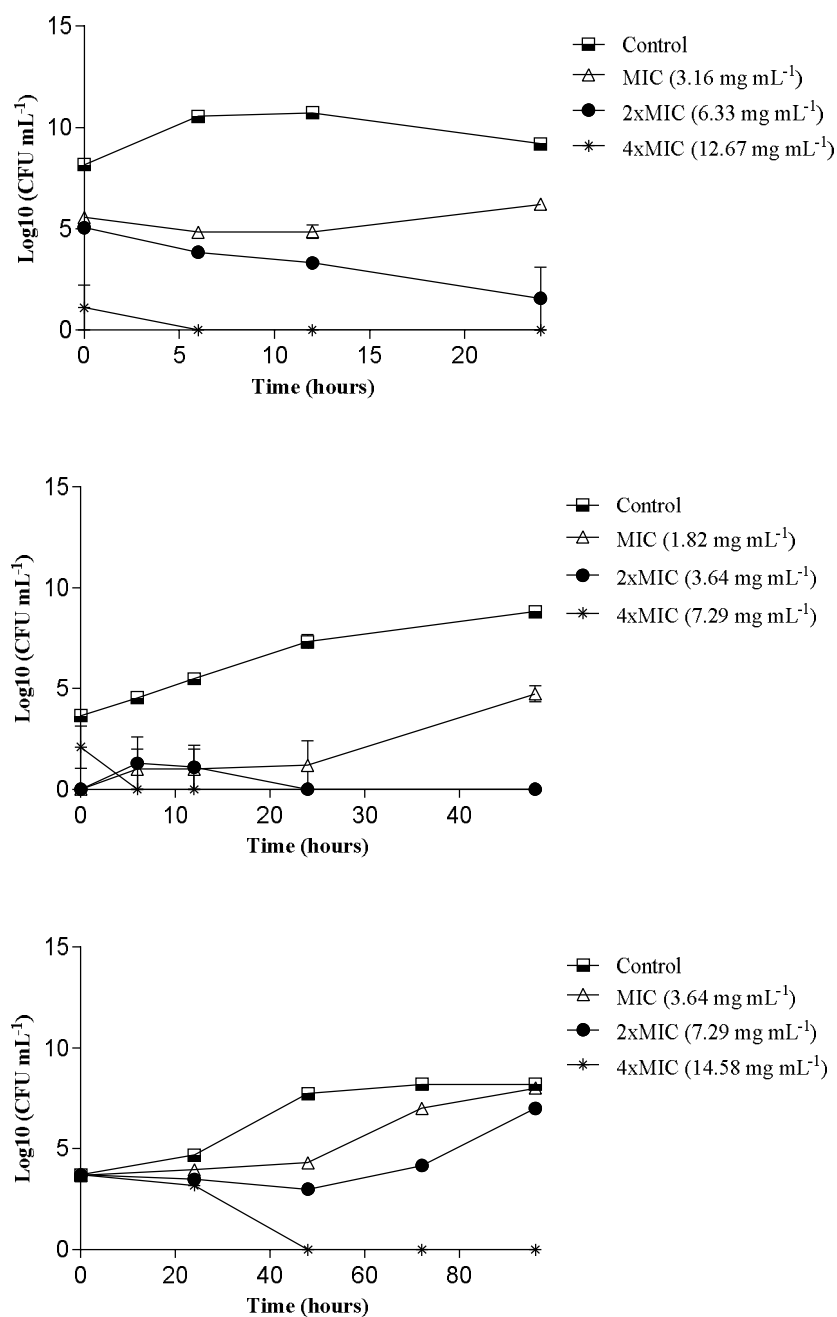


Figure S7: Time-kill curve of *A. caviae* (A), *C. albicans* (B), and *M. fortuitum* (C) exposed to several concentrations (based on the MIC) of *G. procumbens* essential oil.

References

Choi, W. S., Shin, P. G., Lee, J. H., & Kim, G. D. (2012). The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophage cells. *Cellular immunology*, 280(2), 164-170.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute, M27-A3 reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved. standard—third edition, CLSI. 28 (2008).

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute, M24-A2: Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard—second edition, (2011).

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute, M07-A9 methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically ; approved standard — ninth edition, 2012. doi:10.4103/0976-237X.91790.

Esposti, D. M. (2002). Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods*, 26(4), 335-340.

Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, 89(2), 271-277.

Fronza, A. B. (2010). *Associação entre audição, tabagismo e genotoxicidade em adultos jovens* (Doctoral dissertation, Dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria).

Garcia, O., Mandina, T., Lamadrid, A. I., Diaz, A., Remigio, A., Gonzalezd, Y., Piloto, J., Gonzalez, J.E., Alvarez, A. (2004). Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutation Research*, 556(1-2), 25-34.

Machado, V. S., Verdi, C. M., Somacal, S., Rossi, G. G., Machado, M. L., Klein, B., Ross, V. C., Urquhart C. G., Dalcol I. I., Sagrillo M. R., Machado, A. K., Campos M. M., Wagner R., Santos R. C. V. (2020). *Achyrocline flaccida* essential oil from Brazil: phytochemical composition, genotoxicity, protective effects on *Caenorhabditis elegans*, and antimycobacterial activity. *Natural Product Research*, 1-5.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

Noh, H. J., Hwang, D., Lee, E. S., Hyun, J. W., Yi, P. H., Kim, G. S., Lee, S.E., Pang, C., Park, Y.J., Chung, K. H., Do Kim, G. (2015). Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of Citrus unshiu. *Journal of ethnopharmacology*, 163, 106-112.

Silva, F., Lourenço, O., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2011). Bacteriostatic versus bactericidal activity of ciprofloxacin in *Escherichia coli* assessed by flow cytometry using a novel far-red dye. *The Journal of antibiotics*, 64(4), 321-325.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.

Wilms, L. C., Hollman, P. C., Boots, A. W., & Kleinjans, J. C. (2005). Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 582(1-2), 155-162.

4.2. MANUSCRITO 1: *Gaultheria procumbens* ESSENTIAL OIL EFFECTS ON LONGEVITY AND OXIDANT/ANTIOXIDANT STATUS OF SILVER CATFISH *Rhamdia quelen* EXPERIMENTALLY INFECTED BY *Aeromonas caviae*

Manuscrito submetido a revista Aquaculture— Qualis B2 – Fator de Impacto 2.488

Gaultheria procumbens* essential oil longevity and oxidant/antioxidant status of silver catfish *Rhamdia quelen* experimentally infected by *Aeromonas caviae

Camila Marina VERDI¹, Matheus Delamea BALDISSERA², Vanessa Schopf MACHADO¹,
Carine Freitas SOUZA³, Eduardo Nascimento Correa de ANDRADE¹, Bernardo
Baldisseroto², Roberto Christ Vianna SANTOS^{1*}

¹Oral Microbiology Research Laboratory (LAPEMICRO), UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

²Fish Physiology Laboratory (LAFIPE), UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

³Superior Institute and Lutheran Educational Center Bom Jesus (IELUSC), Joinville, SC, Brazil

Abstract

The growth of bacterial resistance in animals and the accumulation of antimicrobials in animal meat has become a significant problem with nutritional and economic impact. In search of a viable alternative applicable to the aquaculture practice, this study investigated the action of *Gaultheria procumbens* essential oil against *Rhamdia quelen* infected with *Aeromonas caviae*. Through the evaluation of the longevity test, we observed that *Rhamdia quelen* infected and treated with 5 and 10 µL/L of *G. procumbens* essential oil had significantly higher longevity compared with untreated infected control groups or those treated with the vehicle (ethanol). In order to elucidate the increased longevity of the infected animals, further tests were performed on *R. quellen* infected fish treated with 10 µL/L of *G. procumbens* essential oil to evaluate the oxidative stress pathway. The TBARS and ROS tests showed increased MDA and ROS levels in the non-infected control group treated with *G. procumbens*, and increased levels of the enzymes SOD, GPX, and GST, leading us to believe they increased to bring balance against ROS. Our findings suggest another pathway is responsible for the increased longevity of *R. quellen* infected by *G. procumbens*.

Keywords: Longevity. Infection. Fish. Essential oil. Treatment.

Introduction

The global population is currently ~7.5 billion and is projected to reach 9.8 billion by 2050 (United Nations, 2017). Such immense population growth will challenge our ability to provide an adequate supply of safe and nutritious foods. Fish are important for the human diet due to their nutritional properties, providing roughly 15% of their animal protein intake and being a rich source of essential fatty acids, amino acids, vitamins, and minerals (Turker and Yildirim, 2015; Pal et al., 2018). Nonetheless, pressure on aquaculture to supply the fish demand has resulted in an intensive fish production system that can cause environmental stress to fish, increasing the susceptibility to various bacterial pathogens, such as *Aeromonas caviae*.

A. caviae is a gram-negative bacillus that is associated with high mortality rates in fish such as *Clarias gariepinus* (African catfish) and *Clarias* sp. (catfish) (Mulia et al., 2020; Oladele, 2021). Treating these pathologies takes place by using antibiotics at a large scale (sulfonamides potentiated with trimethoprim, ormetoprim, oxytetracycline, florfenicol, and erythromycin) (Serrano, 2005). However, it is estimated that 90% of the bacteria found in seawater are resistant to one antibiotic and 20% to at least five (Fingerman, 2003).

Since antibiotics are stable and non-biodegradable, they can have residual effects on the meat used for consumption (Cabello, 2006). Done and Halden (2015) measured tetracycline, macrolide, and sulfonamide levels in tilapia and salmon and observed the presence of these drugs in the meat of the animals, suggesting a favorable selection mechanism. Wang et al. (2017) corroborated this data by analyzing meat from aquatic animals and detecting the presence of enrofloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, azithromycin, sulfamethazine, and trimethoprim in 52.1% of the samples.

Due to the risk to animals and the environment caused by the exacerbated use of antibiotics, it is necessary to search for alternatives in treating infected fish, including essential oils. Research has shown that using essential oils can effectively control bacterial infections in fish, such as by utilizing *Melaleuca alternifolia* oil in *Rhamdia quelen* infected by *Aeromonas hydrophyla* (Souza et al., 2016). Moreover, recent research has also demonstrated the in vitro efficacy of *Ocimum gratissimum* and *Ocimum americanum* against *A. hydrophyla* and *Gaultheria procumbens* against *A. caviae* (Sutili et al., 2015; Verdi et al., 2020).

