

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CAMPUS DE FREDERICO WESTPHALEN
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAGÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL – PPGCTA

Indiara Barcellos da Cunha

**ANÁLISE DA FITOPROSPECÇÃO ANTIBACTERIANA
DAS ESPÉCIES *Zingiber officinale* E *Hedychium coronarium***

Frederico Westphalen, RS
2023

Indiara Barcellos da Cunha

ANÁLISE DA FITOPROSPECÇÃO ANTIBACTERIANA DAS ESPÉCIES
Zingiber officinale E *Hedychium coronarium*

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.**

Orientador: Prof^o. Dr^o. Genesio Mario da Rosa

Frederico Westphalen, RS
2023

Indiara Barcellos da Cunha

**ANÁLISE DA FITOPROSPECÇÃO ANTIBACTERIANA DAS ESPÉCIES
Zingiber officinale E *Hedychium coronarium***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), *campus* Frederico Westphalen, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental**.

Aprovado em 10 de março de 2023.

Genesio Mario da Rosa, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Hilda Hildebrand Soriani, Dra. (UFSM)

Alexandre Tiburski Neto, Dr. (UNOESC)

Frederico Westphalen, RS
2023

da Cunha, Indiara
ANÁLISE DA FITOPROSPECÇÃO ANTIBACTERIANA DAS ESPÉCIES
Zingiber officinale E Hedychium coronarium / Indiara da
Cunha.- 2023.
77 p.; 30 cm

Orientador: Genesio Mario da Rosa
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Campus de Frederico Westphalen, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, RE, 2023

1. Monitoramento ambiental 2. Plantas medicinais 3.
Compostos fitoquímicos 4. Resistência bacteriana I. da
Rosa, Genesio Mario II. 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: vala schoenfeldt vatta cma 10/1720.

Declaro, INDIARA DA CUNHA, para os devidos fins e sob as penas da lei,
que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso
(Dissertação) 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.

À DEUS, na sua grandiosidade, ao meu pai CezarAugusto (in memoriam), à minha mãe Ligia, principal incentivadora para a continuidade dos meus estudos, e meus filhos Mabelle e Vincenzo, razões da minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Neste momento passa um “filme” na memória, de toda a caminhada até aqui. Primeiramente agradeço ao criador do universo, o alfa, o ômega, o princípio e o fim, Jesus Cristo, sou grata, pois quando me faltavam forças sua destra me sustentou.

Ao meu pai César que cedo partiu, mas não há um dia sequer que eu não lembre dele e de seus conselhos.

À minha “pãe” Ligia, por tudo que abdicou em prol da minha felicidade. Pela educação, o apoio emocional, pelo exemplo de humildade e fé em Deus, pelo amor dedicado à mim e ao seus netos.

Às minhas maiores riquezas, razões da minha vida, meus amores daqui até o infinito, meus filhos: Mabelle e Vincenzo, agradeço o amor puro e verdadeiro, a compreensão das minhas ausências, para que eu conseguisse alcançar esta grandiosa conquista, dedicada também a vocês, e que sirva de motivação para irem muito mais além.

Às minhas tias Sandra, Suzana e Rossana o apoio incondicional à mim, à meus filhos. Ao casal de amigos Jaira e Jorge Laerte Mallmam, pelo acolhida, amizade, companheirismo, desde a minha chegada a cidade de Frederico Westphalen até os dias atuais.

Ao orientador Prof. Genesio Mario da Rosa, primeiramente por resgatar a minha história dentro do PPGCTA, me acolher de uma forma ímpar, sem julgamentos, orientandome 100% nas atividades desenvolvidas para a realização da pesquisa. Admiro e levo como inspiração o profissional e ser humano que és.

À Prof. Dra. Hilda Hildebrand Soriani, pela orientação na realização da Docência II, além seu carisma alegrando os ambientes da Universidade, e profissionalismo admiráveis. Ao Prof. Dr. Alexandre Tiburski Neto, membro externo da banca de defesa, por suas sugestões, em dados momentos em que foi pertinente a troca de conhecimento.

Ao Prof. Dr. Jefferson Alves da Costa Junior, membro suplente da banca de defesa. Sempre muito agradável com todos, visto que ninguém passou despercebido pelo seu bom dia! ou boa tarde! considerando os alunos (graduandos e mestrandos) com grande estima. À Ms. Kauane Flach, pela sua produção científica, que norteou as pesquisas do GMRH.

Aos colegas de Laboratório Ubiratan, Mathias, Vanessa, Isabela, Letícia, Emanuel, Ana, Deisy e Milene, pela parceria nos eventos e momentos de descontração, além do apoio técnico nas atividades propostas.

À Universidade Federal de Santa Maria campus Frederico Westphalen – RS, por promover todos os meios para a realização deste trabalho, dentro de uma instituição reconhecida mundialmente. Desde o aporte de profissionais da secretaria acadêmica do curso, nas pessoas da Fernanda e Valdecir, ao Técnico em laboratório Gabriel e a toda a estrutura física do campus, que propiciaram o alcance dos objetivos deste trabalho.

A sabedoria é a coisa principal; adquiere, pois, a sabedoria; sim, com tudo o que possuis, adquiere o conhecimento. Exalta-a, e ela te exaltará; e, abraçando-a tu, ela te honrará.

(Provérbios, 4:5)

"Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito".

(Martin Luther King Jr)

RESUMO

ANÁLISE DA FITOPROSPECÇÃO ANTIBACTERIANA DAS ESPÉCIES *Zingiber officinale* E *Hedychium coronarium*

AUTORA: Indira Barcellos da Cunha
ORIENTADOR: Genesio Mario da Rosa

A utilização das plantas com finalidade medicamentosa é uma prática milenar entre distintas culturas, frente as propriedades fitoquímicas presentes nas espécies vegetais. A partir dos elementos que compõem as plantas extraem-se substâncias bioativas de interesse farmacológico, visto que medicamentos à base de produtos naturais podem ser uma proposta alternativa no tratamento medicinal. Diante desse cenário, esta pesquisa ambiental teve por objetivo avaliar a sensibilidade bacteriostática dos extratos bioativos, das espécies vegetais: *Z. officinale* e *H. coronarium*, frente à cepa bacteriana da espécie *Escherichia coli* (*E. coli*). Para esta finalidade realizou-se por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG – MS), a análise fitoquímica dos extratos das plantas, em distintas frações de solventes, sendo eles: hexano (HX), éter etílico (ET), clorofórmio (CL), acetato de etila (AE) e aquoso (AQ), por critério de polaridade; posteriormente avaliou-se se existe diferenças na composição química dos extratos de *Z. officinale* e *H. coronarium* e a atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos através da técnica de microdiluição em caldo (MIC). No experimento foram utilizadas as seguintes cepas microbianas: *E. coli* ATCC 25922 e quatro cepas ambientais (S1, S2, S3, S4), isoladas em estudos anteriores, e amostras de água do rio Lajeado Pardo, no município de Frederico Westphalen – RS. Os rendimentos gerais para *Z. officinale* foi de 22,699% enquanto que para *H. coronarium* de 31,276%, a partir das extrações por diferentes solventes, AQ e HX apresentaram os maiores rendimentos. A CG –MS revelou a presença de quatro fitocompostos nos extratos de *H. coronarium* e sete em *Z. officinale*, sendo pertencentes à classe dos terpenos (voláteis), os monoterpenos acíclicos, alcalóides, semelhantes em ambas as plantas, com porcentagens distintas. A atividade antibacteriana foi observada nos extratos HX, ET, CL e AE, nas menores concentrações frente a *E. coli* padrão, para ambas as espécies vegetais. Ao passo que nos isolados obteve-se resultados de concentração inibitória mínima (CIM) nos mesmos extratos de *H. coronarium* e *Z. officinale*, porém elevadas, para CIM perante as cepas ambientais. Já nas concentrações letais mínimas (CLM) se obteve resultados com os extratos, frente a cepas de *E. coli*, porém não foi o almejado, entre as cepas ambientais. No entanto houveram resultados significativos para CLM, nos extratos de *H. coronarium*, sobre os evidenciados em *Z. officinale*, nas maiores concentrações testadas, frente a cepa *E. coli* ATCC. Os extratos aquosos de ambas as espécies vegetais foram inexpressivos para ação bacteriostática, por exemplo das concentrações testadas. Coletivamente, este estudo sugere que a partir da análise cromatográfica de *H. coronarium* e *Z. officinale* houve equidade entre os fitocompostos revelados nas espécies vegetais, sendo os resultados mais satisfatórios do experimento, evidentes nas frações apolares HX, ET, CL e AE, frente a *E. coli* padrão, ao passo que as cepas ambientais apresentaram maior resistência aos extratos orgânicos testados. A espécie *Z. officinale* apresentou CIM significativa, frente a cepa ambiental S3, destacando-se a potencialidade desta planta versus a cepa bacteriana *E. coli*.

Palavras-chave: Gengibre. Lírio do Brejo. Rizoma. Metabólitos secundários. Rendimentos.

ABSTRACT

The use of plants for medicinal purposes is an ancient practice among different cultures, due to the phytochemical properties present in plant species. From the elements that compose the plants, bioactive substances of pharmacological interest are extracted, since drugs based on natural products can be an alternative proposal in medicinal treatment. Given this scenario, this environmental research aimed to evaluate the bacteriostatic sensitivity of bioactive extracts of plant species: *Z. officinale* and *H. coronarium*, against the bacterial strain of *Escherichia coli* (*E. coli*). For this purpose it was accomplished by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), the phytochemical analysis of the extracts of the plants, in different fractions of solvents, being them: hexane (HX), ethyl ether (ET), chloroform (CL), ethyl acetate (EA) and aqueous (AQ), by polarity criteria; later it was evaluated if there are differences in the chemical composition of the extracts of *Z. officinale* and *H. coronarium* and the antimicrobial activity of organic extracts through the broth microdilution technique (MIC). The following microbial strains were used in the experiment: *E. coli* ATCC 25922 and four environmental strains (S1, S2, S3, S4), isolated in previous studies, and water samples from Lajeado Pardo river, in Frederico Westphalen - RS. The overall yield for *Z. officinale* was 22.699% while for *H. coronarium* it was 31.276%, from the extractions by different solvents, AQ and HX showed the highest yields. The GC-MS revealed the presence of four phytochemicals in the extracts of *H. coronarium* and seven in *Z. officinale*, belonging to the class of terpenes (volatiles), acyclic monoterpenes, alkaloids, similar in both plants, with distinct percentages. The antibacterial activity was observed in extracts HX, ET, CL and AE, at the lowest concentrations against standard *E. coli*, for both plant species. On the other hand, in the isolates it was obtained results of minimum inhibitory concentration (MIC) in the same extracts of *H. coronarium* and *Z. officinale*, but high, for MIC against environmental strains. As for the minimum lethal concentration (MLC) results were obtained with the extracts, against *E. coli* strains, but it was not the aimed one, among the environmental strains. However, there were significant results for MIC, in the extracts of *H. coronarium*, over the ones evidenced in *Z. officinale*, in the highest concentrations tested, against *E. coli* ATCC strain. The aqueous extracts of both plant species were unexpressive for bacteriostatic action, for example at the concentrations tested. Collectively, this study suggests that from the chromatographic analysis of *H. coronarium* and *Z. officinale* there was equity among the phytochemicals revealed in the vegetal species, being the most satisfactory results of the experiment, evident in the apolar fractions HX, ET, CL and AE, against *E. coli* while the environmental strains showed greater resistance to the organic extracts tested. The species *Z. officinale* showed significant MIC against the environmental strain S3, highlighting the potential of this plant versus the bacterial strain *E. coli*.

Keywords: Ginger. Lily of the Valley. Rhizome. Secondary metabolites. Yields.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Etapas iniciais de preparação dos extratos das plantas	40
FIGURA 2 – Esquema geral do método de partição e separação de compostos das plantas	41
FIGURA 3- Representação geral das etapas do teste MIC com distintas frações de solventes.....	45
FIGURA 4 – Rendimentos dos extratos das duas espécies vegetais em frações de acordo com os solventes.....	46
FIGURA 5 – Teste MIC dos extratos das espécies <i>Z. officinale</i> e <i>H. coronarium</i> frente as cepas bacterianas de <i>E. coli</i>	53

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1- Porcentagens dos compostos observados de *H. coronarium* e *Z. officinale*, através de extração com quatro solventes, obtidos por cromatografia a gás/detector seletivo de massa Varian Saturn 2100T (GC/MS-SIS) (2023)..... 48
- TABELA 2 – Atividade antimicrobiana avaliada através de duas metodologias (CIM e CLM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)) com utilização de extratos das espécies vegetais *Z. officinale* e *H. coronarium*, extraídos através de cinco solventes distintos (2023)..... 54

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Mapas de co-ocorrências dos termos balizadores de referências em língua inglesa, em torno das propriedades das espécies vegetais <i>Zingiber officinale</i> e <i>Hedychium coronarium</i>	24
QUADRO 2 - Triagem de E.coli identificadas na amplificação das fitas molde	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Acetato de etila
a.c.	Antes de Cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AQ	Aquoso
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Coração
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
BR	Brasil
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL	Clorofórmio
CLM	Concentração Letal Mínima
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético Tetrassódico
ET	Éter etílico
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Extra-intestinal
EUA	Estados Unidos da América
FBI	Bactéria Indicadora Fecal
FV	Fatores de Virulência
GMRH Hídricos	Grupo de Pesquisa Manejo dos Recursos
HAP	Pneumonia Adquirida no Hospital
	<i>H. coronarium Hedychium coronarium</i>
HX	Hexano
ITUs	Infecções do Trato Urinário
MIC	Microdiluição em Caldo
min.	minutos
mL	Mililitro

μL	Microlitro
μg/mL	Miligrama/mililitro
MH	Ágar <i>Mueller-Hinton</i>
NBM	Meningite Neonatal
NIST	National Institute of Standards and Technology
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PAN BR	Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNPMF	Plano Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PNRH	Política Nacional dos Recursos Hídricos
RAM	Resistência antimicrobiana adquirida
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RS	Rio Grande do Sul
SHU	Infecção Gastrointestinal Hemolítico - Urêmica
SNGRH	Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos
SUS	Sistema Único de Saúde
TBE	Solução Tris/ Borato/EDTA
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UV	Ultra violeta
<i>Z. officinale</i>	<i>Zingiber Officinale</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS.....	22
1.1.1	Objetivo Geral	22
1.1.2	Objetivos Específicos	22
1.2	HIPÓTESES.....	23
2	REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1	PANORAMA AMBIENTAL DO USO DA ÁGUA E COM MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS.....	25
2.2	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NO CENÁRIO GLOBAL.....	27
2.3	<i>Escherichia coli</i> COMO PREDITORA À PATOGENECIDADE.....	29
2.4	MARCOS LEGAIS PARA O USO MEDICINAL E FITOTERÁPICO DE PLANTAS.....	31
2.5	CARACTERIZAÇÕES GERAIS DAS ESPÉCIES <i>Zingiber officinale</i> e <i>Hedychium coronarium</i>	33
3	CAPÍTULO 1– MANUSCRITO 1. ANÁLISE DA SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE E. coli AOS EXTRATOS DAS ESPÉCIES VEGETAIS <i>Zingiber Officinale</i> e <i>Hedychium coronarium</i>	36
3.1	INTRODUÇÃO.....	38
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.2.1	Protocolos de extrações	39
3.2.2	Obtenção do extrato bruto dos rizomas das espécies <i>Zingiber Officinale</i> e <i>Hedychium Coronarium</i>	39
3.2.3	Fracionamento neutro do extrato bruto metanólico	40
3.2.4	Cultura Estoque E. coli	42
3.2.4.1	Isolamento das Bactérias Gram negativas.....	42
3.2.5	Procedimentos e reagentes para PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	42
3.2.5.1	Tampão para eletroforese.....	42
3.2.5.2	Pré-Mix para PCR.....	42
3.2.5.3	Preparo e diluição dos oligonucleotídeos – primers.....	42

3.2.5.4	Quantificação dos reagentes para amplificação.....	43
3.2.5.5	Amplificação em termociclador.....	43
3.2.4.6	Ajuste de parâmetros para eletroforese.....	43
3.2.7	Amplificação de cepas bacterianas isoladas.....	43
3.2.8	Rendimento dos rizomas, extratos brutos e respectivas frações.....	44
3.2.9	Testes de suscetibilidade bacteriana aos fitocompostos oriundos dos extratos vegetais de <i>Zingiber Officinale</i> e <i>Hedychium coronarium</i>.....	44
3.2.9.1	Análise dos fitocompostos dos rizomas das duas espécies de gengibre.....	45
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.3.1	Rendimentos dos extratos em frações.....	46
3.3.2	Análise da composição fitoquímica dos extratos em diferentes solventes por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS).....	47
3.3.3	Conferição de genes associados à agentes etiológicos por meio da PCR.....	51
3.3.4	Análise da potencialidade antimicrobiana dos extratos de <i>Zingiber officinale</i> e <i>Hedychium coronarium</i> em distintos solventes.....	53
34.	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

A revolução industrial foi um marco histórico para a inserção das primeiras tecnologias na sociedade. No entanto, na mesma época, tem-se registros a respeito da poluição advinda das fábricas e seus processos de produção (DA SILVA *et al.* 2019).

A partir do crescimento da urbanização, emissões de poluentes foram evidenciadas, pela queima de combustíveis fósseis, através da industrialização e mobilidade pelo uso de automóveis, ainda na queima de combustíveis dos recursos naturais (madeira, carvão vegetal) para geração de energia, além de resíduos agrícolas (esterços de animais) (PO; FITZGERALD, CARLSTEIN, 2011; ARBEX, 2012).

Entre avanços e retrocessos, a intensificação das ações antrópicas aliadas aos interesses econômicos, favoreceram a crescente expansão populacional, desestabilizando o ecossistema em que vivemos e, conseqüentemente, os ciclos biogeoquímicos (CHENG *et al.*, 2022). A expansão industrial contribuiu na história, com progresso, no entanto, acresceram condições favoráveis aos prejuízos à saúde respiratória, cardiovascular e neurológica humana (INSTITUTO DE ENERGIA E MEIO AMBIENTE, 2022).

Os desequilíbrios desfavorecem o direito constitucional de um meio ambiente saudável e preservado às futuras gerações. Existindo sim uma necessidade de conscientização ambiental em todos os âmbitos (SOUZA, ANDRADE, 2014). Prevista legalmente na Constituição Federal de 1988, em que a garantia de um ecossistema equilibrado e preservado é de responsabilidade dos governantes e sociedade cobrar e auxiliar na defesa deste direito essencial à qualidade de vida humana e ambiental (LEUZINGER, 2008; VARELLA; SCANDAR, 2019).

Em contrapartida, são inegáveis os avanços tecnológicos evidenciados durante o século XX, entre eles, de grande importância para a medicina mundial, foram as descobertas científicas da indústria farmacêutica, a respeito de novos medicamentos para o controle de doenças que até então levavam o paciente à óbito (DOS SANTOS, SANTOS, GOMES, 2021).

Em meados de 1928, o médico bacteriologista, Alexander Fleming, marcou a ciência com aquele que seria o protagonista na cura da população enferma, quando descobriu a penicilina. O primeiro antibiótico descrito na farmacologia, além de representar um marco tecnológico que abriu caminho para novas pesquisas no âmbito da antibioticoterapia (PEREIRA, PITA, 2005).

Nesse aspecto, o progresso trazido pela ciência à saúde pública, trouxe benefícios que se refletem nos dias atuais, como por exemplo, o aumento na expectativa de vida das pessoas, promovido pelo avanço tecnológico da indústria farmacêutica. No entanto, na contramão dos medicamentos sintéticos, tem-se observado uma crescente demanda no âmbito das pesquisas científicas pelo uso das plantas medicinais na atualidade. Embora seja uma prática milenar, a indústria farmacêutica tem buscado novas alternativas de tratamentos de saúde e estéticos, tendo em vista a crescente busca por parte dos consumidores aos fármacos à base de substâncias naturais e que resultem nos mesmos efeitos.

Há registros do surgimento de antimicrobianos à base de matéria prima vegetal desde a década de 1950, sendo o grande ápice, e desde então houve uma regressão na descoberta de novos antibióticos, levando a um descontrole no surgimento de organismos ainda mais resistentes aos medicamentos usuais (HUTCHINGS, TRUMAN, WILKINSON, 2019). Como alternativa a essa crise, pode-se optar pelo consumo de uma planta medicinal como fármaco, desde que, segundo Colet *et al.* (2015) e Pedroso, Andrade e Pires (2021), irá depender da identificação correta, a parte que deverá ser usada, modo de preparo, forma e dose apropriada.

A valorização dos saberes ligados aos recursos naturais são trazidos há décadas, a exemplo disto, institui-se nos anos de 2006 e 2008, respectivamente, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016a; PEDROSO, ANDRADE, PIRES, 2021). Novos caminhos vem sendo traçados na medicina convencional, para a inclusão de espécies vegetais frente ao combate de vírus e bactérias resistentes aos antimicrobianos mais utilizados na farmacologia.

O termo RAM (Resistência Antimicrobiana Adquirida), ocorre quando ao passar de um tempo, bactérias, fungos, vírus e parasitas, tornam-se inacessíveis à ação dos antibióticos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários (CORRÊA *et al.*, 2022). Ao longo de décadas bactérias multirresistentes surgiram, originando novas cepas ainda mais peculiares (MORAES, ARAÚJO, BRAGA, 2016).

O uso em demasia de antibióticos vem de encontro com esta realidade, pois são comumente prescritos no tratamento de doenças por bactérias oportunistas, que atacam o intestino, rins, bexiga e pulmões. Nesses casos, tinha-se o uso de medicamento rotineiro para auxiliar na dieta do animal, para maior rendimento econômico. A priori, se faz necessária a conscientização dos profissionais que administram os antimicrobianos, de forma a otimizar as doses (PRESCOTT, 2018; SCALDAFERRI, 2020) e da população em geral, que por vezes se

automedica, além de descartar incorretamente esses fármacos quimicamente danosos no meio ambiente (GUARDABASSI; PRESCOTT, 2015).

No mês de dezembro do ano de 2019, em escala mundial ficou conhecida a maior pandemia da atualidade, a COVID-19, chegando ao Brasil dois meses depois. O vírus SARSCOV-2, responsável pela disseminação da doença em todo o mundo, paralisou a vida cotidiana das pessoas, quando deu-se início ao isolamento social (SILVA, PAIVA, 2021). Como estratégia de abrandar e ou evitar possíveis sintomas foram comercializados os chamados “Kit COVID -19”, até mesmo doados em alguns estados, sem melhor comprovação científica, contendo as seguintes medicações: azitromicina, ivermectina, cloroquina e hidroxicloroquina (PACHECO *et al.*, 2020; LOPES; LIMA, 2021).

Nesse sentido, Júnior e Salvi (2018), relatam o hábito de automedicar-se como a prática do uso de medicamento sem a condução do profissional capacitado e um dos grandes motivadores desta problemática. Os dados relacionados a uso indiscriminado de antibióticos evidenciam um problema de amplitude global, pois vários países, entre eles o Brasil, buscam alternativas para tratamento de organismos patógenos, que se tornaram resistentes à automedicação por antibióticos, advindos do uso humano e veterinário. Entre os anos de 2013 à 2016, o Brasil já era responsável por 40% do consumo de antibióticos, sendo o estado do Rio Grande do Sul, a região com maior consumo, com 8,2 milhões em 2016 (NEVES; CASTRO, 2020).

Gimenes *et al.* (2019) citam alguns fatores influentes na prática da automedicação entre a população, dos quais destacam a ausência de acesso aos locais de saúde, bem como propagandas referentes a remediar, sem abordar os possíveis riscos de superdosagens (DE SOUZA LEAL *et al.*, 2021). A desinformação relacionada ao uso indiscriminado de medicamentos pode acarretar males que refletem na dificuldade em tratar patologias comuns, como é o caso de infecções urinárias, antigamente, tratáveis com uso de antimicrobianos comuns (FLACH, 2021). E um exemplo disso, é o que foi observado durante o período pandêmico, cerca de 30,1% responderam que se automedicaram, enquanto que destes, 14,2% alegaram automedicação pelo uso de azitromicina (SOUZA *et al.*, 2021).

Por outro lado e mais grave, até 2050 há uma previsão escalonada de morte por RAM, de uma pessoa a cada três segundos (O’NEILL, 2016; FLACH, 2021). Frente a esta perspectiva negativa, pesquisas voltadas para a extração de bioativos de espécies vegetais na forma de tratamento integrativo contra agentes patógenos resistentes vem ganhando destaque no meio científico. Nesse sentido, a farmacologia voltada para a utilização de produtos naturais na

agropecuária, tem alcançado bons resultados no controle parasitário de animais ruminantes (DKHIL, 2013; CASTAGNA *et al.*, 2021; PIRAS *et al.*, 2022).

Assim, o presente trabalho se justifica, pois através das extrações dos agentes fitoquímicos das plantas em estudo, busca-se contribuir com dados científicos a respeito possíveis propriedades antimicrobianas, contra três cepas isoladas por Flach (2021), da bactéria gram negativa *Escherichia coli* (*E. coli*), oriundas da água bruta da bacia hidrográfica do Rio da Várzea, município de Frederico Westphalen – RS.

Serão apresentados, sequencialmente neste trabalho, uma revisão de literatura que aborda os temas mais relevantes para a contextualização da presente pesquisa, que em linhas gerais são: panorama ambiental da água, resistência antimicrobiana, bactéria da espécie *E. coli*, extratos de duas espécies de plantas. Além disso, o capítulo 1 (manuscrito 1) atenta para o uso desses extratos vegetais, com intuito de verificar a sensibilidade das quatro cepas isoladas da bactéria *E. coli*, através da obtenção dos agentes fitoquímicos presentes nas plantas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antimicrobiano das espécies vegetais *Zingiber officinale* e *Hedychium coronarium*, à sensibilidade CIM/CLM, frente as cepas da espécie *Escherichia coli* (*E. coli*), isolados ambientais e ATCC.

1.1.2 Objetivos Específicos

O presente estudo tem como objetivos específicos:

- I. Obter os extratos das plantas, a partir de distintos solventes.

- II. Avaliar qualitativamente a composição química dos extratos de *Zingiber officinale* e *Hedychium coronarium* (CIM/CLM).

- III. Verificar o potencial antibacteriano dos extratos vegetais das espécies *Zingiber officinale* e *Hedychium coronarium*, em quatro isolados ambientais da bactéria *E. coli* (S1, S2, S3, S4) e ATCC 25922.

1.2 HIPÓTESES

As hipóteses para este trabalho foram assim definidas:

Hipótese 1: Existem diferenças na composição química dos extratos de *Zingiber officinale* e *Hedychium coronarium*.