Gaultheria procumbens L., known as the eastern teaberry, checkerberry, or wintergreen, is a species belonging to the family Ericaceae, native to North America and cultivated throughout the Northern Hemisphere. It is a small aromatic shrub with perennial leaves and red fruits (Michel et al., 2014, 2017; Liu et al., 2013; Aruna et al., 2014; Apte, 2006). This plant exhibits anti-inflammatory and antimicrobial action, believed to be due to its majority compound, methyl salicylate (Verdi et al., 2020). Methyl salicylate has proven analgesic and

anti-inflammatory action in mammals; Xin and collaborators (2014) observed non-selective COX inhibition in mice with rheumatoid arthritis without damaging gastric mucosa. In addition, this oil has known antioxidant action *in vitro* (Michel et al., 2014; Olszewska et al., 2021).

Oxidative stress is a reversible process redefined as an imbalance between oxidants and antioxidants (Sies, 2018). Nevertheless, when the antioxidant system cannot handle the oxidation rate of cellular components, the irreversible process known as oxidative damage occurs, which is caused by the attack of free radicals (e.g., reactive oxygen species — ROS) (Vinã et al., 2018). To prevent or minimize the production of free radicals such as ROS, organisms activate the antioxidant defense system to limit pro-oxidant activity (Pamplona and Costantini 2011). However, ROS overproduction can also impair the antioxidant defense system through inhibitory effects on various antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione S-transferase (GST), which contribute to the pathophysiology of infectious diseases in fish (Souza et al., 2019).

Given the above, this study sought to evaluate the effects of *G. procumbens* essential oil on *Rhamdia quelen* infected by *A. caviae* and verify the longevity, mortality, and antioxidant activity through the TBARS, GPX, SOD, GST, and ROS tests.

Materials and Methods

4.2.2.1 Fish maintenance and water quality

Healthy fish were purchased for experimental purposes from a fish farm located in southern Brazil. The animals were transported to the Laboratory of Fish Physiology (LAFIPE) of the Federal University of Santa Maria (UFSM) and kept for seven days under acclimatization. Fiberglass tanks (250-L capacity) containing freshwater were subjected to continuous aeration under controlled water variables: temperature 18–20 °C (maintained with air conditioning), pH 7.1–7.3, and dissolved oxygen levels 5.9–7.5 mg/L.

Dissolved oxygen, temperature, total ammonia, and non-ionized ammonia levels were determined as described by Baldissera et al. (2017) and remained stable throughout the experimental period. The animals were fed commercial feed once a day until satiety. Any uneaten food, feces, and other waste were removed daily 1 hour after feeding. The methodologies of the experiments were approved by the Ethical and Animal Welfare Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (Process n°. 7317241120).

4.2.2.2 Preparation of the microbial inoculum

A standard strain of *A. caviae* (ATCC15468) was used to infect the animals. The bacterial inoculum was obtained by growing *A. caviae* in nutrient agar for 24 h at 37 °C. The suspension of *A. caviae* colonies was made in sterile saline solution (0.9% NaCl); the turbidity (OD600) was adjusted to 0.9–1.1 (equivalent to 10⁶ CFU/mL) and used for inoculation into the animals (Baldissera et al., 2017).

4.2.2.3 Experimental design

After approval by the ethics committee for animal use (protocol no. 7317241120), adult *R. quelen* (101 ± 35 g; 30 ± 5 cm) were used as an experimental model to evaluate longevity and mortality (n = 60) and oxidative stress parameters (n = 36). Ethanol was the substance used as a vehicle in the dilution of the essential oil. The animals in the positive control groups were experimentally infected intramuscularly with 100 µL of standardized inoculum according to the protocol established by Baldissera et al. (2017). The negative control group received the same dose of sterile saline.

The longevity and mortality were determined by separating the animals into 10 groups with 6 animals each and evaluating them for 15 days. The treatments were performed listed below (Table 1).

Table 1. Experimental design of animals treated with *G. procumbens* essential oil and untreated.

Negative control	Positive control	Treatment
Not infected	Infected	No
Not infected	Infected	45 µL/L ethanol
Not infected	Infected	90 µL/L ethanol
Not infected	Infected	5 µL/L of <i>G. procumbens</i> essential oil
Not infected	Infected	10 µL/L of <i>G. procumbens</i> essential oil

The oxidative stress parameters were evaluated based on the longevity and mortality evaluation; the animals were divided into 6 groups with 6 animals each (Table 2).

Table 2. Experimental design to analyze the oxidative stress biomarkers.

Negative control	Positive control	Treatment
------------------	------------------	-----------

Not infected	Infected	No
Not infected	Infected	90 μ L/L ethanol
Not infected	Infected	10 μ L/L of <i>G. procumbens</i> essential oil

4.2.2.4 Sample collection and tissue homogenization

In order to evaluate the parameters related to oxidative stress on the fifth day post-infection, all animals were anesthetized with a natural anesthetic (*Cymbopogon flexuosus* essential oil) and euthanized through the medullary section according to the recommendations of the Ethics Committee. The liver, spleen, caudal kidney, and cephalic kidney were removed and kept on ice, weighed, and homogenized in a microtube centrifuge with Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.4), in weight/volume ratio of 1:10. Afterward, they were centrifuged at $2000 \times g$ for 10 min, and aliquots of each supernatant were stored at -20°C until use.

4.2.2.4.1 Total protein content

The protein concentration was determined by the Coomassie Blue method following the method described by Read and Northcote (1981) using bovine serum albumin as standard and absorbance was measured at 595 nm. The protein content was tested by the Bradford method and standardized by the bovine serum albumin method.

4.2.2.4.2 Thiobarbituric acid reactive species

The supernatants were used for the estimation of lipid peroxidation, as established by the production of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and performed by reaction of malondialdehyde (MDA) with 2-thiobarbituric acid, which was optically measured according to Buege and Aust (1978) at 532 nm. The TBARS levels were expressed as nanomol MDA per milligram of protein.

4.2.2.4.3 Glutathione peroxidase activity

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured indirectly by monitoring the NADPH oxidation rate at 340 nm using cumene hydroperoxide (CuOOH) (Wendel, 1981). The enzyme activity was expressed as protein U mg^{-1} .

4.2.2.4 Superoxide dismutase activity

The superoxide dismutase (SOD) activity was determined according to pyrogallol autooxidation, inhibited in the presence of SOD. The variation in optical density was determined kinetically for 2 min at 420 nm at ten-second intervals according to the method described by Beutler (1984). The activity was expressed as protein U mg⁻¹.

4.2.2.4.5 Glutathione s-transferase activity

The glutathione s-transferase (GST) activity was measured according to Mannervik and Guthenberg (1981), with slight modifications. The GST activity was measured by the rate of dinitrophenyl-S-glutathione formation at 340 nm in a medium containing 50 mM potassium phosphate, pH 6.5, 1 mM GSH, and 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene as substrate and tissue supernatants (~0.045 mg of protein). The results were calcified and expressed as U/mg protein

4.2.2.4.6 Reactive oxygen species levels

The ROS levels were determined by the dichlorofluorescein 2',7'-diacetate oxidation method described by LeBel et al. (1992). Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 485 and 538 nm, respectively. A calibration curve was established with 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) (0.1 nM μM) as a standard, and the results were expressed as U DCF/mg protein.

4.2.2.5 Statistical analysis

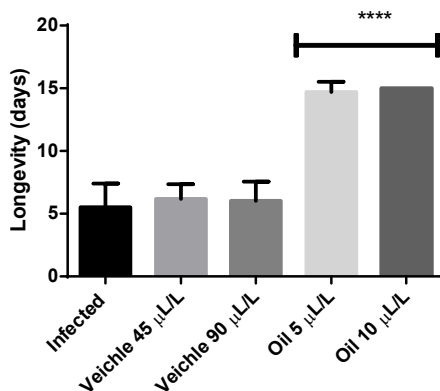
The results were tabulated in Microsoft Excel and expressed as mean ± standard deviation (SD). The statistical analyses were performed in GraphPad Prism 6 with one-way or two-way analysis of variance followed by Tukey's test. Data with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

4.2.3 Results

4.2.3.1 Assessing longevity and mortality

The relationship between treatment, longevity, and mortality of fish infected with *A. caviae* is shown in Figure 1. This test revealed that fish treated with concentrations of 5 and 10 μL of *G. procumbens* essential oil showed increased longevity, surviving until the fifteenth day after infection at the end of the experiment. Meanwhile, fish from the positive infection control showed mortality on average on the fifth day after infection, and fish from the vehicle treatment on the sixth day after infection.

Figure 1. Longevity in days of *R. quellen* infected with *A. caviae*

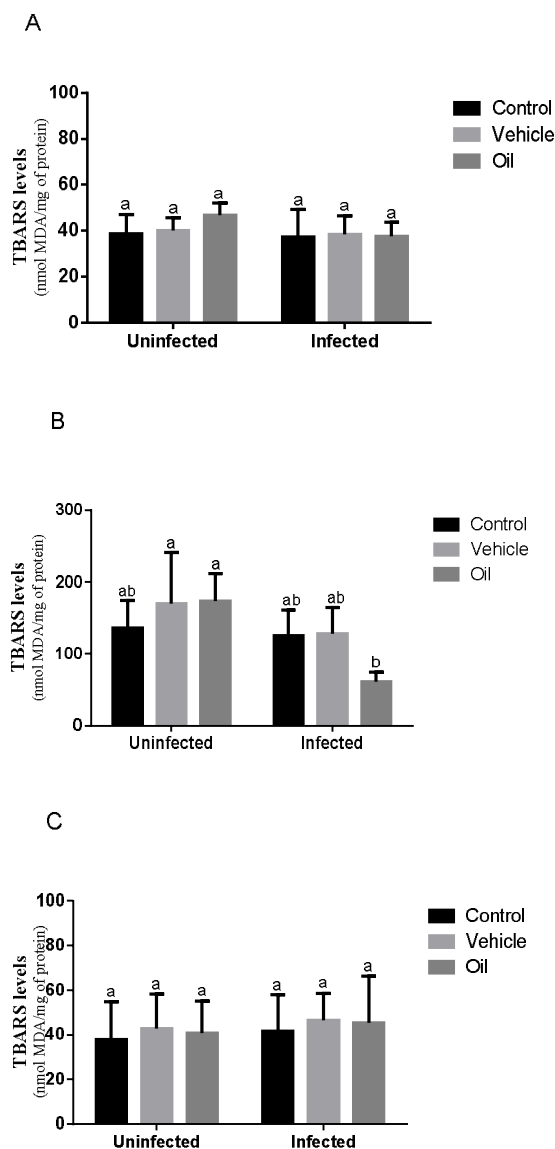


Longevity in days of *R. quellen* infected with *A. caviae* treated with *G. procumbens* essential oil at concentrations of 5 and 10 µL/L. The results indicating **** show a statistically significant difference ($p < 0.0001$).

4.2.3.2 Thiobarbituric acid reactive substances

The TBARS assay revealed decreased MDA levels in infected animals treated with *G. procumbens* essential oil in the spleen analysis (Figure 2B) compared to non-infected animals treated with vehicle or essential oil. In the other organs, the levels had no significant difference compared to the controls.

Figure 2. TBARS evaluation in *R. quelen*

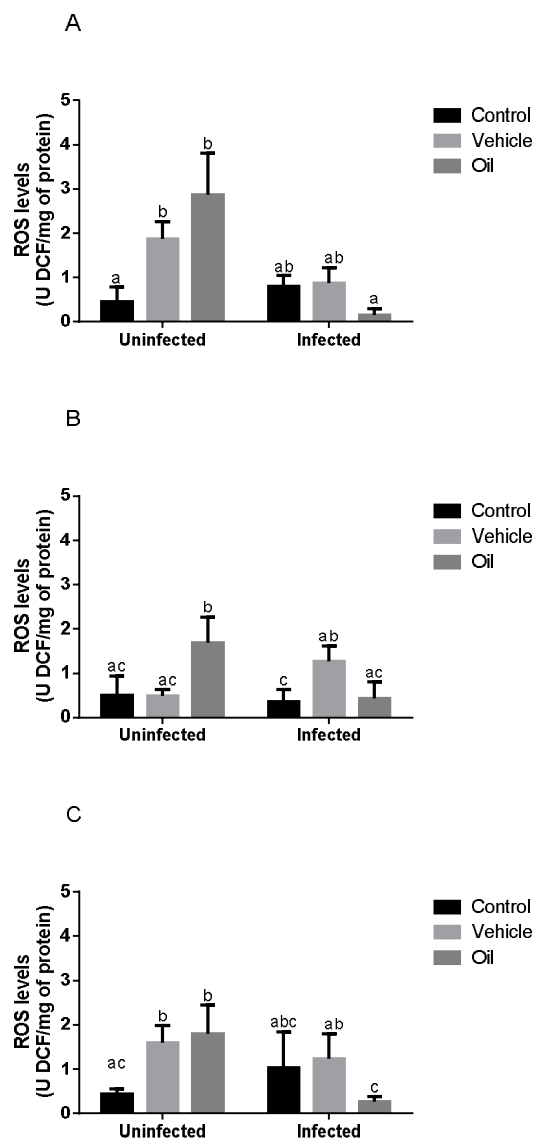


Evaluation of TBARS in fish infected with *A. caviae* treated with 10 μ L/L of *G. procumbens* essential oil. Two-way ANOVA followed by Tukey's test were used to determine the statistical difference ($p < 0.05$; $n = 6$ per group). Levels referring to analyses of A) cephalic kidney, B) spleen, and C) caudal kidney are illustrated.

4.2.3.6 Reactive oxygen species levels

Higher ROS levels lead to cell damage and death. Our findings showed that the *G. procumbens* essential oil significantly decreased the ROS levels in all organs of the infected animals compared to non-infected animals treated with essential oil or the vehicle (Figures 3A and 3C).

Figure 3. Evaluation of ROS in *R. quelen*.

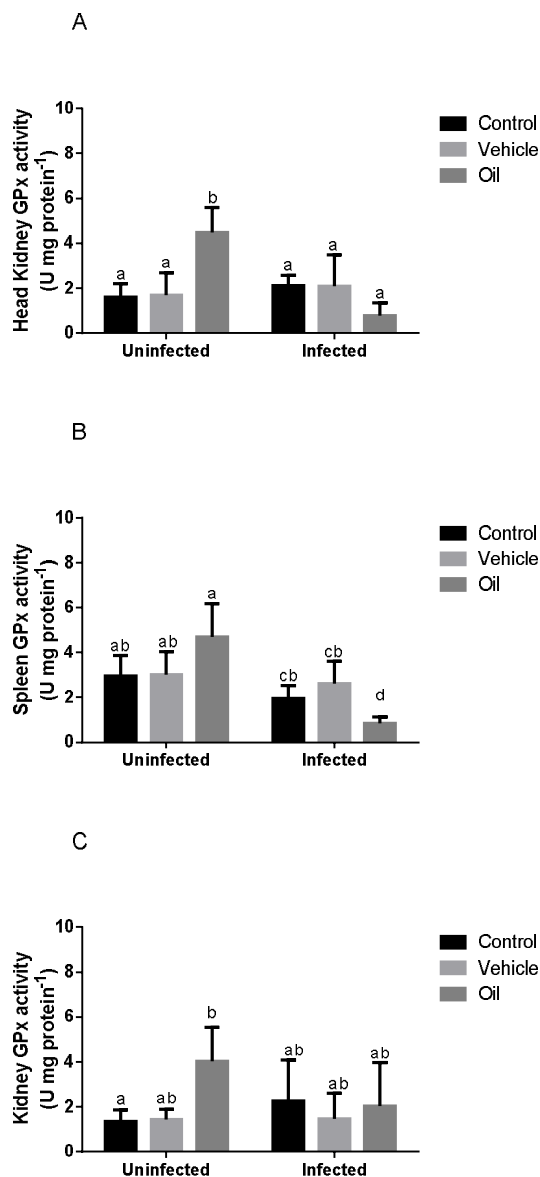


Evaluation of ROS in fish infected with *A. caviae* treated with 10 µL/L of *G. procumbens* essential oil. Two-way ANOVA followed by Tukey's test were used to determine the statistical difference ($p < 0.05$; $n = 6$ per group). Levels referring to analyses of A) cephalic kidney, B) spleen and C) caudal kidney are illustrated.

4.2.3.3 Glutathione peroxidase

The evaluation of the GPx levels is shown below (Figure 4) according to the NADPH oxidation rate. There was a significant decrease in the infected groups treated with essential oil for the organs shown in graphs A and B. Nonetheless, there was an increase in the non-infected groups treated with *G. procumbens* oil (Figures 4A and 4C).

Figure 4. Evaluation of glutathione peroxidase (GPx) enzyme activity in *R. quelen*.

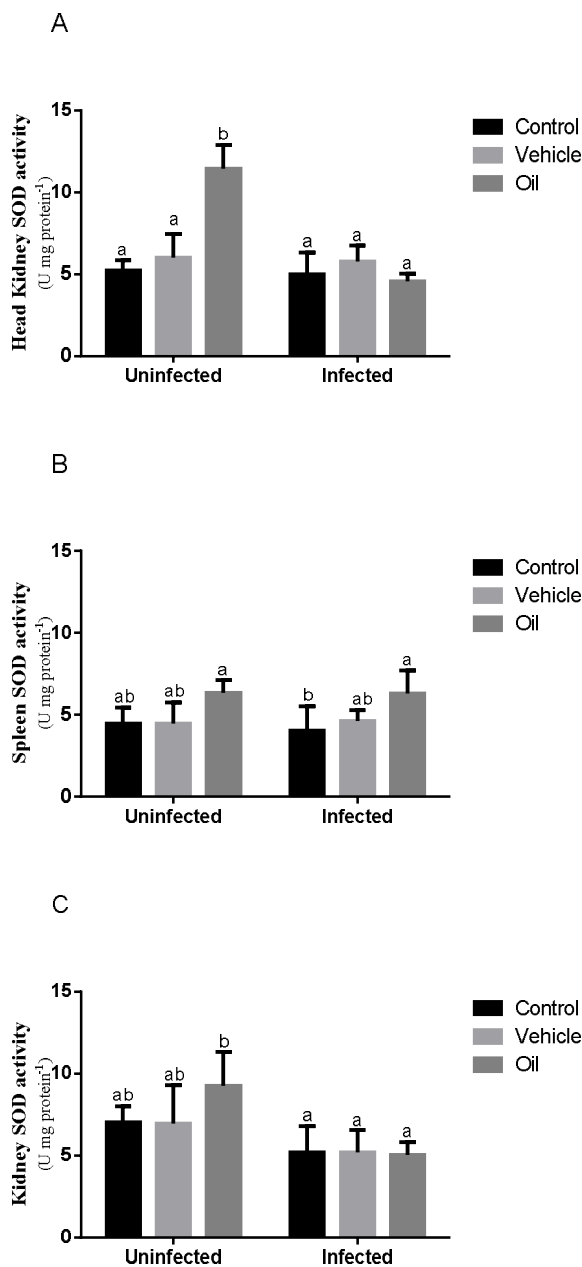


Evaluation of glutathione peroxidase (GPx) enzyme activity in fish infected with *A. caviae* treated with 10 $\mu\text{L/L}$ of *G. procumbens* essential oil. Two-way ANOVA followed by Tukey's test were used to determine the statistical difference ($p < 0.05$; $n = 6$ per group). Levels referring to analyses of A) cephalic kidney, B) spleen, and C) caudal kidney are illustrate/d.

4.2.3.4 Superoxide dismutase

The evaluation of SOD levels is shown in Figure 5. The analysis of the organs cephalic kidney (A) and caudal kidney (C) showed that SOD levels increased when non-infected fish were exposed to the treatment compared to the infected ones. As for the spleen (B), the levels significantly increased when the infected animals were exposed to the treatment compared to the untreated infected ones.

Figure 5. Evaluation of superoxide dismutase (SOD) enzymatic activity in *R. quelen*.