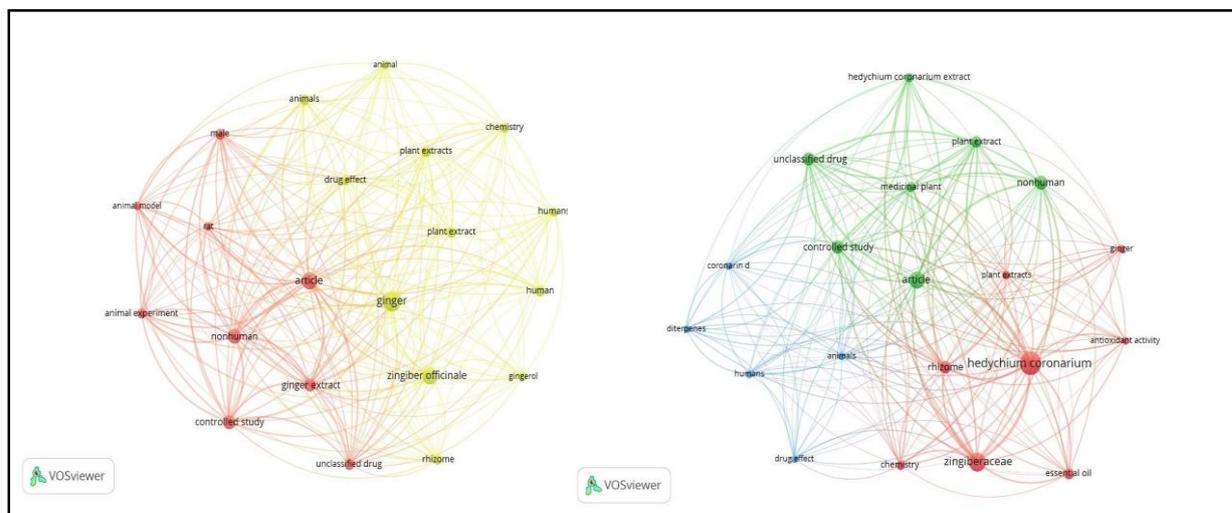
Hipótese 2: Existe sensibilidade das cepas da bactéria *Escherichia coli*, aos extratos *Zingiber officinale* e *Hedychium coronarium*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Essa seção abrange as considerações bibliográficas acerca das temáticas centrais desta pesquisa que está vinculada a testes de sensibilidade da bactéria *E. coli* aos extratos fracionados por diferentes solventes orgânicos, das espécies vegetais *Zingiber officinale* e *Hedychium coronarium*.

Na averiguação dos melhores trabalhos publicados relativos ao tema de investigação utilizou-se o instrumento *VOS Viewer*, sendo um software de construção de redes bibliométricas, visualizador de redes gratuitas e de simples manuseio (FLACH, 2021; VAN ECK; WALTMAN, 2010). Possui a capacidade de integração de textos e através desta é possível estabelecer e visualizar redes de co-ocorrência de termos importantes para a construção da presente pesquisa, como exposto nas figuras 1 e 2.

Quadro 1- Mapas de co-ocorrências dos termos balizadores de referências em língua inglesa, em torno das propriedades das espécies vegetais *Zingiber officinale* e *Hedychium coronarium*



A partir da construção de dados bibliográficos, através das palavras-chave extraídas de artigos da Revista Scopus, formam-se redes, também denominadas de clusters de termos mais próximos, representados nos mapas pela aglomeração de cores distintas para cada palavra correlacionada. Observa-se que em ambos os mapas destaca-se o termo *Zingiberaceae*, referente a família que as duas espécies de plantas pertencem, assim como gengibre, rizoma, extratos de plantas, óleo essencial, validando o embasamento teórico para a presente pesquisa.

2.1 PANORAMA AMBIENTAL DO USO DA ÁGUA E COM MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

A água é uma das fontes mantenedoras da vida humana e animal e de todo o ecossistema, fundamental para os processos fisiológicos do corpo humano. Além disso, está atrelada às atividades econômicas como a agricultura, irrigação, produção de alimentos e áreas recreativas (MORETTO, 2018). Para um uso igualitário, agentes públicos como a União, estado e municípios devem promover o direito universal aos serviços básicos de água potável (GADELHA *et al.*, 2021). Assim, conforme instituída a Lei 9.433 de 1997- Política Nacional dos Recursos Hídricos (PNRH), regulamentando o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos (SNGRH):

Art 1º: a PNRH baseia-se nas seguintes premissas: I – a água é um bem de domínio público; II – a água é um recurso natural limitado, dotado de valor econômico; III – em situações de escassez, o uso prioritário dos recursos hídricos é o consumo humano e a dessedentação de animais; IV – a gestão dos recursos hídricos deve sempre proporcionar o uso múltiplo das águas; V- a bacia hidrográfica é a unidade territorial para a implementação da PNRH e atuação do SNGRH; VI – a gestão dos recursos hídricos deve ser descentralizada e contar com a participação do Poder público, dos usuários e das comunidades (BRASIL, 1997b).

Nesse aspecto é importante pontuar a conexão entre os recursos hídricos e o desenvolvimento econômico e social de um determinado território, considerando o surgimento das urbanizações, que tiveram seu início à beira dos rios. Com o passar dos anos, alterações na qualidade da água foram mais evidentes a partir da expansão urbana e econômica (LOURENÇO *et al.*, 2022). A economia permeia os setores que se utilizam da água como fonte para o desenvolvimento de alimentos, como a agricultura, pecuária e nos diversos processos industriais. Ao passo que mundialmente são consumidos cerca de 70% da água doce, somente na agricultura (ALBERTI *et al.*, 2022).

Este fato tem conexão com o aumento exponencial da população mundial, pois estimase que o consumo de água para agricultura ascenda de 2.700 bilhões $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$ para 3.200 bilhões $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$, devido à expansão populacional prevista em poucos anos (ALBERTI, *et al.*, 2022; HE *et al.*, 2021). Outra preocupação relacionada ao crescimento urbano é referente à competição com o campo, representado pela produção de grãos e criação de animais, disputando este bem comum que é o recurso hídrico, fundamental a todos (ALBERTI, *et al.*, 2022).

Juntamente com a expansão urbana, industrial, uso de agrotóxicos em áreas agricultáveis, descarte de resíduos domésticos, fármacos, entre outras práticas, amplia-se negativamente os impactos ambientais veiculados ao tratamento ineficaz dos resíduos gerados.

Posteriormente, alguns destes resíduos serão degradados nos corpos hídricos, afetando o ecossistema dos mananciais e por conseguinte modificando-os físico, químico e biologicamente. Tornando a água de modo geral, cada vez menos disponível, potencializando-a como fonte receptora de poluição e imprópria para o consumo humano (SARAVANAKUMAR *et al.*, 2022).

Nesse aspecto, a água está veiculada a uma realidade de fonte receptora de microrganismos patogênicos, como por exemplo, as bactérias, devido aos resíduos que de uma forma ou de outra chegam aos corpos hídricos, causando alto risco para humanos e animais.

Segundo Chen *et al.* (2019), existem lacunas a serem investigadas, no âmbito de reduzir a ocorrência de doenças de origem hídrica. Com o uso intensivo de agroquímicos, criação extensiva de porcos, aves e vacas, dentro do manejo agrícola, demonstram uma problemática em relação a serem fontes potenciais diretas de contaminação das águas superficiais (FLACH, 2021; HAFNER, HARTER, PARIKH, 2016).

As bactérias representam um dos vetores de contaminação por via hídrica, comumente identificados em análises, embora encontram-se naturalmente na flora intestinal de humanos e animais de sangue quente, a presença destes agentes patogênicos em grande quantidade, bioindica a possibilidade de contaminações na água, solo e alimentos (MALAGI *et al.*, 2020; OSINSKA *et al.*, 2017; WAMBUGU *et al.*, 2015).

Em casos graves, a presença na água destas bactérias e outros organismos patogênicos surgem como a razão de infecções por via hídrica e associadas às mortes em países subdesenvolvidos (QIU *et al.*, 2022; SONG *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2020). RochelleNewall *et al.* (2015) pontuam a inexistência de monitoramento de organismos transmissores de doenças veiculadas à água, pela falta de recursos econômicos, em países em desenvolvimento.

Segundo estudos realizados, as famílias de baixa renda são mais suscetíveis às infecções hídricas, devido ao tratamento de água ineficaz ou ausência de saneamento básico. A diarreia, mais comum patologia ligada à água contaminada, surge como a quinta razão de óbitos de crianças menores de 5 anos, estando entre as primeiras dez ameaças à saúde pública, no que refere-se à contaminação hídrica (NELSON *et al.*, 2022).

Dentre as formas de exposição dos indivíduos às bactérias, pode ocorrer inclusive por meio do contato dos mesmos com as águas de recreação, as quais estejam com a presença de coliformes fecais. Consequentemente, a contaminação humana poderá evoluir para casos de infecções do trato urinário (ITUs), meningite Neonatal, gastroenterite (diarreia) (JANG *et al.*, 2017; PANDIT *et al.*, 2022). Através da excreção posterior na urina e fezes, o contato de

efluentes domésticos e industriais sem o devido tratamento, pode assim carrear microrganismos patogênicos aos corpos hídricos, águas recreativas, solos e alimentos.

Nesse aspecto, medicamentos antimicrobianos se consolidaram nesse viés para auxiliar no tratamento contra os vírus, bactérias e parasitas atuantes no sistema imunológico do organismo humano e animal. Porém, o uso frequente de antimicrobianos promove uma resistência dos organismos patogênicos a estes medicamentos e são repassados às águas superficiais, contaminando-as (DINH *et al.*, 2017; HSU *et al.*, 2014; MALAGI *et al.*, 2020; PROIA *et al.*, 2016).

2.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NO CENÁRIO GLOBAL

O termo resistência antimicrobiana é subdividido em resistência intrínseca ou adquirida, sendo que na primeira ocorre mediante a obtenção de características enzimáticas e ou estruturais, promovendo assim uma incapacidade ao tratamento antibacteriano. No caso de resistência adquirida, acontece devido a uma mutação ou transmissão de genes, consequentemente, por conta da administração de novos antimicrobianos (FREIRES, RODRIGUES, 2022; LIMA, BENJAMIM, SANTOS, 2017).

A característica de resistência bacteriana aos antimicrobianos, natural ou adquirida, se observa através de uma relação complexa entre a redução da concentração intracelular do antimicrobiano e modificação nos sítios de conexão da molécula com a célula bacteriana (ANVISA, 2020). Em linhas gerais, o princípio ativo de antibióticos e vacinas em uso é a obtenção do princípio ativo, com a seleção do vetor em que a matéria prima dos antibacterianos tem sua origem em produtos sintetizados por bactérias ou fungos, como defesa à opositores bacterianos (DIDIER; MOREIRA, 2016; MYERS; CLARK, 2021).

Neste processo de seleção natural, uma leva de microrganismos modificados geneticamente são altamente resistentes aos medicamentos convencionais, sendo necessárias pesquisas de desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos capazes de bloquear a resistência adquirida (BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020).

Os principais reservatórios de contaminação por bactérias são via humana, animal, ambiente e planta, podendo advir do consumo de água imprópria ao uso, ausência de saneamento básico, alimentos contaminados na forma *in natura*, bem como águas para recreação e utilizadas na irrigação (FLACH, 2021; LARSON *et al.*, 2019).

O enfrentamento às bactérias, vírus, fungos e parasitas super-resistentes ameaça a saúde pública, e desafia a indústria farmacêutica, bem como novas pesquisas científicas, para o desenvolvimento de inovações para o tratamento, tendo em vista o auxílio no controle de organismos associados ao maior tempo de internação e incidências de mortalidade (LEE *et al.*, 2021). Haja vista, o ocorrido durante o período de alta transmissão da COVID -19 aumentou-se o número de internações hospitalares, condições estas que propiciaram a resistência microbiana aos antibióticos usuais no tratamento da doença até então desconhecida (DA SILVA *et al.*, 2021).

O uso constante e indevido de fármacos antimicrobianos geram cepas resistentes ao longo do tempo, tornando o tratamento de saúde oneroso, para hospitais, clínicas e pronto atendimentos, locais estes em que há uma demanda por prescrições e administrações de antibióticos (BIHAREE *et al.*, 2020). Além disso, pode-se mencionar também, o uso frequente de antibióticos na agricultura para as atividades silvipastoris, corroborando para uma contaminação clínica e ambiental (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2021; SONI, *et al.*, 2022).

Segundo Ventrola (2015) e Buchy (2020), nos Estado Unidos da América (EUA), cerca de 80% dos antibióticos compõem o tratamento dos animais, para aprimorar o rendimento e garantir a qualidade da carne, bem como na agricultura, através das excreções do animais, o medicamento é liberado nas fezes, posteriormente utilizada com adubo, e desta forma, contaminando o solo e águas subterrâneas, impactando o meio ambiente e originando o aparecimento de novas cepas resistentes.

Dados publicados no ano de 2021 evidenciaram o alcance global de óbitos anuais causados por Organismos Multirresistentes (OMR), estimados em 700.000 mil por infecções não tratáveis, e há projeção até o ano de 2050, de um aumento para 10 milhões de mortes por resistência antimicrobiana, principalmente em países subdesenvolvidos, parte da Ásia e Nova Deli, capital da Índia (LEE *et al.*, 2021). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), na Ásia o número de óbitos será em torno de 4,7 milhões, na África, 4,1 milhões, na América Latina, 392 mil, América do Norte, 317 mil e Oceania, 22 mil mortes.

Estudos realizados por Nji *et al.* (2021) evidenciaram que há uma prevalência combinada de resistência bacteriana para os antibiótico β -lactâmicos (ampicilina) de 72%, sendo uma das classes de medicamentos mais usado no tratamento de infecções do trato urinário, causadas pela bactéria Gram- negativa *E. coli*.

No Brasil, para o combate à resistência antimicrobiana, alinhado com as diretrizes da OMS, o Ministério da saúde instituiu em 2018, o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN – BR), com vigência de quatro anos, para se

alcançar metas estratégicas de redução de infecções, e conscientização no uso de medicamentos antimicrobianos, na saúde humana e animal (BRASIL, 2019c).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vem atualizando suas resoluções a respeito dos critérios de prescrição, dispensação, controle de medicamentos antimicrobianos. Em seu artigo 4º, a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) Nº 471 de 23 de Fevereiro de 2021 dispõe no seu IX critério:

IX- Monitoramento farmacoepidemiológico: Acompanhamento sistemático de indicadores farmacoepidemiológicos relacionados com o consumo de medicamentos em populações com a finalidade de subsidiar medidas de intervenção em saúde pública, incluindo educação sanitária e alterações na legislação específica vigente (BRASIL, 2021c).

Contudo, se fazem necessárias intervenções constantes ao aspecto de combate à RAM, com desenvolvimento de pesquisas em algumas frentes, como por exemplo, o uso medicinal das plantas com efeitos antimicrobianos. Deve-se seguir o exemplo de países economicamente favorecidos, em que as políticas de prescrições dos antibióticos é severa, justamente a fim de conter o uso indiscriminado deste tipo de medicamento antimicrobiano (NJI *et al.*, 2021).

2.3 Escherichia coli COMO PREDITORA À PATOGENECIDADE

Entre os organismos que se destacam como agente etiológico estão as bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, descoberta pelo pediatra e bacteriologista Theodor Escherich em 1885, possuindo a forma de bastonete (Filo: Proteobacteria, Classe: Grammaproteobacteria, Ordem: Enterobacteriales, Família: *Enterobacteriaceae*, Gênero *Escherichia*), habitável no trato intestinal de seres vivos de sangue quente (CIMA FONTE *et al.*, 2020; KOAUDIO-NGBESSO *et al.*, 2019).

Embora habite o organismo humano e animal, de forma comensal, *E. coli* é um tipo de bactéria indicadora fecal (FBI), do risco de doenças diarreicas, transmissíveis pelo contágio fecal na água (CIMA FONTE *et al.*, 2020; GRILC *et al.*, 2015; PERES, 2017). A presença de FBI na amostra de água pode bioindicar o surgimento dos demais microrganismos intestinais, sejam eles, vírus, parasitas, protozoários, além de vermes em geral (MORETO, 2010).

A partir do contato com as fezes humanas, animais infectados, alimentos mal cozidos, meio ambiente (águas superficiais e solo) contaminado por efluentes não tratados podem ser fontes de

propagação da bactéria *E. coli* patogênica. Consequentemente alguns destes exemplos de ações antrópicas são tidas como fatores relevantes para a resistência antimicrobiana e ameaça à saúde pública (CHEN *et al.*, 2017).

As condições ideais de colonização da bactéria *E. coli* são ambientes de pH neutro, em que a fermentação da lactose com a produção de ácido ocorra entre 24 a 48 h a partir de 36 °C (FIGUERAS; BORREGO, 2010). Classificadas como termotolerantes (WHO, UNICEF, 2005), e resistentes em espaços como solo, água e alimentos ácidos (ANVISA, 2013b).

Conforme Navab-Bared *et al.* (2018), dois patótipos de *E. coli* (enteropatogênicas e enterotóxicas) estão relacionadas a causa da diarreia abrandada à grave, nos países de média a baixa renda. A diarreia é considerada uma doença de veiculação hídrica, diretamente ligada a uma grave falha na saúde pública, ocasionando mortalidade infantil nos países subdesenvolvidos da América Latina e África (GOMES *et al.*, 2016).

As cepas de *E. coli* se desviam da condição natural comensal, para uma forma uropatogênica, causando as ITUs, danos intra-abdominais, pulmonares, meningite neonatal (NBM) e bacteremia (DENAMUR *et al.*, 2021), pneumonia adquirida no hospital (HAP), infecção gastrointestinal hemolítico-urêmicas (SHU) (SAROWSKA *et al.*, 2019). A troca dos informações genéticas de *E. coli*, que podem mover-se horizontalmente e lateralmente, extra e cromossômica, sendo genes transpostos de famílias bacterianas distintas, o que permite observar a sua adaptabilidade em diversos ambientes, e por isso, a estrutura das enterobactérias se torna um desafio para o seu controle (POIREL, *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2016).

A classe *E. coli* patogênica extra - intestinal (ExPEC), possui uma complexa composição genética, com amplos fatores de virulência (FV), sejam elas toxinas, adesinas, lipopolissacarídeos e invasinas (SAROWSKA *et al.*, 2019).

Estas cepas ExPEC são responsáveis pelas ITUs e bacteremia, sendo responsável em torno de 40% das infecções hospitalares, e dessas cerca de 81% ocorrem em mulheres de 16 a 35 anos e homens a partir dos 60 anos (SAROWSKA *et al.*, 2019; TAN; CHLEBICKI, 2016).

Para o tratamento das ITUs e demais infecções por bactérias, vírus e parasitas, o medicamento administrado frequentemente para o tratamento clínico é o antibiótico, sendo um antimicrobiano bastante usual na rede pública de saúde. Ao ingerirmos este tipo de droga, no caso de *E. coli* comensal, habitante da nossa flora intestinal, a mesma está exposta ao antimicrobiano e possivelmente assim, desenvolverá resistência por meio da seleção natural (NJI *et al.*, 2021).

Em diversos estudos clínicos confirmou-se a particularidade de prevalência de *Enterobacteriaceae*, frente aos tratamentos com antibióticos, sendo os mais conhecidos da população, os β -lactâmicos (ácido clavulânico, penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos) (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Os antimicrobianos β -lactâmicos, por exemplo, sofrem inativação, devido a produção enzimática pelas bactérias, capazes de alterar quimicamente a estrutura do antibiótico, tornando-o ineficiente (ANVISA, 2020c).

Frente a esta problemática a fitoterapia surge como tratamento alternativo, visto que há uma gama de compostos presentes nas plantas que podem auxiliar a combater a patogenicidade de bactérias gram-positivas e gram-negativas, como é o caso de *E. coli*.

2.4 MARCOS LEGAIS PARA O USO MEDICINAL E FITOTERÁPICO DE PLANTAS

Na história, a finalidade de medicar-se através das plantas é uma prática das mais antigas que possamos imaginar. Diferentes povos faziam uso desta prática, de acordo com e Rocha *et al.* (2015) e Barreto, Maciel e Garcia (2020):

Registros arqueológicos apontam a importância cultural no uso das plantas medicinais desde 60.000 anos a.c. Povos antigos como os Egípcios, Gregos, Persas e Pré-colombianos, aplicam extensamente tais recursos terapêuticos, contribuindo para a construção dos sistemas de Medicina Tradicional dispersos ao redor do mundo.

No Brasil, a cultura indígena era única detentora do conhecimento popular do consumo e extração de plantas, no início do período Brasil colônia. O século XX marca a história da pesquisa sobre plantas e seus princípios ativos, com a criação da Farmacopeia Brasileira, oficializada pelo decreto Nº 17.509, de 04 de novembro de 1926, descrita pelo pesquisador Rodolpho Albino Dias da Silva (BRASIL, 2010d).

Posteriormente, o uso de plantas foi nomeado como Medicina alternativa nas décadas de 70 e 80, no entanto, países desenvolvidos já consumiam medicamentos fitoterápicos (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012). Também na década de 70 a Organização Mundial da Saúde (OMS), implantou o Programa Nacional de Plantas Medicinais, afim de promover ações de reconhecimento das práticas populares, ao uso de plantas de caráter medicinal e fitoterápico (ZENI *et al.*, 2017).

Entende-se por planta medicinal, as espécies vegetais geridas em amplas formas, com ação terapêutica, utilizada na fitoterapia, área de estudo das plantas e suas aplicações

farmacêuticas (BRASIL, 2018e). As espécies vegetais de cunho medicinal apresentam diversificadas maneiras de consumo, seja na forma *in natura* ou a partir das metodologias de preparação dos compostos bioativos vegetais (SOARES *et al.*, 2021).

Para Furlan *et al.* (2018), o principal incentivo ao uso das plantas na fitoterapia ocorreu em 1978, na “Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde”, no Cazaquistão, em que passou a fazer parte do plano de ação da OMS a recomendação dos produtos de origem biológica, agregados à medicina tradicional.

As discussões e validações das políticas públicas para o uso de plantas na forma terapêutica, se intensificaram no Brasil no século XXI. Em meados de duas décadas atrás foi aprovada Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), através do decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, compõe as seguintes propostas:

Inserção das plantas medicinais no Sistema Único de Saúde (SUS), reconhecer os saberes populares e tradicionais a respeito do tema, fomento à pesquisa e tecnologias na área, capacitação técnica-científica, bem como o uso e manejo sustentável da biodiversidade (BRASIL, 2006f).

O Ministério da Saúde, no ano de 2012 publicou o Caderno de Atenção Básica “Práticas Integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica, no qual o saber popular foi validado, bem como nos demais marcos legais, orientando agentes da saúde e comunidades em geral, a forma correta da administração das plantas medicinais, sem que houvesse risco de excessos (BRASIL 2012f; DOS SANTOS, BAIENSE, DE ANDRADE, 2022; MINIKOWSKI; LUCCA, 2021).

Com o intuito de ampliar o acesso a medicamentos fitoterápicos à base de plantas, a Portaria nº 866 de 22 de abril de 2010 criou as Farmácias Vivas pelo SUS, em prol de sanar uma demanda local em municípios e estados do Brasil. Este programa apoiado pelo Ministério da Saúde compreende desde a etapa de cultivo das plantas, o manejo e a dispensação das mesmas na forma medicamentosa (DOS SANTOS; BAIENSE; DE ANDRADE, 2022; NILSON *et al.*, 2020). Mais tarde, no ano de 2014 foi instituída a Resolução de Diretoria Colegiada, Nº 26, de 13 de Maio, a qual dispõe sobre as categorias de medicamentos fitoterápicos, conforme o seu Art. 2º:

§ 2º São considerados produtos tradicionais fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam

baseadas e dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos pra serem utilizados sem a vigilância de um médico pra fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização (BRASIL, 2014g).

A biodiversidade é uma das riquezas do nosso país, cerca de 20% das espécies vegetais, animais e microbiológicas existentes no planeta terra, encontram-se abrigadas no território brasileiro (DEMARTELAERE *et al.*, 2022; NOGUEIRA *et al.*, 2010). Tendo em vista a vasta flora de diferentes classes, em 2018 as quais representavam um total de 46.097 espécies nativas identificadas (TULER; PEIXOTO; SILVA, 2019).

Da Conceição *et al.* (2018) evidenciaram em seus estudos que 71,5% das pessoas entrevistadas faziam uso de plantas como tratamento alternativo, sendo 60,84% eram mulheres e 39,16% homens, reforçando a premissa do conhecimento familiar, de geração à geração.

Na atualidade, os estudos e desenvolvimento de drogas de origem vegetal, para o tratamento complementar a infecções por organismos resistentes é uma realidade, considerando os avanços em pesquisas acerca das características químicas, toxicológicas e farmacológicas, dos compostos bioativos das plantas, sendo uma estratégia de enfrentamento à novas cepas de vírus e bactérias, desafogando por fim, os leitos de hospitais (IUKAVA, *et al.*, 2021; OTENIO *et al.*, 2020).

As prescrições na medicina tradicional com a inserção da fitoterapia se intensificaram, legitimando cientificamente o saber popular, a respeito dos benefícios fitoquímicos das plantas medicinais ao organismo humano e animal (GAMBOA – GÓMEZ *et al.*, 2015; LIMA; CAVALCANTE; REIS, 2018; PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021). No aspecto de tratar de forma natural, a fitoterapia surge como alternativa na cura e / ou prevenção de sinais clínicos, pois através do etnoconhecimento das plantas, pela ação das propriedades bioativas das mesmas no organismo humano, tem-se uma confiabilidade no uso farmacológico, desde que em doses estabelecidas, segundo a particularidade de cada espécie (GARLET, 2019; LIMA *et al.*, 2021; SANTOS, 2021).

2.5 CARACTERIZAÇÕES GERAIS DAS ESPÉCIES *Zingiber officinale* e *Hedychium coronarium*

O gengibre é o nome popular dado à espécie *Zingiber officinale*, enquanto que *Hedychium coronarium* é conhecida por lírio-do-brejo e gengibre branco (MARTINS *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2005). Ambas as plantas compõe a família botânica *Zingiberaceae*, constituída por 53

gêneros e um total de 1.200 espécies do entorno tropical asiático, África, até a América centro-sul (ALBUQUERQUE; NEVES, 2004; MARQUES; BIANCHINI; SOUZA, 2019).

A primeira identificação da espécie do gengibre foi realizada pelo botânico Willian Roscoe (1753-1813). No entanto, há registros históricos da utilização medicamentosa da planta a mais de 5.000 anos, no sudeste asiático, China e Índia (BISCHOFF-KONT, FÜRST, 2021).

O gengibre é uma planta herbácea, perene, que pode atingir em torno de 1,50 metros de altura, caule estruturado com a raiz ramificada horizontalmente (rizoma), sendo esta a parte nobre e por isso, comercializada mundialmente (PALMEIRA *et al.*, 2019). O rizoma da referida planta é rico em antioxidantes, utilizados na formulação de cosméticos, na alimentação como especiaria aromática, para compor o molho no preparo de carnes e peixes, doces e bebidas alcoólicas.

No Brasil, onde acontecem as comemorações de festa “junina”, o gengibre é um dos ingredientes principais para o tradicional quentão (bebida típica), além de constituir iguarias gastronômicas brasileiras, e internacionalmente compõe as cervejas artesanais produzidas na Alemanha e Jamaica (NICÁCIO *et al.*, 2018).

O gengibre apresenta sua comercialização em diferentes formas: *in natura*, cápsulas, pó, óleo essencial, cristalizado, desidratado e infusão, com o objetivo de se obter os benefícios terapêuticos do gengibre, conforme evidências científicas encontradas na literatura (DEMARTELAERE *et al.*, 2022; PALMEIRA *et al.*, 2019; RAMALHO, 2021).

Entre os benefícios fitoterápicos do uso medicinal do rizoma do gengibre, pode-se observar propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antipirético, diurético, ação contra problemas gastrointestinais como náuseas e vômitos, além de tratamento para gripe e resfriados (DE SÁ-FILHO *et al.*, 2021).