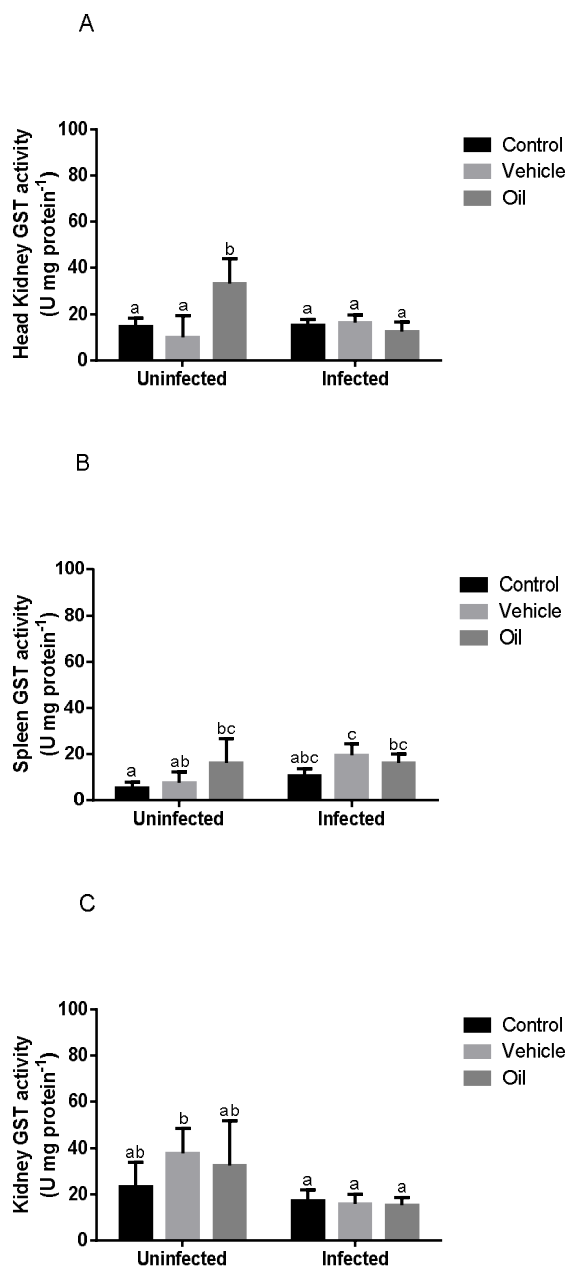


Evaluation of superoxide dismutase (SOD) enzyme activity in fish infected with *A. caviae* treated with 10 $\mu\text{L/L}$ of *G. procumbens* essential oil. Two-way ANOVA followed by Tukey's test were used to determine the statistical difference ($p < 0.05$; $n = 6$ per group). Levels referring to analyses of A) cephalic kidney, B) spleen, and C) caudal kidney are illustrated.

4.2.3.5 Glutathione S-transferase

Plasma levels of GST are illustrated in Figure 5. The analyses revealed higher levels in the caudal kidney and spleen (Figures 5A and 5B) of the uninfected animals treated with the essential oil compared to controls.

Figure 6. Evaluation of glutathione S-transferase (GST) enzymatic activity in *R. quelen*.



Evaluation of glutathione S-transferase (GST) enzyme activity in fish infected with *A. caviae* treated with 10 $\mu\text{L/L}$ of *G. procumbens* essential oil. Two-way ANOVA followed by Tukey's test were used to determine the statistical difference ($p < 0.05$; $n = 6$ per group). Levels referring to analyses of A) cephalic kidney, B) spleen and C) caudal kidney are illustrated.

Discussion

It is of utmost importance that natural treatments be implemented as an alternative for curing infections in fish, maintaining their meat viable for human consumption and preserving

the environment from the action of antimicrobial drugs. In this paper, we described for the first time the action of *G. procumbens* essential oil on the longevity of *Rhamdia quelen* infected with *A. caviae*. We also reported the oxidative stress biomarkers capable of modulating the immune response in relation to essential oil and infection.

Longevity in fish thoroughly impacts the reproduction chain and, consequently, the economy (Longhurst, 2002). *Aeromonas* species negatively impact the aquaculture economy, being one of the main pathogens in the aquatic environment (Valadão et al., 2016; Toranzo et al., 2005). Our study demonstrated a significant increase in the longevity of infected animals treated with 5 and 10 $\mu\text{L/L}$ of *G. procumbens* essential oil. Corroborating our findings, increased longevity of *R. quelen* infected by *Aeromonas* species has already been reported using *Melaleuca* essential oil, demonstrating the susceptibility of *Aeromonas spp.* to essential oils (Souza et al., 2016).

In order to investigate and try to elucidate the increased longevity and consequently decreased mortality of the infected fish, the levels of ROS and TBARS and the enzymes SOD, GPx, and GST were measured, and the animals were treated with 10 $\mu\text{L/L}$ of essential oil, this dosage was selected due to longevity results.

The TBARS test measures MDA, the cytotoxic end-product of lipoperoxidation. Our findings showed a significant decrease in the activity of these enzymes in the spleen when the animals were infected and treated with the essential oil, leading us to believe in the decrease of cytotoxicity using the oil. In the other organs (caudal kidney and cephalic kidney), the oil helped by maintaining these levels. The spleen is an essential organ for immune function in fish and is vital for hematogenesis, antibody production, and defense cells (Long et al., 2021).

Furthermore, ROS are normal physiological conditions formed due to the partial reduction of molecular oxygen. However, the exacerbated increase of ROS is related to possible tissue damage, resulting in oxidative stress, which leads to cell death (Nita and Grzybowski, 2016). In our results, in the groups of non-infected animals treated with the essential oil, it was possible to observe higher ROS levels, which was not observed in the infected animals treated with the essential oil of *G. procumbens*.

In order to prevent or reduce lipid damage induced by excessive ROS production, the body can activate the antioxidant defense system, including SOD and the enzymes GST and GPX, thereby reducing the levels of hidropéroxido lipídico and hydrogen peroxide (Nimse and Pal, 2015), consequently decreasing oxidative damage. In our results, in addition to higher ROS levels, we observed an increase in these enzymes in the non-infected groups treated with the essential oil. This occurs in an attempt to maintain the oxidative system in balance, helping to

decrease ROS. Boaventura et al. (2020) reported higher ROS levels in animals anesthetized with *Ocimum gratissimum* essential oil. Corroborating our findings, Mahboub and Tartor (2020) also reported increased ROS in *Nile tilapia* infected with *Cryptococcus uniguttulatus* treated with carvacrol.

Regarding the infected animals treated with the essential oil, when the antioxidant enzymes SOD and GPX were dosed, a significant difference was observed in the spleen of the infected animals treated with essential oil compared to the untreated infected group. Similarly, this difference is believed to be due to the compensation system to decrease ROS and tissue damage (Blokhina et al., 2003; Poljsak et al., 2013).

Based on our results, it was possible to observe that the *G. procumbens* essential oil at 5 and 10 $\mu\text{L/L}$ could prolong the life of fish infected by *A. caviae*. These results are of the utmost importance, considering environmental preservation and safety in the consumption of animal meat. Nonetheless, the antioxidant system may not be related to the increased longevity of these animals. Several mechanisms may be involved in the death of the animals, for instance, imbalance in the cytokine cascade and inflammatory mechanisms. Thus, future analyses will be carried out to shed more light on the main mechanism of action involved in the increased longevity of fish infected with *A. caviae* treated with *G. procumbens* essential oil.

Acknowledgments

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. We thank the Brazilian agency Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for its support. We would also like to thank Atlas Assessoria Linguística for language editing.

Disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

References

APTE, G. S. Genetic diversity analysis in *Gaultheria fragrantissima* Wall. (Ericaceae) from the two biodiversity hotspots in India using ISSR markers. *Current Science*, [S.I.] Vol. 91, n. 12, p. 134 – 140, 25 dez. 2006.

- ARUNA, P.; et al. Larvicidal, pupicidal and repellent activities of Gaultheria oil (Plantae: Ericaceae) against the filarial vector, *Culex quinquefasciatus* (Insecta: Diptera: Culicidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, [S.I.] Vol. 2, n. 4, p. 290294, 2014.
- BALDISSERA, M. D. et al. Melaleuca alternifolia essential oil prevents alterations to purinergic enzymes and ameliorates the innate immune response in silver catfish infected with *Aeromonas hydrophila*. *Microbial pathogenesis*, v. 109, p. 61-66, 2017.
- BEUTLER E. Superoxide dismutase. In: Beutler E (Editor), *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. Grune & Stratton, Philadelphia, PA, 83-85, 1984.
- BOAVENTURA, Tulio P. et al. Essential oil of *Ocimum gratissimum* (Linnaeus, 1753) as anesthetic for *Lophiosilurus alexandri*: induction, recovery, hematology, biochemistry and oxidative stress. *Aquaculture*, v. 529, p. 735676, 2020.
- BUEGE JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 52:302–309
- CABELLO, Felipe C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.
- FINGERMAN, Milton. *Recent Advances in Marine Biotechnology, Vol. 10: Molecular Genetics of Marine Organisms*. CRC Press, 2003.
- DONE, Hansa Y.; HALDEN, Rolf U. Reconnaissance of 47 antibiotics and associated microbial risks in seafood sold in the United States. *Journal of hazardous materials*, v. 282, p. 10-17, 2015.
- LEBEL, C.P. ISCHIROPOULOS, H., BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.* 5 227–231, 1992.
- LIU, Wei Rui et al. Gaultheria: Phytochemical and pharmacological characteristics. *Molecules*, v. 18, n. 10, p. 12071–12108, 2013.
- LONG, Shuisheng et al. The Effect of Oxidized Fish Oil on the Spleen Index, Antioxidant Activity, Histology and Transcriptome in Juvenile Hybrid Grouper (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*). *Frontiers in Marine Science*, 2021.
- LONGHURST, Alan. Murphy's law revisited: longevity as a factor in recruitment to fish populations. *Fisheries Research*, v. 56, n. 2, p. 125-131, 2002.
- MAHBOUB, Heba H.; TARTOR, Yasmine H. Carvacrol essential oil stimulates growth performance, immune response, and tolerance of Nile tilapia to *Cryptococcus uniguttulatus* infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 141, p. 1-14, 2020.
- MANNERVIK, B., GUTHENBERG, C. Glutathione transferase (human placenta). *Methods Enzymol.* 77, 231–235, 1981.
- MICHEL, Piotr et al. Polyphenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory activity of eastern teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) leaf extracts. *Molecules*, v. 19, n. 12, p. 20498-20520, 2014.
- MICHEL, P., et al. Metabolite Profiling of Eastern Teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) Lipophilic Leaf Extracts with Hyaluronidase and Lipoxygenase Inhibitory Activity. *Molecules*, v. 22, n. 3, p. 412, 2017.
- MULIA, D. S. et al. Molecular characterizations of *Aeromonas caviae* isolated from catfish (*Clarias* sp.). *AACL Bioflux*, v. 13, n. 5, p. 2717-2732, 2020.
- NITA, Małgorzata; GRZYBOWSKI, Andrzej. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2016, 2016.