A outra espécie vegetal de interesse neste estudo é *Hedychium coronarium*, uma planta perene, caracterizada por ser uma monocotiledônia macrófita e gênero *Hedychium*, compreende em torno de 80 espécies, sendo originária de países no sudeste da Ásia, sul da China, Índia e Brasil, amplamente encontradas em regiões próximas à córregos de águas, locais úmidos, pelo motivo de se estabelecerem em locais alagados recebe a denominação de lírio de brejo, e por possuírem flores brancas que exalam perfume recebem também a denominação de gengibre-branco (COUTO; CORDEIRO, 2005; MARTINS *et al.*, 2010; PINHEIRO, 2018).

Do gênero *Hedychium* são extraídos óleos essenciais das folhas, flores e rizomas, de grande interesse comercial, ambiental e medicinal, pois cada parte que compõe a planta é utilizado para um fim, como por exemplo, na produção de papel, devido a presença de celulose

em sua haste representar 48% (FACUNDO; MOREIRA, 2005), e também no tratamento de efluentes contaminados por organismos patógenos (ALMEIDA; ALMEIDA, 2005).

Prakash *et al.* (2010) salientam as evidências antibacterianas dos rizomas da planta, frente às bactérias patogênicas. Os compostos bioativos presentes no óleo essencial de gengibre-branco são também caracterizados na literatura como antioxidante, anti-inflamatório e larvicida (RAY *et al.* 2017). Por outro lado, nas folhas da planta são extraídas substâncias medicinais para o tratamento complementar da malária e um diurético eficaz (LIMA *et al.*, 2006; RIBEIRO, 2013).

A seguir serão discutidos os aspectos relativos à resistência antibacteriana das cepas padrão de *Escherichia coli* ATCC® 25922™, além de quatro cepas isoladas das amostras de água do rio Lajeado Pardo, por FLACH (2021) aos extratos fracionados em cinco solventes distintos, das espécies vegetais *Zingiber officinale* e *Hedychium coronarium* (manuscrito 1), concluindo a pesquisa com algumas prospecções somatórias, do ponto de vista ambiental a fim de cooperar com novos estudos a respeito das propriedades das plantas em evidência.

3 CAPÍTULO 1 – MANUSCRITO 1. ANÁLISE DA SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *E. coli* AOS EXTRATOS DAS ESPÉCIES *Zingiber Officinale* e *Hedychium coronarium*

Analysis of the Antimicrobial Suscetitivy of *E. coli* to Extracts of *Zingiber Officinale* and *Hedychium coronarium*

RESUMO

A resistência antimicrobiana é um desafio ambiental e de saúde coletiva, de modo que busca-se por alternativas de tratamento. Frente a isso, as plantas medicinais se apresentam como promissoras, devido aos seus constituintes fitoquímicos. Por conseguinte, o presente trabalho teve como objetivo identificar os metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais de *Z. officinale* e *H. coronarium*, além de avaliar o potencial antimicrobiano mediante às cepas padrão de *E. coli* ATCC 25922 e isolados ambientais de *E. coli* do Lajeado Pardo, município de Frederico Westphalen, RS, a fim de contribuir desta forma com dados da atividade biológica dos extratos das plantas de interesse. Após os protocolos de coleta, moagem e secagem em estufa de ar forçado, ambas as plantas foram levadas à contínuas extrações por solventes orgânicos por critério de polaridade. Sucedeu-se então em cinco frações: hexano, éter etílico, clorofórmio, acetato de etila e aquoso. Obteve-se rendimentos gerais de 31,276% para *H. coronarium* e 22,699% para *Z. officinale*. Os fitocompostos foram identificados a partir da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG – MS), em que obteve-se os resultados de oito compostos em *Z. officinale* e cinco em *H. coronarium*. Representados pelas classes dos Terpenos (monoterpenos), Álcoois, em que os constituintes majoritários nas duas plantas foram Nerol, 2-Undecanona, Farnesol e Neral. No entanto em *Z. officinale* foi identificado ainda o Geranial e Linalol. A partir destes resultados observou-se maior eficiência na extração por acetato em *Z. officinale*. Para o ensaio da atividade antimicribiana, resultou-se em CIM (concentração inibitória mínima) para *E. coli* ATCC nas menores concentrações testadas: 5 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em ambas as espécies vegetais. Ao passo que os isolados ambientais apresentaram maior resistência aos extratos, com CIM que variou de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 320 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os extratos de *Z. officinale* atingiram valores de CIM satisfatórios para o solvente éter etílico, sendo a característica apolar desta fração com maior inibição. Enquanto que os extratos de *H. coronarium* apresentaram resultados nas concentrações intermediárias de 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 320 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CIM, sendo clorofórmio, a fração antimicrobiana bem sucedida frente a *E. coli*. Para CLM (concentração letal mínima), houveram concentrações letais apenas nas frações éter etílico e clorofórmio a partir de 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *H. coronarium* e 320 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para *Z. officinale*, inclusive na fração acetato. Os extratos aquosos de ambas as espécies vegetais foram insuficientes como agentes antimicrobianos nas concentrações testadas, tanto para CIM e CLM. Na sua totalidade, este estudo corrobora para sugerir a eficiência do uso das espécies vegetais mencionadas, bem como dos extratos metanólicos usados na extração de fitocompostos e que podem ser uma alternativa promissora contra microrganismos patogênicos.

Palavras-chave: Gengibre. Atividade biológica. Bactéria. Solventes. Polaridade.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is an environmental and public health challenge, so that alternatives for treatment are sought. Facing this, medicinal plants present themselves as promising, due to their phytochemical constituents. Therefore, the present work aimed to identify the secondary metabolites present in the plant extracts of *Z. officinale* and *H. coronarium*, as well as to evaluate the antimicrobial potential against standard strains of *E. coli* ATCC 25922 and environmental isolates of *E. coli* from Lajeado Pardo, municipality of Frederico Westphalen, RS, in order to contribute with data on the biological activity of the extracts of the plants of interest. After the protocols of collection, grinding and drying in forced air oven, both plants were taken to continuous extractions by organic solvents by polarity criteria. Five fractions were then obtained: hexane, ethyl ether, chloroform, ethyl acetate, and aqueous. Overall yields of 31.276% for *H. coronarium* and 22.699% for *Z. officinale* were obtained. The phytochemicals were identified from gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), in which the results of eight compounds in *Z. officinale* and five in *H. coronarium* were obtained. Represented by the classes of Terpenes (acyclic monoterpenes), Alcohols, in which the majority constituents in both plants were Nerol, 2- Undecanone, Farnesol and Neral. However, in *Z. officinale*: Geranial and Linalool were also identified. From these results it was observed greater efficiency in the extraction by acetate in *Z. officinale*. For the antimicrobial activity assay, it resulted in MIC (minimum inhibitory concentration) for *E. coli* ATCC in the lowest concentrations tested: 5 to 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, in both plant species. Whereas, the environmental isolates showed higher resistance to the extracts, with MIC ranging from 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 320 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The extracts of *Z. officinale* reached satisfactory MIC values for the ethyl ether solvent, being the apolar characteristic of this fraction with greater inhibition. While *H. coronarium* extracts showed results in the intermediate concentrations from 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 320 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of MIC, being chloroform, the antimicrobial fraction successful against *E. coli*. For MCL (minimum lethal concentration), there were lethal concentrations only in the ethyl ether and chloroform fractions from 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for *H. coronarium* and 320 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, for *Z. officinale*, including the acetate fraction. The aqueous extracts of both plant species were insufficient as antimicrobial agents at the concentrations tested for both MIC and CLM. In its totality, this study corroborates to suggest the efficiency of the use of the mentioned vegetal species, as well as the methanolic extracts used in the extraction of phytochemicals and that they can be a promising alternative against pathogenic microorganisms.

Keywords: Ginger. MIC. Biological activity. Gram-negative. Solvents. Polarity.

3.1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com o objetivo medicinal é uma prática milenar, passada de geração à geração. Estima-se que o uso de plantas com a finalidade curativa antecede o início das atividades agrícolas, há mais de 40 mil anos, pelos povos neandertais (DE ANDRADE *et al.*, 2021; WEYRICH *et al.*, 2017). Na farmacologia moderna, as plantas surgem como importante vertente natural no tratamento antimicrobiano, por meio da multiplicidade de compostos químicos presentes nas espécies vegetais que compõem a flora mundial (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Neste contexto, a família botânica Zingiberaceae é constituída por 53 gêneros e mais de 1.200 espécies encontradas mundialmente, sendo representada pelo gênero *Zingiber*, planta herbácea utilizada há mais de 5.000 anos, desde a antiguidade na forma medicinal, no nordeste da Índia, sudeste asiático e China (BISCHOFF-KONT, FÜRST, 2021; ZHANG *et al.*, 2020). O rizoma é a parte da planta com apelo comercial, por ser uma importante especiaria estrangeira, fortemente utilizada na culinária, em diversos países, bem como no desenvolvimento de cosméticos (ZADOROZHNA; MANGIERI, 2021).

Na literatura há comprovado potencial do rizoma do gengibre para tratar sintomas que acometem a população, como por exemplo, resfriados, náuseas e vômitos. Além disso, estudos recentes demonstram os benefícios dos compostos químicos presentes na planta, sendo eles, fenólicos e terpenos, responsáveis pelas atividades biológicas (antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e anticancerígena, proteção cardiovascular, antiobesidade, antidiabético, neuroprotetor, atividade antiemética) (MAO *et al.*, 2019; TARFAOUI *et al.*, 2022; TOWNSEND *et al.*, 2013).

No entorno da amplitude do conhecimento a respeito dos benefícios fitoquímicos das plantas, a indústria farmacêutica passou a agregar em suas fórmulas, princípios ativos naturais, tendo em vista a abundância da flora mundial, bem como uma alternativa que atenua os malefícios à saúde humana e ambiental, causados por compostos sintéticos presentes no mercado, como é o caso dos medicamentos antibióticos usados indevidamente, tanto na saúde pública coletiva quanto na medicina veterinária, pois são administradas altas dosagens para combater microrganismos e desta forma, desencadeando infecções por patógenos resistentes, a esse tratamento convencional (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

Mediante a problemática exposta anteriormente, em conjunto com a importância de buscar novos compostos naturais de interesse, esta pesquisa tem por objetivo identificar os metabólitos secundários presentes nos diferentes extratos vegetais dos rizomas de *Zingiber*

officinale e *Hedychium coronarium*, além de avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* das espécies, contribuindo desta forma com dados de caráter ambiental que contribuam para a disseminação do conhecimento das ciências ambientais.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Protocolos de extrações

O trabalho foi conduzido nas dependências da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) *campus* Frederico Westphalen, estado do Rio Grande do Sul, possuindo as seguintes coordenadas: latitude 27° 25' 43S, longitude 53° 43' 25 W e altitude média de 488 m.

A realização das etapas da pesquisa ocorreram no Laboratório de Microbiologia do Grupo de Pesquisa Gerenciamento Ambiental e Manejo de Recursos Hídricos (GMRH), além do aporte de material e análise cromatográfica na Central Analítica do referido *campus*.

Inicialmente, no mês de junho de 2022 adquiriu-se no comércio local, os rizomas de *Zingiber officinale* e foram trazidos imediatamente para o laboratório GMRH. Enquanto que para a espécie vegetal *Hedychium coronarium*, a coleta sucedeu-se na mesma época, nas imediações da universidade, utilizando apenas o rizoma de ambas as plantas, em todas as etapas do experimento (CUTRIM *et al.*, 2018). Os rizomas das plantas foram levados imediatamente à secagem em estufa de circulação de ar a uma temperatura de 50 °C durante cinco dias.

A etapa de secagem favorece a estabilização das propriedades químicas e biológicas da matéria-prima de interesse, visando a exatidão na dosagem, manuseio e acondicionamento dos extratos secos (COELHO, 2019; PERES; PESKE, 2016).

Após esta etapa houve a extração, direto do pó do rizoma da planta seca (20 g), anteriormente triturado em moinho de facas tipo *Willye*, a uma granulometria padrão 30 mesh, adicionadas a cada um dos sistemas independentes, em cartuchos com porosidade de 0,45 mm.

3.2.2 Obtenção do extrato bruto dos rizomas das espécies *Zingiber Officinale* e *Hedychium Coronarium*

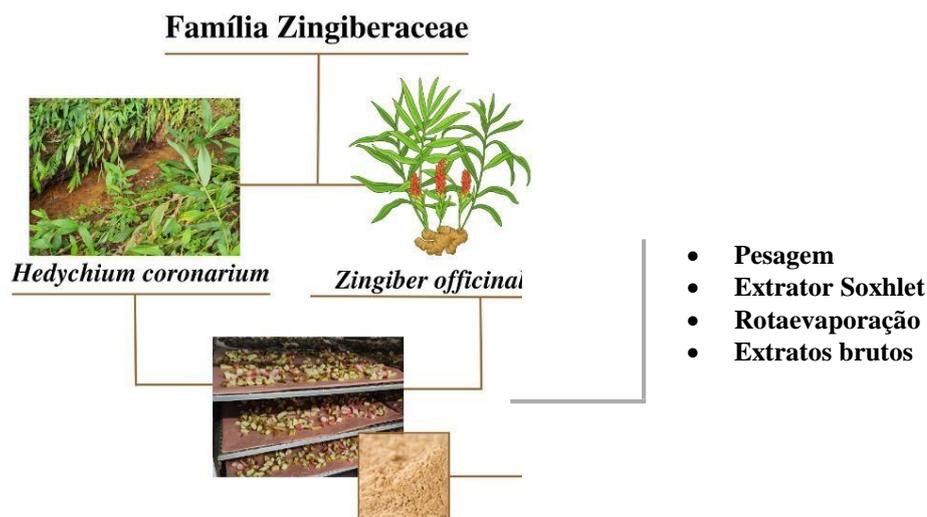
Para obtenção dos extratos dos rizomas de ambos os gengibres, sequencialmente à etapa de secagem e moagem das partes vegetais das plantas, utilizou-se separadamente 90 g da massa total da planta, que posteriormente foram fracionadas 30 g em três recipientes do equipamento Soxhlet, para a extração primária, totalizando 90 g de cada planta. O procedimento de extração

ocorreu até a exaustão, com transparência do solvente, por 23 horas contínuas de fluxo com solvente metanol, em aproximadamente 230 ciclos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

A partir destes extratos primários, os mesmos foram filtrados em membrana de 0,45 mm e rota evaporados até resultar em um conteúdo de aproximadamente 20% da quantidade inicial e o restante do metanol foi extraído em capela de fluxo de ar. Após esse processo, os extratos concentrados foram levados à estufa de circulação de ar, à 40 °C por sete dias e posteriormente pesados para determinar o rendimento.