- OLADELE, O. O. et al. Mortality of *Clarias gariepinus* caused by *Aeromonas caviae* and nitrite toxicity in a fish farm. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, v. 19, n. 2, p. 138-144, 2021.
- OLSZEWSKA, Monika Anna et al. Screening for the active anti-inflammatory and antioxidant polyphenols of *Gaultheria procumbens* and their application for standardisation: from identification through cellular studies to quantitative determination. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 21, p. 11532, 2021.
- PAL, Jag et al. A review on role of fish in human nutrition with special emphasis to essential fatty acid. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, v. 6, n. 2, p. 427-430, 2018.
- READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H.; *Anal. Biochem.* 1981, 116, 53.
- PAMPLONA, Reinald; COSTANTINI, David. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 301, n. 4, p. R843-R863, 2011.
- SERRANO, Pilar Hernández. Responsible use of antibiotics in aquaculture. *Food & Agriculture Org.*, 2005.
- SIES, Helmut. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, v. 7, p. 122-126, 2018.
- SOUZA, Carine F. et al. In vivo bactericidal effect of *Melaleuca alternifolia* essential oil against *Aeromonas hydrophila*: Silver catfish (*Rhamdia quelen*) as an experimental model. *Microbial pathogenesis*, v. 98, p. 82-87, 2016.
- SOUZA, Carine F. et al. Grape pomace flour alleviates *Pseudomonas aeruginosa*-induced hepatic oxidative stress in grass carp by improving antioxidant defense. *Microbial pathogenesis*, v. 129, p. 271-276, 2019.
- SUTILI, F. J. et al. Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: in vitro activity and their use in experimentally infected fish. *Journal of Applied Microbiology*, v. 119, n. 1, p. 47-54, 2015.
- TURKER, Hakan; YILDIRIM, Arzu Birinci. Screening for antibacterial activity of some Turkish plants against fish pathogens: a possible alternative in the treatment of bacterial infections. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 29, n. 2, p. 281-288, 2015.
- UNITED NATIONS, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2017). *World Population Prospects 2017 – Data Booklet (ST/ESA/SER.A/401)*.
- VERDI, Camila Marina et al. Phytochemical characterization, genotoxicity, cytotoxicity, and antimicrobial activity of *Gaultheria procumbens* essential oil. *Natural Product Research*, v. 36, n. 5, p. 1327-1331, 2022.
- VINA, Jose; BORRAS, Consuelo; GOMEZ-CABRERA, Mari Carmen. A free radical theory of frailty. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 124, p. 358-363, 2018.
- WANG, Hexing et al. Antibiotic residues in meat, milk and aquatic products in Shanghai and human exposure assessment. *Food control*, v. 80, p. 217-225, 2017.
- WENDEL A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981; 77:325-33.
- XIN, Wenyu et al. Methyl salicylate lactoside inhibits inflammatory response of fibroblast-like synoviocytes and joint destruction in collagen-induced arthritis in mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 171, n. 14, p. 3526-3538, 2014.

5. DISCUSSÃO

Dada a importância da pesquisa sobre produtos naturais, esse é o primeiro trabalho que relaciona a cito-genotoxicidade com o metabolismo oxidativo *in vitro* e *in vivo*, e a atividade antimicrobiana de diferentes domínios do óleo essencial de *G. procumbens*. Inicialmente, através da técnica de GC-MS/GC-FD, foi identificado no óleo essencial o salicilato de metila como substância bioativa, corroborando com outras pesquisas (MICHEL, et al., 2014; NIKOLIĆ, et al., 2013; GÖGER, et al., 2018; SAEIDI, et al., 2018).

A partir da caracterização, com intuito de elucidar a atividade biológica de *G. procumbens* foram realizados testes antimicrobianos. Os resultados da atividade antimicrobiana são expressivos, já que o óleo foi capaz de inibir micro-organismos. Além disso, como demonstrado na curva de morte, o óleo promoveu a erradicação de *A. caviae* (ATCC15468), *C. albicans* (ATCC14053) e *M. fortuitum* em concentrações de 12,67 mg/mL, 7,29 mg/mL e 14,58 mg/mL respectivamente. A partir de estudos recentes, Do Nascimento, et al., (2018), Hu, et al., (2019) e Elhidar, et al, (2019) demonstraram a suscetibilidade de micobactérias, bactérias e leveduras, frente óleos essenciais de *Psidium guineense* Sw., *Litsea cubeba* e *Senecio anteuphorbium*.

Grande parte de nossos resultados não demonstraram diferença entre a ação do óleo essencial de *G. procumbens* e de sua substância majoritária isolada, o Salicilato de Metila. A eficiente ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser atribuída ao seu caráter lipofílico, que permite uma forte interação com a bicamada fosfolipídica das membranas celulares, acarretando na destruição da membrana, bem como em alterações no citoplasma de bactérias e micobactérias. Por outro lado, supõe-se que, para leveduras a atividade antimicrobiana do óleo ocorra devido à inibição da biossíntese do ergosterol (CHOUHAN; SHARMA,; GULERIA, 2017; SAAD; MULLER; LOBSTEIN, 2013).

Tendo em vista a confirmada atividade biológica frente diferentes micro-organismos, se fez necessária a busca pelos efeitos citotóxicos e genotóxicos, com o objetivo de avaliar possíveis danos em células biomarcadoras de toxicidade: linfócitos e monócitos (ALLEN, 2005). Em relação ao teste de *Picogreen*, verificou-se que a maior concentração do óleo essencial apresentou dano de fita dupla de DNA, porém esta concentração não está dentro da faixa terapêutica que demonstrou ação antimicrobiana, destacando segurança no uso do óleo essencial em moderadas doses. O teste cometa, que avaliou dano na fita simples de DNA, demonstrou dano em diferentes concentrações do óleo essencial, entretanto não causou morte celular. Segundo Kong et al., (2009) o dano encontrado em nossos resultados são considerados

danos leves de toxicidade. O estudo de Celik e Turkez (2016), confirma nossos resultados do ensaio cometa, não demonstrando altos índices de dano celular quando expostas ao óleo essencial de *G. procumbens*.

Outro método utilizado para avaliar a viabilidade celular foi através do teste de MTT, onde todas as concentrações testadas do óleo essencial foram capazes de manter a viabilidade celular, igual ao controle negativo. Nosso estudo está de acordo com Celik e Turkez (2016), em que não foi possível observar alteração na viabilidade de células neuronais de ratos a partir de doses iguais ou acima de 75 mg/L do óleo essencial de *G. procumbens*.

A presença de altos níveis de nitrito sugere indução a resposta inflamatória, assim resultando na oxidação da hemoglobina (CHOI et al., 2012; SAMAD et al., 2014). Uma outra abordagem do nosso estudo realizado com intuito de avaliar dano celular foi o teste de Óxido Nítrico, que tem por objetivo a detecção de nitrito, onde não foi observado aumento dos níveis em nenhuma das concentrações do óleo essencial de *G. procumbens* testadas. Corroborando com nosso estudo, Samad e colaboradores (2014), demonstraram que outra planta da família Ericaceae também foi capaz de manter os níveis de nitrito baixos.

Para avaliar a produção de EROS, realizou-se o teste de Diclorofluoresceína e o teste de níveis reativos de oxigênio. O aumento das EROS resulta no estresse oxidativo, o que acarreta dano celular e conseqüentemente na morte da célula (GILL; TUTEJA, 2010; WANG et al., 2011). Os resultados obtidos no teste de diclorofluoresceína demonstraram que o óleo essencial de *G. procumbens* não foi capaz de induzir o aumento de EROS, mantendo a viabilidade celular. Em relação ao teste realizado com órgãos de peixes, os resultados confirmaram a ação antioxidante, tendo em vista a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio quando os animais infectados foram tratados com o óleo essencial de *G. procumbens*. Outros estudos demonstraram resultados semelhantes em relação a atividade antioxidante de plantas da família Ericaceae (MARTINS et al., 2013; MICHEL et al., 2014)

É de suma importância que tratamentos naturais sejam implantados como alternativa para cura de infecções em humanos assim como em animais. Em peixes, por exemplo, produtos naturais surgem como alternativa para manter a carne do animal viável para consumo humano e preservar o meio ambiente da ação dos fármacos antimicrobianos. Nesta tese, descrevemos pela primeira vez a ação do óleo essencial de *G. procumbens* sobre a longevidade de *Rhamdia quelen* infectados com *A. caviae*. Também relatamos análises de biomarcadores de estresse oxidativo capazes de modular resposta imunológica em relação ao óleo essencial e a infecção.

Longevidade em peixes impacta profundamente a cadeia de reprodução e conseqüentemente a economia (LONGHURST, A. 2002). As espécies de *Aeromonas* impactam

negativamente a economia da aquicultura, sendo um dos principais patógenos do ambiente aquático (TORANZO, et al., 2005). Nosso estudo demonstrou um aumento significativo na longevidade dos animais infectados tratados com 5 µL/L e 10 µL/L de óleo essencial de *G. procumbens*. Corroborando com nosso estudo, o aumento da longevidade de *R. quelen* infectados por espécie de *Aeromonas*, já foi relatado utilizando óleo essencial de *Melaleuca* como tratamento, o que demonstra susceptibilidade de *Aeromonas* spp. a óleos essenciais (SOUZA et. al., 2016).

Para investigar e tentar elucidar o aumento da longevidade e consequentemente diminuição da mortalidade dos peixes infectados, os níveis de EROS e TBARS e as enzimas SOD, GPx e GST foram dosadas, onde os animais foram tratados com 10 µL/L de óleo essencial, essa dosagem foi selecionada devido resultados da longevidade.

O teste de TBARS realiza a mensuração de MDA, produto citotóxico final da lipoperoxidação. A partir das análises, nossos resultados demonstraram uma diminuição significativa na atividade dessas enzimas pelo baço, quando os animais estavam infectados e tratados com o óleo essencial, isso nos leva a crer na diminuição da citotoxicidade utilizando o óleo. Nos outros órgãos (rim caudal e rim cefálico) o óleo auxiliou mantendo esses níveis. O baço é um órgão importante para a função imune dos peixes, além de ser importante para hematogênese, produção de anticorpos e células de defesa (LONG et. al., 2021).

As espécies reativas do oxigênio (EROS) são condições fisiológicas normais formadas devido à redução parcial do oxigênio molecular. No entanto, o aumento exacerbado das EROS está relacionado a um possível dano tecidual, o que resulta no estresse oxidativo o que acarreta em morte celular (NITA; GRZYBOWSKI, 2016). Em nossos resultados, nos grupos de animais não infectados tratados com o óleo essencial foi possível observar aumento das EROS, o que não foi observado nos animais infectados tratados com o óleo essencial de *G. procumbens*.

Para evitar ou reduzir os danos aos lipídios induzidos pela produção excessiva de EROS, o organismo pode ativar o sistema de defesa antioxidante, incluindo SOD e as enzimas do metabolismo da glutatona (GST e GPX), reduzindo assim os níveis de hidroperóxido lipídico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NIMSE E PAL, 2015), e consequentemente diminuindo prevenindo dano oxidativo. Em nossos resultados além do aumento das EROS, observamos o aumento dessas enzimas nos grupos não infectados tratados com o óleo essencial, isso ocorre na tentativa de manter o sistema oxidativo em equilíbrio, auxiliando na tentativa de diminuição os EROS. O estudo de Boaventura e colaboradores (2020), relatou o aumento de EROS em animais anestesiados com óleo essencial de *Ocimum gratissimum*. Corroborando com nosso

estudo Mahboub, H e Tartor, Y (2020) também relataram aumento de EROS em *Nile tilapia* infectadas por *Cryptococcus uniguttulatus* tratadas com carvacrol.