A Figura 1 abaixo ilustra as etapas até o procedimento de preparo do extrato bruto das espécies vegetais.

Figura 1- Etapas iniciais de preparação dos extratos das plantas



Fonte: Própria autoria (2023).

3.2.3 Fracionamento neutro do extrato bruto metanólico

Após a secagem completa dos extratos metanólicos em estufa de circulação de ar à 40 °C, 20% das 30 g do extrato bruto de cada planta foram ressuspensos em 200 mL de água destilada e submetidos a um fracionamento neutro com solventes ativos de gradiente crescente de polaridade em funil de separação de líquidos. Os solventes escolhidos foram: hexano, éter etílico, clorofórmio, acetato de etila. A cada troca de solvente a solução aquosa remanescente era conservada e um novo gradiente adicionado a mesma. O processo se repetiu para todos os

solventes. Ao final do protocolo, obteve-se as frações hexânica, etérea, clorofórmica e acetato de etila neutras, além da fase aquosa remanescente das extrações. O critério de polaridade dos solventes ativos é importante para uma separação prévia de compostos secundários. Essas substâncias orgânicas funcionalizadas, são classificadas de acordo com suas características estruturais, que envolvem a presença de certos grupos químicos, os quais norteiam o uso adequado de diferentes gradientes de polaridade de solventes ativos durante o fracionamento do extrato bruto (SIMÕES *et al.*, 2010).

Por fim, cada fração foi separada e os solventes foram removidos das amostras em evaporador rotatório, e posteriormente as mesmas secas em estufa de circulação de ar, a 40 °C até total eliminação do solvente (Figura 2). Na sequência dos protocolos uma alíquota de cada amostra foi submetida a análises em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/MS). Os compostos identificados estão listados em tabelas no decorrer do texto, (Tabelas 1 e 2). Novas alíquotas desses extratos e frações foram retiradas para a realização das atividades biológicas, conforme procedimentos específicos.

Figura 2 – Esquema geral do método de partição e separação de compostos das plantas



Fonte: Própria autoria (2023).

3.2.4 Cultura Estoque *E. coli*

3.2.4.1 Isolamento das Bactérias Gram negativas

O isolamento bacteriano das amostras de água do rio Lajeado Pardo (município de Frederico Westphalen, região noroeste do estado do Rio Grande do Sul) foi realizado por FLACH (2021), no qual as colônias identificadas provenientes da água bruta, ou seja, isolados ambientais (S1, S2, S3 e S4) foram comparadas com o controle positivo *E. coli* ATCC® 25922™ (American Type Culture Collection).

As cepas foram armazenadas em cultura estoque para demais estudos. As culturas de estoque foram armazenadas a -20 °C em 80% de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), com 20% de glicerol (KOUADIO-NGBESSO *et al.*, 2019).

3.2.5 Procedimentos e reagentes para PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

3.2.5.1 Tampão para eletroforese

A solução de TBE foi feita com 108 g de Trisamino (Hidroximetil) Aminometano, 55 g de Ácido Bórico, 7,5 g de EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético tetrassódico), completando 1 L, em balão volumétrico, de água deionizada, conforme especificações do fabricante para reação de PCR.

3.2.5.2 Pré-Mix para PCR

O Pré-Mix utilizado na reação possui todos os reagentes básicos para a reação de PCR: tampão de reação (Tris (Hidroximetil) Aminometano e KCl), pH 8,4, concentração de 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTP e 2,5 U de Taq DNA Polimerase recombinante (Takara Bio®).

3.2.5.3 Preparo e diluição dos oligonucleotídeos – primers

Os primers foram diluídos em solução de estoque e solução de trabalho. A solução de estoque foi diluída em 10 vezes multiplicadas pela quantidade de primer em cada amostra. Para a solução de trabalho, foram retirados 10 µL da solução de estoque e a esta quantidade foram adicionados mais 100 µL de água ultrapura. Desse modo, a concentração final da solução de trabalho de 1 pmol/µL.

3.2.5.4 Quantificação dos reagentes para amplificação

Para cada reação, foram acrescentados a um microtubo de 200 µL (livre de DNase e RNase): 12,5 µL de Pré-Mix, 2,5 µL de cada primer (*forward e reverse*), 6,5 µL de água ultrapura e 1 µL de DNA molde em uma concentração aproximada de 5 ng, quantificados em espectrofotômetro UV, em comprimento de onda de 260 nm.

3.2.5.5 Amplificação em termociclador

A amplificação foi testada com diferentes parâmetros para padronizar a reação antes do experimento principal. Neste caso específico, o melhor ajuste encontrado para a reação foi de 1 ciclo inicial para desnaturação a 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos de três etapas: desnaturação (94 °C por 30 segundos), anelamento (55 °C por 30 segundos) e extensão (72 °C por 2,5 minutos). Por fim, foi programado mais 1 ciclo a 72 °C por 5 minutos de extensão no término da reação, conforme as especificações da empresa fabricante dos oligonucleotídeos e reagentes.

3.2.5.6 Ajuste de parâmetros para eletroforese

Na eletroforese em gel, o mesmo foi constituído em 1.000 g de agarose diluído em 100 mL da solução tampão TBE. O gel foi alocado em um recipiente chamado cuba de eletroforese e embebido à solução tampão condutora do campo elétrico. Em cada poço do gel foi adicionado 4 uL de amostra misturada da reação e 1 uL de corante. Os parâmetros para a eletroforese em gel de agarose, foram ajustadas de acordo com as sugestões já utilizadas na literatura. Considerando um valor de aproximadamente 10 V/cm entre eletrodos da cuba. Desse modo, foram testadas voltagens entre 60 e 100 V (considerando que a distância dos eletrodos da cuba utilizada é de 10 cm). A melhor resolução foi observada quando utilizou-se 70 V por 60 minutos. Portanto, o restante das amostras seguiram o mesmo padrão de metodologia.

3.2.7 Amplificação de cepas bacterianas isoladas

As cepas isoladas em meios seletivos foram amplificadas por meio da metodologia de reação em cadeia da polimerase – PCR, com o objetivo de visualizar sequências específicas de DNA que representam cada espécie ou gene estudado (SILVA; DOMINGUES, 2015; WALKER *et al.* 2017; VIEIRA, 2019).

3.2.8 Rendimento dos rizomas, extratos brutos e respectivas frações

A pesagem dos rizomas das plantas ocorreu de forma direta, através de balança de precisão, logo após a coleta dos gengibres (comercial e lírio do brejo) e ao término da etapa de secagem. O rendimento do extrato bruto foi determinado após a extração, rotaevaporação e evaporação total do solvente, obtendo-se apenas o extrato bruto, na forma de pó. Esse conteúdo foi pesado e submetido às extrações em frações, as quais sofreram o mesmo processo de retirada de solventes para pesagem.

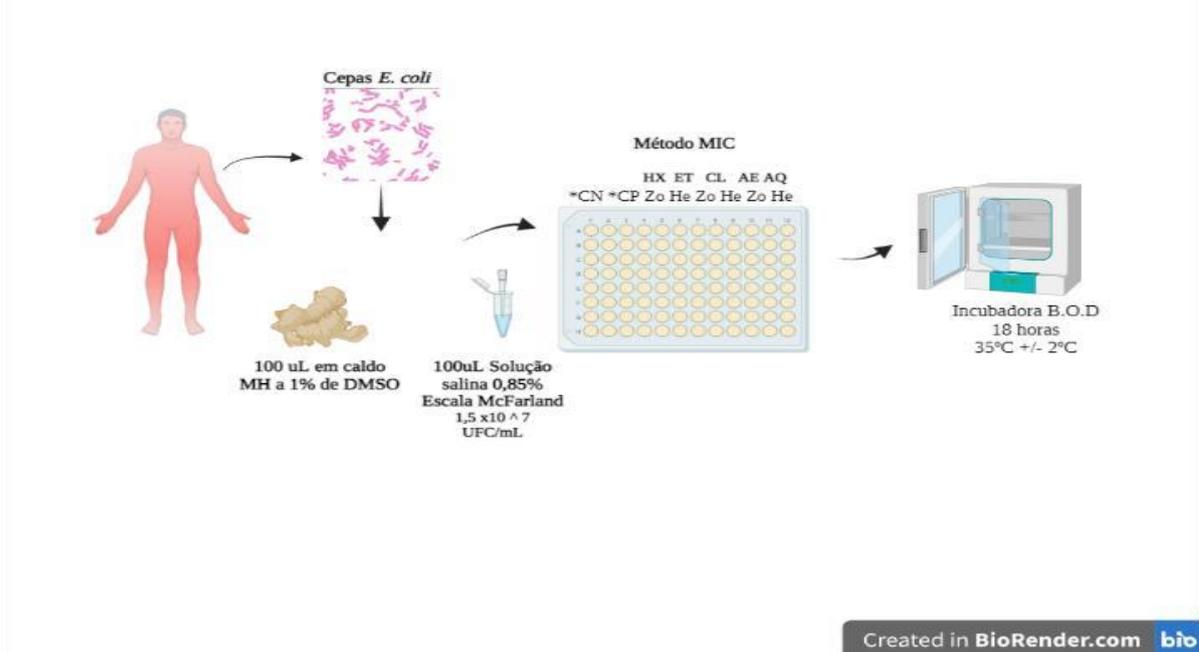
3.2.9 Testes de suscetibilidade bacteriana aos fitocompostos oriundos dos extratos de *Zingiber Officinale* e *Hedychium coronarium*

Para avaliar o potencial antibacteriano do extrato, foi conduzida esta etapa a partir da metodologia de microdiluição em caldo (MIC), a partir de testes *in vitro*, frente às cepas de bactérias *E. coli*, descritas anteriormente. As análises sucederam-se em placas de acrílico estéreis de 96 poços, com capacidade para 300 μL /poço (Figura 3). Cada teste foi conduzido em duplicata, com controle negativo, controle positivo e frações dos extratos obtidos, em 8 diferentes concentrações de 1 até 320 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para cada fração de extratos. Através desse método, foi possível identificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) (CLSI, 2020).

Os extratos foram diluídos em caldo Mueller Hinton cátion ajustado a 1% de DMSO. Cada poço recebeu 100 μL de caldo com extrato diluído na concentração desejada e 100 μL da solução salina a 0,85% com cepas bacterianas na concentração 10^7 , conforme a escala Mackfarland. Após o procedimento as placas foram levadas a incubadora B.O.D. a uma temperatura de 35 +/- 2 °C, por 18 horas (Figura 3).

O crescimento bacteriano nos poços da placa foi identificado a partir do indicador Cloreto de Trifenil Tetrazolio (TTC) em uma concentração de 1%, que confere a cor rosa aos poços, quando exposto à luz. Segundo Dos Santos (2019) a coloração de Gram confirma por meio da visibilidade colorimétrica e através da formação de material precipitado, a presença bacteriana nas amostras.

Figura 3 – Representação geral das etapas do teste MIC com distintas frações de solventes



Fonte: Própria autoria (2023) adaptado de BioRender.com

3.2.9.1 Análise dos fitocompostos dos rizomas das duas espécies de gengibre

Para a avaliação qualitativa e quantitativa dos extratos foi utilizado um cromatógrafo gasoso CG-3900 acoplado a um espectrômetro de massa Varian Saturn 2100T (GC/MS-SIS) e um injetor automático CP-8400 Auto sampler. Equipado com coluna capilar VF-5MS 30m x 0,25mm ID DF=0,25 com 5% de fenil e 95% de dimetilpolissiloxano, sendo que a identificação dos compostos foi feita com o auxílio das bibliotecas NIST para a comparação dos dados dos espectros e a quantificação de cada constituinte obtido por normalização de áreas de picos (%).

As condições utilizadas foram: Temperatura máxima de 325°C – (30 m x 0.32 mm, 0,25 μm); fluxo de gás Hélio de $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, pressão de 5,05 psi; temperatura do injetor 250°C ; seringa de 10 μL , com injeção de 1 μL ; temperatura inicial do forno de 70°C por 1 min. e rampa de aquecimento de $20^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 280°C . Fragmentação dos compostos foi processada por impacto de elétrons de 70V no espectrômetro de massas.

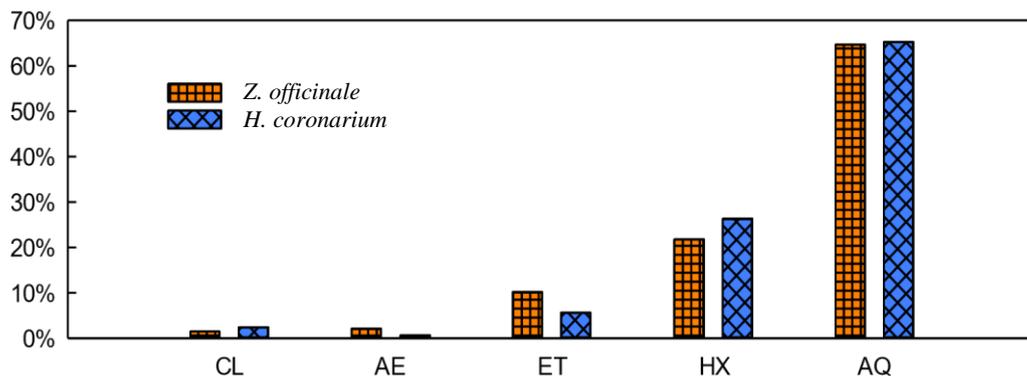
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Rendimentos dos extratos em frações

Os resultados obtidos a partir da confecção dos extratos brutos (90,00 g) de cada espécie vegetal: *Zingiber officinale* (*Z. officinale*) e *Hedychium coronarium* (*H. coronarium*), em distintas frações de solventes, apresentaram rendimentos gerais de 22,699 g (100%) para *Z. officinale* e 31,276 g (100%) para *H. coronarium*, respectivamente.

Na Figura 4 são apresentados os rendimentos resultantes das frações obtidas em cada solvente para cada planta, nos quais os resultados por solventes foram: CL (1,54%), AE (2,05%), ET (10,04%), HX (21,73%) e AQ (64,64%). Enquanto que para os extratos de *H. coronarium*, as frações obtidas foram: CL (2,35%), AE (0,61%), ET (5,60%), HX (26,22%) e AQ (65,21%).

Figura 4 – Rendimentos dos extratos das duas espécies vegetais em frações de acordo com os solventes



Fonte: Própria autoria (2023).

CL – clorofórmio; AE – acetato de etila; ET – éter etílico; HX – hexano; AQ – aquoso.

As frações em porcentagens acima de 50% revelaram que parte do extrato é composto por níveis de substâncias fortemente apolares (HX, ET, CL) e polares (AE e AQ). Os maiores rendimentos acima de 60%, em ambas as plantas foram obtidos na fração AQ. Por outro lado, Diemer (2016), a partir da metodologia de extração por arraste de vapor de água com o uso do aparelho Clevenger, obteve resultado inferior aos aqui observados, ao analisar o rizoma de *Z. officinale* (5,02%) em extrato aquoso. No mesmo sentido, Yehb *et al.* (2014) identificou valores de 15,84% e 10,86% em extrato aquoso de duas variedades de *Z. officinale*.

Em relação a fração com HX, esta representou maior rendimento nos extratos de *H. coronarium*, em torno de 26,22% e de 22% para *Z. officinale*, resultado superior a 50% em

relação aos demais solventes utilizados, demonstrando portanto ser o solvente com máximo rendimento entre os extratos apolares e indicando hexano, o mais eficiente para extrair compostos da classe dos terpenos (monoterpenos) SYAFITRY *et al.* (2018). Em contrapartida, os menores valores ficaram expressos nas frações CL (clorofórmio), seguidas de AE (acetato de etila) de ambos os extratos.

No entanto, esses rendimentos podem ser justificados, pois segundo Santos (2019) e Cabana *et al.* (2013) as diferenças dos rendimentos de cada fração em ambas as plantas podem estar relacionadas ao tempo de extração, a temperatura, além das peculiaridades de cada solvente, seja na solubilidade e ou arranjo molecular. Os solventes são rotineiramente usados nos procedimentos químicos e farmacêuticos, para extração à frio de compostos solúveis provenientes de um extrato sólido. As frações desses solventes apresentam características apolares ou polares, de hexano à clorofórmio (ARAÚJO, 2014; VALENTE, 2019).

Segundo Luchesi (2017), a capacidade produtiva do extrato vegetal está vinculada ao tipo de solvente e seu nível de polaridade, no qual poderá extrair variados compostos fitoquímicos e, dessa forma, tornando-se um extrato de alto valor comercial pela gama de atividades biológicas.

Por outro lado, para Santos (2018) e Soares *et al.* (2016) o melhor método a ser utilizado deve prever o tipo de extração (seletiva ou total), considerando a execução rápida, simplificada, com uso de solventes em níveis baixos de toxicidade, recicláveis e de baixo custo. Os resultados obtidos aqui, estão em conformidade com o objetivo do trabalho que é o fracionamento (seletividade) de compostos, embora os solventes possam apresentar toxicidade e esses se prestam ao fator seletividade.

3.3.2 Análise da composição fitoquímica dos extratos em diferentes solventes por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS)

A fração aquosa foi testada e não avaliada devido a percentagens insignificantes, comparada à potencialidade das extrações nos demais solventes testados. Nos resultados da prospecção fitoquímica, por cromatografia gasosa foi possível identificar a presença de cinco compostos na espécie *H. coronarium* (gingibre branco) (Tabela 1).

A identificação dos fitocompostos químicos das espécies é uma importante ferramenta para conhecer os metabólitos secundários e, conseqüentemente, as atividades biológicas das plantas, para tanto, o fracionamento dos extratos em solventes possibilita uma aferição rápida desses compostos biológicos ativos (DA CUNHA, 2009; VALENTE, 2019).

Na Tabela 1 são evidenciados os constituintes fitoquímicos encontrados nos rizomas das plantas de interesse, provenientes dos espectros obtidos por cromatografia gasosa, pela normalização da área de pico. Através do tempo de retenção e, com o uso da biblioteca NIST, foi realizada a identificação dos compostos. Na mesma, ainda são apresentados os valores correspondentes ao percentual de sua presença em relação a cada um dos solventes utilizados.

Tabela 1- Porcentagens dos compostos observados de *H. coronarium* e *Z. officinale*, através de extração com quatro solventes, obtidos por cromatografia a gás/detector seletivo de massa Varian Saturn 2100T (GC/MS-SIS) (2023).

Espécies	Extratos	Pico¹	TR²	Compostos	%A³
<i>H. coronarium</i>	Hexano	1	24,13	Nerol	85,126
		3	25,48	2-Undecanona	14,874
	100				
	Éter etílico	1	23,65	Neral	57,675
		2	28,47	Farnesol	42,325
	100				
	Clorofórmio	1	28,47	Farnesol	39,502
		2	30,05	NI	60,498
	100				
	Acetato de etila	1	23,65	Neral	26,675
		2	30,05	NI	73,324
	99,999				
<i>Z. officinale</i>	Hexano	1	24,13	Nerol	12,984
		2	24,7	Geranial	58,003
		3	25,48	2-Undecanona	13,585
		4	28,47	Farnesol	15,429
	100,001				
	Éter etílico	1	18,48	Linalol	8,485
		2	21,59	4,4-Dimetil-2-pentinal	5,175
		3	24,7	Geranial	8,31
		4	25,48	2-Undecanona	49,854
		5	28,47	Farnesol	7,586
		6	30,05	NI	20,59
	100				
	Clorofórmio	1	18,48	Linalol	4,7
		2	21,59	4,4-Dimetil-2-pentinal	25,406
		3	23,65	Neral	5,95
		4	24,13	Nerol	9,81
		5	24,7	Geranial	54,133
	99,999				
	Acetato de etila	1	18,48	Linalol	4,765
		2	23,65	Neral	11,296
		3	24,13	Nerol	49,5
		4	24,7	Geranial	6,249
		5	25,48	2-Undecanona	9,663
		6	28,47	Farnesol	9,43
7		30,05	NI	9,096	
99,999					

Fonte: Própria autoria (2023).

¹ Número de pico pela ordem de eluição da coluna; ² Tempo e retenção dos compostos na coluna cromatográfica em minutos;

³ Porcentagem da área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos compostos na amostra; NI: não identificado.

As extrações por solventes a partir do rizoma da planta *H. coronarium*, analisados por cromatografia gasosa resultaram em 2 picos identificáveis, ou seja, 2 compostos bioativos, em cada uma das frações, estando esses entre os tempos de retenção de 23,65 e 30,05 min (Tabela 1).

Dentre os constituintes majoritários encontrados no rizoma de *H. coronarium* identificou-se os metabólitos secundários: Nerol (85,125%) e 2-Undecanona (14,874%), na fração hexano; Neral (57,675%) e Farnesol (42,325%) na fração éter etílico, em que este último composto foi identificado também na fração clorofórmio e Neral (26,675%) na fração acetato de etila. Todos pertencem à classe dos terpenos (monoterpenos acíclicos) também denominados alcanos naturais e as funções químicas que desempenham é de álcoois, como o Nerol e aldeídos representado pelo composto Neral (CARDOSO, 2022).

No entanto, Gomes *et al.* (2016), conseguiu identificar 18 compostos orgânicos majoritários, Neral (9,64%), Farnesol (1,27%), Nerol (1,07%), 2-Undecanona (0,63%) e 1,1 Diciclopropileno (0,55%), através da espectrometria de massas. Porém esses utilizaram a fração que contém os óleos essenciais presente no rizoma de *Z. officinale*. No presente trabalho os mesmo compostos observados pelos autores anteriormente citados, foram encontrados para espécie *H. coronarium*, porém em proporções distintas, por se tratar de frações diferentes. O que evidencia uma equidade na composição química dessas plantas pertencentes à família *Zingiberaceae*.

A priori, na busca por identificar constituintes químicos, a biblioteca NIST (2022) reporta à Nerol, outras nomenclaturas, como Geraniol. Este por sua vez representa um importante composto orgânico presente nos óleos essenciais do gengibre, e suas ações biológicas são citadas à antimicrobiano, antioxidante e anti-inflamatório já divulgados na literatura (SILVA *et al.*, 2021; VINOTHKUMAR *et al.*, 2012).

Estudos realizados por Ribeiro (2013), identificou nove constituintes majoritários, na extração por hidrodestilação durante quatro horas, do óleo dos rizomas e das folhas, cerca de 23 constituintes de *H. coronarium*, identificando β -pineno e 1,8 cineol, os principais constituintes do óleo essencial extraído do rizoma. No entanto, o método de extração utilizado no presente trabalho não identificou esses compostos, uma vez que os mesmos evidenciados são compostos voláteis e os mencionados acima são fixos e retidos em óleos extraídos da planta (MARTINS, 2010; MIRANDA *et al.*, 2016; RIBEIRO, 2013).

Aqui, mais uma vez, fica claro que a extração de compostos depende de fatores como o tempo de extração, a polaridade do solvente, a temperatura, o modo (à frio, ou à quente), também irá definir quais compostos de interesse serão identificados nas plantas (LI *et al.*, 2021). Nesse

sentido, em estudos realizado por Munda *et al.* (2018), compararam os extratos entre o gengibre fresco e o seco, em relação à porcentagem de compostos presentes na extração do óleo de *Z. officinale*, em que constaram menores teores de monoterpenos acíclicos (álcoois e aldeídos) no gengibre seco, demonstrando que o processo de secagem acarreta na perda de compostos.

Por conseguinte, ainda na Tabela 1 seguem os constituintes fitoquímicos encontrados no rizoma de *Z. officinale*, provenientes dos espectros obtidos por cromatografia gasosa.

Os resultados evidenciam um número de picos diferentes em cada fração, sendo éter etílico e acetato de etila, com o mesmo número de sinais (picos) entre os tempos de retenção de 18,48 à 30,05 min. Sendo possível observar quatro constituintes na fração hexano, cinco na fração éter etílico, cinco na fração clorofórmio e seis na fração acetato de etila. A fração hexano apresentou o menor número de compostos, sendo destaque para Geranial (58,003%) o composto majoritário. Em éter o composto majoritário foi 2-Undecanona (49,854%). Para a fração clorofórmio o destaque foi para o constituinte Geranial (54,133%), próximo da porcentagem encontrada em hexano, do mesmo composto. O composto Nerol foi identificado na fração acetato de etila com 49,5%, de um total de 99,999% a 100% encontrado nas amostras.

Estes constituintes de relevância na extração do rizoma e folhas de gengibre foram identificados por Cutrim *et al.* (2019), a partir da hidrodestilação em equipamento Clevenger, em que obteve óleo essencial. Os autores, observaram valores para os constituintes Nerol (1,07%) e Farnesol (1,27%), significativamente menores às porcentagens observadas no presente trabalho, obtidos por extração com solventes de distintas polaridades.

Da mesma forma, nos resultados obtidos por Diemer (2016), que encontrou 12 compostos químicos majoritários no óleo essencial de gengibre, destacando-se o Geranial (15,71%) e Neral (10,61%). Sendo que no presente trabalho, com uso de extração por solventes, a fração que utilizou o hexano resultou em 58,003% de Geranial e Neral na fração acetato de etila 11,296%.

Estudos realizados por Andrade *et al.* (2012), obtiveram resultados semelhantes com a extração do óleo essencial de gengibre. Os compostos encontrados que se igualaram aos evidenciados pela extração em distintos solventes de *Z. officinale* foram: Linalol (1,80%), Neral (16,47), Geranial (25,06%), 2-Undecanona (0,60%), em diferentes tempos de retenção em coluna cromatográfica.

Os resultados encontrados em ambas as pesquisas corroboram para a similaridade de compostos extraídos em distintos solventes e até mesmo em porcentagens vantajosas em relação ao processo extrativo, para os compostos Geranial, Neral, 2-Undecanona e Linalol. Um dos constituintes majoritários Geranial é um importante composto volátil entre os monoterpenos,

identificados nas extrações por distintos solventes, em que observa-se maiores porcentagens no extrato hexano e clorofórmio, enquanto que nos extratos de éter etílico e acetato de etila apresentou porcentagens inferiores, provavelmente explicado pelo fato de afinidade química dos solventes apolares em extrair a classe de compostos dos terpenos (VALENTE, 2019).