Em relação aos animais infectados tratados com o óleo essencial, quando dosadas enzimas antioxidantes SOD e GPX, foi observada diferença significativa no baço dos animais infectados tratados com óleo essencial quando comparados com o grupo infectado não tratado. Da mesma forma, acredita-se que essa diferença se dá devido ao sistema de compensação, a fim de diminuir as EROS e conseqüentemente o dano aos tecidos (BLOKHINA et. al., 2003; POLJSKAK et. al., 2013).

Com base nos nossos resultados foi possível observar que o óleo essencial de *G. procumbens* nas concentrações de 5 µL/L e 10 µL/L foram capazes de prolongar a vida de peixes infectados por *A. caviae*. Esses resultados são de suma importância, levando em consideração a preservação ambiental e a segurança no consumo da carne do animal. Contudo, o sistema antioxidante pode não estar relacionado com o aumento da longevidade desses animais. Diversos mecanismos podem estar envolvidos na morte dos animais, como por exemplo, desequilíbrio na cascata de citocinas pró- inflamatórias e anti-inflamatórias, no caso as interleucinas. Além disso o óleo essencial pode agir e ser eficaz como tratamento preventivo para essas infecções.

5.1. CONCLUSÃO

Diante os objetivos apresentados nesta tese e considerando os resultados experimentais obtidos, conclui-se que o óleo essencial de *G. procumbens* apresenta através da análise fotoquímica como composto majoritário o Salicilato de Metila. Tanto o óleo essencial de *G. procumbens* quanto o Salicilato de Metila apresentam ação antimicrobiana (que não diferenciam entre si). A ação antimicrobiana do óleo essencial, apresenta níveis seguros de uso, não apresentando toxicidade para PBMCs nas concentrações eficazes frente os microrganismos.

Em relação ao estudo *in vivo*, os peixes infectados por *A. caviae* apresentaram longevidade significativamente aumentada quando tratados pelo óleo essencial de *G. procumbens* nas concentrações de 5 ul/L e 10 ul/L. A ação antioxidante do óleo essencial de *G. procumbens* não foi a responsável por manter a viabilidade dos animais, entretanto novas pesquisas investigando outras vias podem ser realizadas.

Ressalto ao concluir esse trabalho que os resultados são de suma importância para o grupo de pesquisa e que diversos trabalhos podem ser desenvolvidos a partir desses resultados.

REFERÊNCIAS

- ABI-SAID, D et al. The Epidemiology of Hematogenous Candidiasis Caused by Different Candida Species. **Clinical Infectious Diseases**, [S.l: s.n.], 1997.
- ADAMS, J. Microbial evolution in laboratory environments. **Research in Microbiology**, [S.l: s.n.], 2004.
- AGITA, A.; THAHA, M. Inflammation, Immunity, and Hypertension. **Acta. Med. Indones.**, v. 49, n. 2, p. 158–165, 2017.
- ALLEN, D. D. et al. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 31, n. 8, p. 757-768, 2005.
- APTE, G. S. Genetic diversity analysis in *Gaultheria fragrantissima* Wall. (Ericaceae) from the two biodiversity hotspots in India using ISSR markers. **Current Science**, [S.I.] Vol. 91, n. 12, p. 134 – 140, 25 dez. 2006.
- ARUNA, P.; et al. Larvicidal, pupicidal and repellent activities of *Gaultheria* oil (Plantae: Ericaceae) against the filarial vector, *Culex quinquefasciatus* (Insecta: Diptera: Culicidae). **Journal of Entomology and Zoology Studies**, [S.I.] Vol. 2, n. 4, p. 290294, 2014.
- BALDISSERA, M. D. et al. Melaleuca alternifolia essential oil prevents alterations to purinergic enzymes and ameliorates the innate immune response in silver catfish infected with *Aeromonas hydrophila*. **Microbial pathogenesis**, v. 109, p. 61-66, 2017.
- BALKIS, M. et al. Mechanisms of Fungal Resistance. **Drugs**, v. 62, n. 7, p. 1025–1040, 2002.
- BANTAWA, P. et al. Detection of natural genetic diversity of *Gaultheria fragrantissima* landraces by RAPDs: An endangered woody oil bearing plant of Indo-China Himalayas. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 294–300, 2011.
- BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. D. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., & BRESSAN, J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, 23, 629-643.
- BEUTLER, E. Superoxide dismutase. In: **Beutler E (Editor), Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods**. Grune & Stratton, Philadelphia, PA, 83-85, 1984.
- BLOKHINA, O; VIROLAINEN, E; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of botany**, v. 91, n. 2, p. 179-194, 2003.
- BONNEDAHL, J., DROBNI, M., GAUTHIER-CLERC, M., HERNANDEZ, J., GRANHOLM, S., KAYSER, Y., ... & OLSEN, B. (2009). Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. **PloS one**, 4(6), e5958.

BRITES, D.; GAGNEUX, S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. **Immunological Reviews**, [S.l: s.n.] 2015.

BUEGE, J. A.; AUST, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. **Method Enzymol** 52:302–309

CABELLO, Felipe C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.

CELIK, K.; TURKEZ, H. Investigation of In Vitro Cytotoxicity and Genotoxicity of Wintergreen Oil in Rat Primary Neurons and N2a Neuroblastoma Cells. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 19, n. 6, p. 1340-1350, 2016.

CEPAS, V. et al. Relationship between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, 2019.

CHAIX, G., et al. Distinct *Aeromonas* populations in water column and associated with copepods from estuarine environment (Seine, France). **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

CHOI, W. et al. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophage cells. **Cellular immunology**, v. 280, n. 2, p. 164-170, 2012.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017.

COHEN, M. L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**. [S.l: s.n.] , 2000

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**. [S.l: s.n.] , 1998

CORRÊA P. M. et al. Cryptococcosis in the Amazon: A current overview and future perspectives. **Acta Tropica**, v. 197, n. May, p. 105023, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.014>>.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DAGHRIR, R.; DROGUI, P. Tetracycline antibiotics in the environment: A review. **Environmental Chemistry Letters**. [S.l: s.n.] , 2013

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2010.

DI, Y.; CHEN, X. Visual outcomes of post-cataract endophthalmitis caused by *Mycobacterium fortuitum*. **Infection and Drug Resistance**, [S.l: s.n.] . 2019.

DJILANI, A.; DICKO, A. The Therapeutic Benefits of Essential Oils. **Nutrition, well-being and health**, v. 7, p. 155-179, 2012.

DO NASCIMENTO, K. F. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **Journal of ethnopharmacology**, v. 210, p. 351-358, 2018.

DONE, Hansa Y.; HALDEN, Rolf U. Reconnaissance of 47 antibiotics and associated microbial risks in seafood sold in the United States. **Journal of hazardous materials**, v. 282, p. 10-17, 2015.

DOS SANTOS, R. P. Caracterização molecular, virulência e suscetibilidade ao fluconazol de espécies ambientais de *Cryptococcus*, antes e após inoculação em modelo murino. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DOVNIK, A. et al. Treatment of vulvovaginal candidiasis: A review of the literature. **Acta Dermatovenerologica Alpina**, Pannonica et Adriatica, [S.l: s.n.] 2015.

ELHIDAR, N. et al. Chemical composition, antimicrobial activities and synergistic effects of essential oil from *Senecio anteuphorbium*, a Moroccan endemic plant. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 310-315, 2019.

FEITOR, M.C. **Efeito Antibacteriano de Tecidos Têxteis Revestidos por Prata Através da Técnica de Deposição por Plasma**. 2010. 116 p. Tese de Doutorado, (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) -Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2010.

FICK, J. et al. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S.l: s.n.]2009.

FINGERMAN, Milton. Recent Advances in Marine Biotechnology, Vol. 10: Molecular Genetics of Marine Organisms. **CRC Press**, 2003.

FRANCO, R.M. **Escherichia Coli: Ocorrência Em Suínos Abatidos Na Grande Rio E Sua Viabilidade Experimental Em Linguiça Frescal Tipo Toscana**. 2002. 153 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2002.

GEST, H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. Notes and Records of the Royal Society. [S.l: s.n.], 2004

GHANNOUM, M. A; RICE, L. B. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. [S.l: s.n.], 1999

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

Gilliver, M. A., Bennett, M., Begon, M., Hazel, S. M., & Hart, C. A. (1999). **Antibiotic resistance found in wild rodents**. Nature, 401(6750), 233-234.

GÖGER, G. et al. Antimicrobial and toxicity profiles evaluation of the chamomile (*Matricaria recutita* L.) essential oil combination with standard antimicrobial agents. **Industrial Crops and Products**, v. 120, p. 279-285, 2018.

GOODMAN, L. S. et al. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill, 1996.

GONÇALVES PESSOA, R. B. et al. The genus *Aeromonas*: A general approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 81–94, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.036>>.

GUARRO, J.; XAVIER, M. O.; SEVERO, L. C. **Differences and Similarities Amongst Pathogenic Aspergillus Species**. *Aspergillosis: From diagnosis to prevention*. 1. ed. New York: Springer, 2010. Cap. PART I, p. 7-32.

HAMID, A. A.; AIYELAAGBE, O.; USMAN, L. A. **Essential oils : Its medicinal and pharmacological uses**. [S.l: s.n.], 2011.

HAYASHI, M. A. et al. Antimicrobial compounds from natural sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. jul, p. 3389, 2013.

HAZEN, K. C. **New and Emerging Yeast Pathogens**. v. 8, n. 4, p. 462–478, 1995.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; WARN, P. A.; BOWYER, P.; DENNING, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, 153:1677-1692, 2007.

HEITMAN, J. et al. *Cryptococcus*: from human pathogen to model yeast. **ASM press**, [S.l: s.n.] 2010.

HINRICHSEN, S. L. *Biossegurança e controle de infecções: risco sanitário hospitalar*. In: **Biossegurança e controle de infecções: risco sanitário hospitalar**. [S.l: s.n.] 2004

HU, W. et al. Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 34-41, 2019.

HUSSEIN, S.; BRASEL, JEFFREY M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

JESUS, R. S. **Avaliação da Formação de Biofilme em Fungos Emergentes e Sua Susceptibilidade A Antifungicos na Forma Livre e Nanoencapsulada**. 2012. 117 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2013.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia Coli*. **Nature Reviews Microbiology**, [S.I. s.n] Vol. 2, p. 123-140, fev. 2004.

KAVANAUGH, N. L.; RIBBECK, K. Selected Antimicrobial Essential Oils Eradicate *Pseudomonas* spp. And *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.I.] n. 11, Vol. 78, p. 4057–4061, Jun. 2012.

KHAMENEH, B. et al. Review on plant antimicrobials : a mechanistic viewpoint. v. 6, 2019.

- KINRYS, G. et al. Medication disposal practices: Increasing patient and clinician education on safe methods. **Journal of International Medical Research**. [S.l: s.n.], 2018
- KOJIC, E. M; DAROUICHE, R. O. Candida Infections of Medical Devices. **Clinical Microbiology Reviews**. [S.l: s.n.], 2004
- KONG, N. et al. Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells in vitro. **Dental materials**, v. 25, n. 11, p. 1371-1375, 2009.
- KRETH, J.; MERRITT, J.; QI, F. Bacterial and host interactions of oral streptococci. **DNA and cell biology**, v. 28, n. 8, p. 397-403, 2009.
- KRONSTAD, J. W. et al. Expanding fungal pathogenesis: Cryptococcus breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 193–203, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2522>>.
- KUJUR, A. K., S., DUBEY, N. K., & PRAKASH, B. (2017). Microencapsulation of *Gaultheria procumbens* essential oil using chitosan-cinnamic acid microgel: Improvement of antimicrobial activity, stability and mode of action. **LWT**, 86, 132-138.
- KÜMMERER, Klaus. Resistance in the environment. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 311-320, 2004.
- LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, **Chem. Res. Toxicol.** 5 227–231, 1992.
- LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. McGraw Hill Brasil, [S.l: s.n.] 2016.
- LEWIS, K. New approaches to antimicrobial discovery. **Biochemical Pharmacology**. [S.l: s.n.], 2017.
- LI, Z; LU, G; MENG, G. Pathogenic Fungal Infection in the Lung. **Frontiers in immunology**, v. 10, n. July, p. 1524, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01524/full>>.
- LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annual Review of Microbiology**, [S.l: s.n.], 2006.
- LIU, W. R. et al. *Gaultheria*: Phytochemical and pharmacological characteristics. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12071–12108, 2013.
- LONG, Shuisheng et al. The Effect of Oxidized Fish Oil on the Spleen Index, Antioxidant Activity, Histology and Transcriptome in Juvenile Hybrid Grouper (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*). **Frontiers in Marine Science**, 2021.
- LONGHURST, Alan. Murphy's law revisited: longevity as a factor in recruitment to fish populations. **Fisheries Research**, v. 56, n. 2, p. 125-131, 2002.

- LUEPKE, K. H. et al. Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. **Pharmacotherapy**, [S.l: s.n.] 2017.
- MAHBOUB, Heba H.; TARTOR, Yasmine H. Carvacrol essential oil stimulates growth performance, immune response, and tolerance of Nile tilapia to *Cryptococcus uniguttulatus* infection. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 141, p. 1-14, 2020.
- MANNERVIK, B.; GUTHENBERG, C. Glutathione transferase (human placenta). **Methods Enzymol.** 77, 231–235, 1981.
- MARR, K, A.; CARTER, R. A.; CRIPPA, F.; WALD, A.; COREY, L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Clin. Infect. Dis.**, 34:909-917, 2002.
- MARTIN, M. A. et al. Chemical characterization and chemo-protective activity of cranberry phenolic powders in a model cell culture. Response of the antioxidant defenses and regulation of signaling pathways. **Food research international**, v. 71, p. 68-82, 2015.
- MARTINS, M. et al. A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps. **The Open Microbiology Journal**, [S.l: s.n.], 2013.
- MAVOR, A.; THEWES, S.; HUBE, B. Systemic Fungal Infections Caused by *Candida* Species: Epidemiology, Infection Process and Virulence Attributes. **Current Drug Targets**, [S.l: s.n.] 2005.
- MICHEL, P. et al. Polyphenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory activity of eastern teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) leaf extracts. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20498–20520, 2014.
- MICHEL, P., et al. Metabolite Profiling of Eastern Teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) Lipophilic Leaf Extracts with Hyaluronidase and Lipooxygenase Inhibitory Activity. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 412, 2017.
- MIDDLETON, D. J. Infrageneric classification of the genus *Gaultheria* L. (Ericaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 106, n. 3, p. 229–258, 1991.
- MIMICA, M. J.; MENDES, Caio M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 399–406, 2007.
- MIRICK, S.y; QUINN, J. A. Some observations on the reproductive biology of *Gaultheria procumbens* (Ericaceae). **American Journal of Botany**, v. 68, n. 10, p. 1298–1305, 1981. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2442728>>.
- MOHAPATRA, S.; DOULAH. A.; BROWN, E. Pneumococcal meningitis and endocarditis in an infant: possible improved survival with factor V Leiden mutation. **Europ Journal Pediatr.** Published online, 12 aug, 2017.

- MURRAY, R. A. et al colab. *Mycobacterium leprae* Inhibits Dendritic Cell Activation and Maturation . *The Journal of Immunology*, 2007.
- NESSAR, R. et al. *Mycobacterium abscessus*: A new antibiotic nightmare. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2012.
- NIKOLIĆ, M. et al. Chemical composition and biological activity of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 561–567, 2013.
- NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 27986-28006. 2015.
- NISENGARD, R. J. et al. **Microbiologia oral e imunologia**. Guanabara Koogan, 1997.
- NITA, M.; GRZYBOWSKI, A. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.
- OLOYEDE, G. K. Toxicidade, atividade antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais dominados por salicilato de metila de *Laportea aestuans* (Gaud). **Arabian Journal of Chemistry** , v. 9, p. S840-S845, 2016.
- O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Review on Antimicrobial Resistance**, n. December, p. 1–16, 2014.
- PARK, S. J.; MEHRAD, B. Innate immunity to *Aspergillus* species. **Clin. Microbiol. Rev.**, 22:535-551, 2009.
- PASCHOAL, M. A. B.; **Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por curcumina sobre *Streptococcus Mutans***. 2013. 114p. Tese de Doutorado (Doutorado em Odontopediatria) – Universidade Paulista, Araraquara, SP, 2013.
- PASQUALOTTO, C. A. *Aspergillosis: From diagnosis to prevention*. **New York: Springer**, 2010. 3-5 p.
- PAREEK, S. et al. **Antibiotics in the Environment : A Review**. v. 4, n. 11, p. 278–285, 2015.
- PEIXOTO, L. J. S. et al. *Aeromonas spp.*: Fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 3, p. 453-461, 2012.
- PEREIRA, S. M. S. G. ***Pseudomonas aeruginosa* em ambiente termal: prevalência e determinantes de patogenicidade**. 2014. 218 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2014.
- POETA, Patrícia et al. Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. **Journal of basic microbiology**, v. 49, n. 6, p. 584-588, 2009.

POLJSAK, B; ŠUPUT, D; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

PROBST, I. S. **Atividade Antibacteriana De Óleos Essenciais E Avaliação De Potencial Sinérgico**. 2012. 102 p. Dissertação do Mestrado (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2012.

RADHOUANI, H. et al. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment, and human health. **Frontiers in Microbiology**. [S.l: s.n.], 2014

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H.; ANAL, B. **1981, 116, 53**.

RIBNICKY, David M.; POULEV, Alexander; RASKIN, Ilya. The determination of salicylates in *Gaultheria procumbens* for use as a natural aspirin alternative. **Journal of nutraceuticals, functional & medical foods**, v. 4, n. 1, p. 39-52, 2003.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.

SAAD, N. Y.; MULLER, C. D.; LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and fragrance journal**, v. 28, n. 5, p. 269-279, 2013.

SAEIDI, K. et al. Chemical characterization of the essential oil compositions and antioxidant activity from Iranian populations of *Achillea wilhelmsii* K. Koch. **Industrial crops and products**, v. 112, p. 274-280, 2018.

SALEEM, M. **Natural Products as Antimicrobial Agents-an Update**. N Edited by David A. Phoenix, Frederick Harris, and Sarah R. Dennison, [S.l: s.n.]. 2015.

SALOMÃO, R. **Infectologia: Bases clínicas e tratamento** - 1. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

SAMAD, N. B. et al. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of Korean blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 10, p. 807-815, 2014.

SCHUENCK, R. P. *Staphylococcus Aureus* Isolados De Próteses Articulares E Outras Infecções: Diversidade Genotípica E Aspectos Relacionados À Resistência E Virulência. 2009. 132 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2009.

SEGAL, E.; BAUM, G. L. Pathogenic yeasts and yeast infections. **CRC Press**, [S.l: s.n.], 1994.

SILVEIRA, Juliana Grell Fernandes. **Avaliação da eliminação de resíduos de verde de malaquita em pescados empregando LC-MS/MS**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SOUZA, Carine F. et al. In vivo bactericidal effect of Melaleuca alternifolia essential oil against Aeromonas hydrophila: Silver catfish (Rhamdia quelen) as an experimental model. **Microbial pathogenesis**, v. 98, p. 82-87, 2016.

SOUZA, C. et al. Essential Oils As Stress-Reducing Agents For Fish Aquaculture: A Review. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 785, 2019.

STEINBACH, W. J.; PERFECT, J. R.; SCHELL, W. A.; WALSH, T. J. & BENJAMIN, D. K.; JR. *In vitro* analyses, animal models, and 60 clinical cases of invasive Aspergillus terreus inf

STOODLEY, H. L.; LAPPIN, H. S. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. **FEMS Microbiology Letters**, [S.l: s.n.]. 1998.

SUTILI, F. J. et al. Plant essential oils against Aeromonas hydrophila: in vitro activity and their use in experimentally infected fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 47-54, 2015.

TORANZO A. E, MAGARIÑOS B, ROMALDE J. L. (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture** 246:37–61

TSANG, C. C. et al. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. [S.l: s.n.]. , 2018

VERNER-JEFFREYS, D. W., WELCH, T. J., SCHWARZ, T., POND, M. J., WOODWARD, M. J., HAIG, S. J., ... & BAKER-AUSTIN, C. (2009). **High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water**. PloS one, 4(12), e8388.

WALL, G et al. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 1–6, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.04.001>>.

WALSH, T. R.; WU, Y. China bans colistin as a feed additive for animals. **The Lancet Infectious Diseases**. [S.l: s.n.]. , 2016

WANG, D. et al. Pu-erh black tea supplementation decreases quinocetone-induced ROS generation and oxidative DNA damage in Balb/c mice. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 2, p. 477-484, 2011.