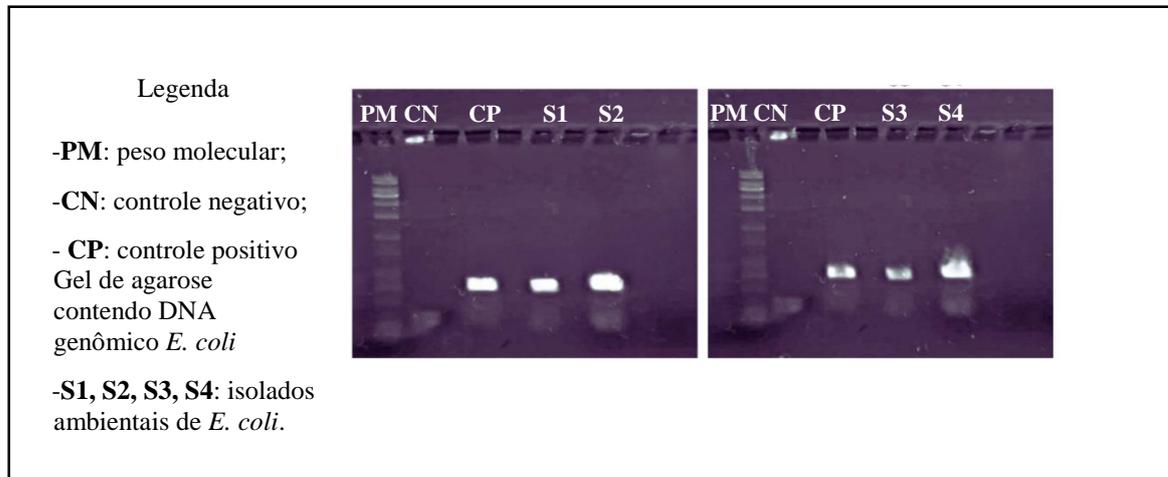
Liu, Liu, Zhang (2019), identificaram em respectiva revisão bibliográfica acerca da espécie *Z. officinale*, 194 tipos de constituintes voláteis em diferentes regiões da China, sendo um fator a ser considerado o que se refere sobre o ambiente de crescimento da planta. Entre os constituintes identificados encontram-se Nerol, Linalol, Farnesol, 2-Udecanona, Neral e Geranial, evidenciados também nas extrações por solventes orgânicos do rizoma de uma espécie de gengibre, no presente trabalho.

Entre os constituintes majoritários não voláteis (fixos), como as classes dos fenólicos (gingeróis) e sesquiterpenos (zingibereno), comprovados na literatura como atuantes na atividade antimicrobiana, e os quais não foram encontrados nos extratos da presente pesquisa, pode-se inferir que estes compostos bioativos são termolábeis, apresentando maiores concentrações nos rizomas frescos de gengibre, sendo assim, o processo de secagem pode interferir na extração destes importantes compostos (CRISTOFEL, 2018).

3.3.3 Conferição de genes associados à agentes etiológicos por meio da PCR

No Quadro 2 visualiza-se o resultado da eletroforese em gel, dos isolados ambientais (S1, S2, S3 e S4) em quatro bateladas, onde foi possível comparar as espécies de *E. coli*, após a amplificação, por meio do padrão de peso molecular (PM) à esquerda, ao lado o controle negativo(CN), o controle positivo com a bactéria *E. coli* ATCC (CP) e por fim os isolados ambientais. Os resultados foram positivos para S1, S2, S3 e S4, em meio de crescimento bacteriano seletivo, conforme evidenciados em testes de colilert (fluorescência azul para presença de *E. coli*).

Quadro 2 - Triagem de *E.coli* identificadas na amplificação das fitas molde



Fonte: Própria autoria (2023).

A técnica da PCR é considerada uma importante ferramenta na avaliação de microrganismos patogênicos, vinculados à características de resistência aos antimicrobianos, além de possuir vantagens de agilidade na realização da técnica através de uma reação amplificada desenhada de regiões recorrentes de DNA genômico (VIEIRA, 2019). A amplificação do DNA *in vitro* do agente patogênico em maiores níveis de especificidade e sensibilidade, ultrapassando etapas de confirmação, ressaltando a eficiência desse método (OLIVER *et al.*, 2014; VIEIRA, 2019).

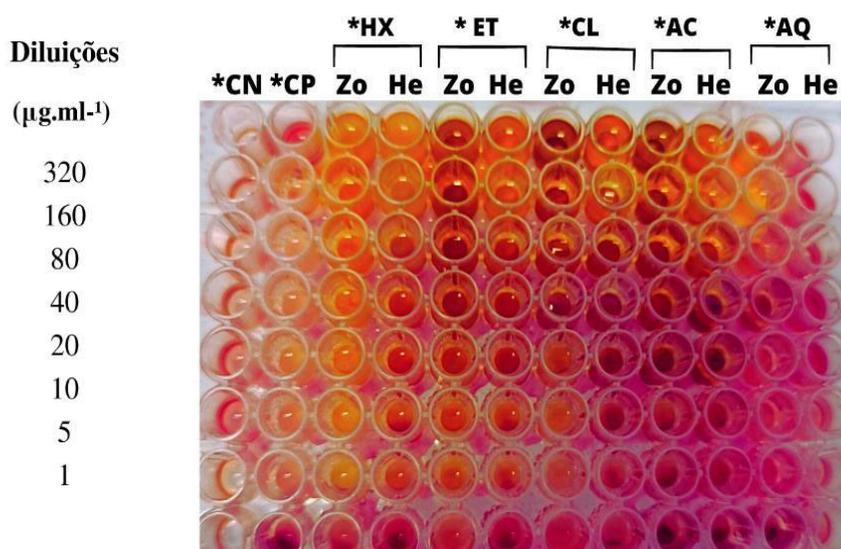
Conforme Moreira *et al.* (2018), o somatório de benefícios da introdução biológica molecular, ampliou os diagnósticos medicinais, visto que a importante ferramenta do PCR para detecção de microrganismos patogênicos, acelerou a confirmação de exames clínicos mediante o uso desta técnica de amplificação e com isto, maior agilidade no tratamento indicado.

A agilidade na ampliação do DNA genômico de bactérias Gram-negativas, como é o caso da *E. coli*, em que a ação patogênica do microrganismo ataca a defesa imunológica do indivíduo tornando-o suscetível a uma série diferentes sintomas, podendo ocorrer por via intestinal ou extraintestinal (ITU's) (FRATAMICO *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2018).

3.3.4 Análise da potencialidade antimicrobiana dos extratos de *Zingiber officinale* e *Hedychium coronarium* em distintos solventes

Na figura 5 é apresentada uma imagem do teste MIC, onde pode ser observada a ação dos cinco extratos orgânicos, das espécies *H. coronarium* e *Z. officinale*, frente a bactéria *E. coli* ATCC e os isolados ambientais (cepas S1 e S3). Os resultados da análise para ambas as espécies vegetais são apresentados na Tabelas 2, respectivamente.

Figura 5 – Teste MIC dos extratos das espécies *Z. officinale* e *H. coronarium* frente as cepas bacterianas de *E. coli*



Fonte: Própria autoria (2023).

*CN – Controle Negativo; *CP – Controle Positivo; *HX - hexano;
*ET- éter etílico; *CL – clorofórmio; *AC - acetato; *AQ - aquoso;
Zo - *Zingiber officinale*; He – *Hedychium coronarium*.

Na tabela 2 são apresentados os resultados para a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração letal mínima (CLM) da espécie *Z. officinale* e *H. coronarium*. A concentração inibitória mínima (CIM) representa a menor concentração do agente antibacteriano, neste caso, os extratos fracionados das plantas. Bem como a ação dos mesmos sobre a CLM (concentração

letal mínima) dos agentes antimicrobianos sob as cepas padrão *E. coli* ATCC 25922 e os isolados ambientais (S1, S2, S3 e S4).

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana avaliada através de duas metodologias (CIM e CLM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)) com utilização de extratos das espécies vegetais *Z. officinale* e *H. coronarium*, extraídos através de cinco solventes distintos (2023).

Microorganismos	<i>Z. officinale</i>									
	Hexano		Éter		Clorofórmio		Acetato		Aquoso	
	CIM / CLM*	>320	CIM / CLM*	>320	CIM / CLM*	>320	CIM / CLM*	>320	CIM / CLM*	>320
ATCC	5	>320	5	320	5	320	10	>320	>320	>320
S1	160	>320	20	>320	80	>320	80	>320	>320	>320
S2	160	>320	20	>320	80	>320	20	>320	>320	>320
S3	80	>320	20	>320	20	>320	80	>320	>320	>320
S4	320	>320	80	>320	160	>320	80	>320	>320	>320

Microorganismos	<i>H. coronarium</i>									
	Hexano		Éter		Clorofórmio		Acetato		Aquoso	
	CIM / CLM*	>320	CIM / CLM*	>320	CIM / CLM*	>320	CIM / CLM*	>320	CIM / CLM*	>320
ATCC	5	>320	5	160	10	>320	5	320	>320	>320
S1	320	>320	320	>320	160	>320	320	320	>320	>320
S2	320	>320	80	>320	80	>320	320	320	>320	>320
S3	320	>320	160	>320	80	>320	320	320	>320	>320
S4	320	>320	320	>320	80	>320	>320	320	>320	>320

* $\mu\text{.mL}^{-1}$

Fonte: Própria autoria (2023).

Segundo Aligiannis *et al.* (2001) pode-se utilizar como parâmetro para a classificação da atividade antimicrobiana de substâncias vegetais a seguinte escala: CIM até 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (forte inibição), CIM a partir de 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (inibição moderada) e CIM acima de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (inibição fraca). A partir dessa escala comparou-se os resultados para CIM dos extratos da espécie *Z. officinale*.

Assim, houve maior sensibilidade ao agente antimicrobiano, da cepa padrão ATCC de *E. coli*, através das menores concentrações de inibição testadas (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), atingidas pelas frações de hexano, éter, clorofórmio e acetato, com exceção da fração aquosa. Dentro da classificação de atividade antimicrobiana, pode-se afirmar uma inibição forte à cepa padrão ATCC de *E. coli*, mediante os quatro extratos vegetais.

Enquanto que a fração que obteve maior resultado de inibição frente as cepas dos isolados ambientais foi a fração éter, onde ocorreram inibições em S1, S2 e S3, com CIM de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, uma das menores concentrações testadas.

Mediante a literatura, os constituintes voláteis Nerol, Neral e citral (Geranial + Neral), conferem aroma e sabor aos óleos essenciais e foram encontrados nos resultados de Pierotto (2018) e Silva *et al.* (2021), como uma promissora atividade biológica anticancerígena. No entanto, para atividade antimicrobiana frente as cepas de *E. coli* testadas nesta pesquisa, as mesmas mostraram-se resistentes aos extratos que continham tais constituintes nas frações clorofórmio e acetato de etila.

Agrawal *et al.* (2018) obteve resultado de CIM ($625 \mu\text{g.mL}^{-1}$) demonstrando um fator inibidor moderado, com a extração do óleo essencial do rizoma de gengibre, por clorofórmio e acetato de etila, frente a cepa de *E. coli*, com a concentração inibitória maior do que a máxima testada no presente trabalho ($320 \mu\text{g.mL}^{-1}$), a partir de extrações com os mesmos tipos de solvente. Ainda conforme o estudo realizado por Agrawal *et al.* (2018) foi possível observar entre as bactérias aferidas, *E. coli* é apontada como a mais resistente entre as demais testadas e embora comprovada a ação antimicrobiana do rizoma da espécie *Z. officinale*, este recebeu a última posição na ordem de efeito inibidor mediante a bactéria Gram – negativa.

Uma provável resposta ao resultado encontrado no presente trabalho, com a ineficiência do extrato aquoso, perante a bactéria Gram – negativa *E. coli*, seja pelo fato desta fração mais polar de *Z. officinale* apresentar maior atividade antimicrobiana em bactérias Gram – positivas (CHAKRABORTY *et al.*, 2017).

Em contrapartida, os isolados ambientais de *E. coli* corresponderam as mesmas expectativas, porém em valores para CIM mais elevados, a partir de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$, nas frações éter, clorofórmio e acetato; $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $320 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na fração hexano. Outro destaque está evidenciado pelos resultados de inibição da cepa ambiental S4, em que a mesma demonstrou maior resistência frente a todos os agentes antimicrobianos, com valores de CIM nas maiores concentrações testadas, sendo possível constatar que as cepas ambientais isoladas da água oriunda do rio Lajeado Pardo, passaram por modificações genéticas e adquiriram genes de resistência antimicrobiana de fármacos sintéticos e de origem natural.

O extrato aquoso de *Z. officinale* não demonstrou ação inibidora contra nenhuma das cepas de *E. coli* testadas, até a máxima concentração ($320 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Resultado semelhante evidenciado no trabalho de Yousfi *et al.* (2021), em que não houve qualquer efeito antimicrobiano do extrato aquoso da mesma espécie vegetal e relacionada a mesma cepa padrão *E. coli* ATCC 25922. Segundo Beristain – Bauza *et al.* (2019), o fraco potencial do extrato aquoso se deve aos compostos bioativos de *Z. officinale* serem insolúveis em água.

Ao passo que resultados obtido por Švarc-Gajić *et al.* (2017), com óleo essencial da mesma planta, a extração por água subcrítica revelou valores de CIM entre 19,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 39,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, frente a bactéria *E. coli*, a mesma cepa padrão testada no presente estudo. Chakraborty *et al.* (2014), obteve resultados com a extração aquosa de *Z. officinale* com CIM de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ através do método de disco difusão, diferentemente do resultado obtido no presente trabalho com a técnica MIC.

Resultados obtidos por Malu (2009), a respeito da atividade antibacteriana dos extratos HX, AE e AQ de *Z. officinale*, corroboram para esta discussão, tendo em vista que as melhores frações antimicrobianas da planta, foram os extratos apolares HX e AE já citados, frente às bactérias Gram- positivas *Staphilococcus epidermidis* e *Streptococcus viridans*. Houveram também inibições para *E. coli*, com as mesmas frações, porém nas concentrações máximas de inibição. Ao passo em que a fração Água, não apresentou resultados para nenhuma microrganismo testado, sendo semelhante aos resultados obtidos na presente pesquisa. Andrade *et al.* (2012) e Cutrim *et al.* (2019) evidenciaram em suas pesquisas, uma maior resistência de bactérias Gram- negativas ao óleo essencial extraído da espécie *Zingiber officinale*, diferentemente das bactérias Gram- positivas são mais suscetíveis ao agente antimicrobiano. No entanto, os constituintes encontrados, entre outros não evidenciados no atual estudo, foram significativos para inibir a resistência *in vitro*, da cepa bacteriana *E. coli*, em comparação com o óleo essencial da espécie *Rosmarinus officinalis* (alecrim).

Aspectos trazidos por