WANG, Hexing et al. Antibiotic residues in meat, milk and aquatic products in Shanghai and human exposure assessment. **Food control**, v. 80, p. 217-225, 2017.

WAWRYSIUK. et al. Prevention and treatment of uncomplicated lower urinary tract infections in the era of increasing antimicrobial resistance—non-antibiotic approaches: a systemic review. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, n. 0123456789, 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00404-019-05256-z>>.

WHO. **Containing antimicrobial resistance**. World Health Organization Geneva, v. 10, p. 1–6, 2005.

WOOLHOUSE, M. FARRAR, J. Policy: An intergovernmental panel on antimicrobial resistance. **Nature**, 2014.

YADAV, R. N. S.; AGARWALA, M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. **Journal of phytology**, v. 3, n. 12, p. 10–14, 2011.

YOSHIKAWA, T. T. Antimicrobial Resistance and Aging: Beginning of the End of the Antibiotic Era? **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 50, p. 226–229, 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1532-5415.50.7s.2.x>>.

ZHANG, X. X. et al. Antibiotic resistance genes in water environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**. [S.l: s.n.], 2009

ZHONG, W. et al. Pyruvate Kinase Regulates the Pentose-Phosphate Pathway in Response to Hypoxia in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Molecular Biology**, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002228361930484X>>.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO CEP- UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGUE PERIFÉRICO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da cito-genotoxicidade de compostos na sua forma livre e nanoestruturada em células mononucleadas de sangue periférico

Pesquisador: Michele Rorato Sagrillo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 3

CAAE: 31211214.4.0000.5306

Instituição Proponente: Centro Universitário Franciscano - UNIFRA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.591.719

Apresentação do Projeto:

As Células Mononucleadas de Sangue Periférico (CMSP) têm sido aplicadas por décadas como biomarcadoras de efeitos cito e genotóxicos, entre outros. Por serem abundantes na circulação sanguínea, são expostas a qualquer agente mutagênico e são capazes de refletir danos recentes. As CMSP semeadas em cultura tornaram-se o modelo *in vitro* bastante promissor para diversos estudos, o que ressalta a utilidade desta linhagem

celular em estudos de cito-genotoxicidade. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa é avaliar os potenciais efeitos cito-genotóxicos dos sistemas Nanoestruturados em cultura de células mononucleadas de sangue periférico, através da viabilidade celular, peroxidação lipídica, presença de instabilidades cromossômicas, índice mitótico e alterações metanucleares.

A metodologia proposta para a realização das avaliações de cito-genotoxicidade será viabilidade celular, pela técnica do MTT, peroxidação lipídica (TBARS), catalase, presença de instabilidades cromossômicas, índice mitótico e alterações metanucleares, hemólise e indicadores de estresse oxidativo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Neste contexto, o objetivo deste estudo é avaliar os potenciais efeitos cito-genotóxicos de

Endereço: R. dos Andrada, 1614 - Prédio da Retoria - Campus I - 5ª andar
 Bairro: Centro CEP: 97.010-032
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-1200 Fax: (55)3222-6484 E-mail: cep@unifra.br

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO NATURAL PRODUCT RESEARCH PARA ANEXO DE ARTIGO PUBLICADO

← RE: gnpl20:Phytochemical characterization, genotoxicity, cytotoxicity, and antimicrobial activity of *Gautheria procumbens* essential oil

 Traduzir a mensagem para: Português (Brasil) | Nunca traduzir do: Inglês

JP

Journal Permissions <JournalPermissions@tandf.co.uk>

Para: Você

← ↶ ↷ ...

Qui, 08/09/2022 04:49

Dear Camila Marina Verdi,

Thank you for your correspondence requesting permission to reproduce the above content from our Journal in your thesis to be posted on your University's repository.

We will be pleased to grant permission to reproduce your '**Accepted/Original Manuscript**' (please check the embargo: [Open access cost finder - Author Services \(taylorandfrancis.com\)](https://openaccess.tandfonline.com/openaccesscostfinder), on the sole condition that you acknowledge the original source of publication.

This is an '**Accepted/Original Manuscript**' of an article published by Taylor & Francis Group in [JOURNAL TITLE] on [DATE], available online: [https://www.tandfonline.com/\[Article DOI\]](https://www.tandfonline.com/[Article DOI])."

This permission does not cover any third party copyrighted work which may appear in the material requested. Please ensure you have checked all original source details for the rights holder.

Further permission will be required if your thesis is published. (Please see information for sharing your work <https://authorservices.taylorandfrancis.com/sharing-your-work/>)

Thank you for your interest in our Journal.

Best wishes

Sue


Susan McCarthy | Permissions Administrator

Journals, Taylor & Francis Group

Permissions e-mail: permissionrequest@tandf.co.uk

Web: www.tandfonline.com

 4 Park Square, Milton Park, Abingdon, OX14 4RN

 +44 (0) 20 80522792

 susan.mccarthy@tandf.co.uk

Disclaimer: T&F publish Open Access articles in our subscription priced journals, please check if the article you are interested in is an OA article and if so which licence was it published under.

 Before printing, think about the environment

ANEXO C – CERTIFICADO CEUA – UTILIZAÇÃO DE *Rhamdia quelen*



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de parâmetros biológicos em *Rhamdia quelen* infectados ou não por *Aeromonas caviae* tratados com o óleo essencial de *Gaultheria procumbens*.", protocolada sob o CEUA nº 7317241120 (ID 003399), sob a responsabilidade de **Roberto Christ Vianna Santos** e equipe; *Camila Marina Verdi; Vanessa Schopf Machado; Cristiane Antunes Teixeira; Matheus Dellaméa Baldissera; Carine de Freitas Souza; Laura Jaeger Kittel; Leonardo Rodrigues; Felipe Zarzicki; Sílvio Teixeira da Costa* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA da UFSM) na reunião de 18/05/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of biological parameters in *Rhamdia quelen* infected or not by *Aeromonas caviae* treated with the essential oil of *Gaultheria procumbens*.", utilizing 70 Fishes (males and females), protocol number CEUA 7317241120 (ID 003399), under the responsibility of **Roberto Christ Vianna Santos and team; Camila Marina Verdi; Vanessa Schopf Machado; Cristiane Antunes Teixeira; Matheus Dellaméa Baldissera; Carine de Freitas Souza; Laura Jaeger Kittel; Leonardo Rodrigues; Felipe Zarzicki; Sílvio Teixeira da Costa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA da UFSM) in the meeting of 05/18/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2021** a **12/2021**

Área: **Departamento de Microbiologia E Parasitologia**

Origem: **Biotério externo**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **5 a 7 meses**

N: **70**

Linhagem: ***Rhamdia quelen***

Peso: **65 a 70 g**

Local do experimento: Laboratório de Fisiologia de Peixes da Universidade Federal de Santa Maria, prédio 21, sala 5104

Santa Maria, 20 de agosto de 2022

Dra. Patrícia Bräunig
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Vania Lucia Loro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria



Comissão de Ética no Uso de Animais

da *Universidade Federal de Santa Maria*

Santa Maria, 16 de novembro de 2021
CEUA N 7317241120

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Roberto Christ Vianna Santos
Área: Departamento De Microbiologia E Parasitologia

Título da proposta: "Avaliação de parâmetros biológicos em Rhamdia quelen infectados ou não por Aeromonas caviae tratados com o óleo essencial de Gaultheria procumbens."

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSM (ID 003186)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 15/junho/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Devido resultados promissores na primeira etapa dos testes, os quais aumentaram significativamente a longevidade dos animais tratados com óleo essencial de G. procumbens, faz-se necessária a investigação de fatores relacionados ao estresse oxidativo, a fim de determinar possível modulação do sistema para justificar tais resultados. "

Comentário da CEUA: "A emenda aprovada, pesquisador solicita 42 animais adicionais."

Dra. Patrícia Bräunig
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Vania Lucia Loro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 1

Aquaculture

Gaultheria procumbens essential oil longevity and oxidant/antioxidant status of silver catfish *Rhamdia quelen* experimentally infected by *Aeromonas caviae* --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Diseases
Keywords:	Longevity; Infection; Fish; Essential oil; Treatment.
Corresponding Author:	Roberto Christ Vianna Santos Universidade Federal de Santa Maria - UFSM Santa Maria, Rio Grande do Sul Brazil
First Author:	Camila Marina Verdi, PhD
Order of Authors:	Camila Marina Verdi, PhD Matheus D Baldissera, PhD Vanessa Machado, PhD Carine Souza, PhD Eduardo Andrade Bernardo Baldisserotto, PhD Roberto Christ Vianna Santos
Abstract:	<p>The growth of bacterial resistance in animals and the accumulation of antimicrobials in animal meat has become a significant problem with nutritional and economic impact. In search of a viable alternative applicable to the aquaculture practice, this study investigated the action of <i>Gaultheria procumbens</i> essential oil against <i>Rhamdia quelen</i> infected with <i>Aeromonas caviae</i>. Through the evaluation of the longevity test, we observed that <i>Rhamdia quelen</i> infected and treated with 5 and 10 µL/L of <i>G. procumbens</i> essential oil had significantly higher longevity compared with untreated infected control groups or those treated with the vehicle (ethanol). In order to elucidate the increased longevity of the infected animals, further tests were performed on <i>R. quelen</i> infected fish treated with 10 µL/L of <i>G. procumbens</i> essential oil to evaluate the oxidative stress pathway. The TBARS and ROS tests showed increased MDA and ROS levels in the non-infected control group treated with <i>G. procumbens</i>, and increased levels of the enzymes SOD, GPX, and GST, leading us to believe they increased to bring balance against ROS. Our findings suggest another pathway is responsible for the increased longevity of <i>R. quelen</i> infected by <i>G. procumbens</i>.</p>

NUP: 23081.120653/2022-71

Prioridade: Normal

Ato de entrega de dissertação/tese

134.334 - Dissertação e tese

COMPONENTE

Ordem	Descrição	Nome do arquivo
7	Tese de doutorado (134.334)	Tese Camila Verdi_rev_Leo (2).pdf

Assinaturas

19/11/2022 12:40:25

CAMILA MARINA VERDI (Aluno de Pós-Graduação)

04.10.14.02.0.0 - PG em Ciências Farmacêuticas - Doutorado - 42002010029D8

22/11/2022 10:13:02

ROBERTO CHRIST VIANNA SANTOS (PROFESSOR DO MAGISTÉRIO SUPERIOR)

04.39.00.00.0.0 - DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA - DMIP

1960



Código Verificador: 2110576

Código CRC: f446815d

Consulte em: <https://portal.ufsm.br/documentos/publico/autenticacao/assinaturas.html>

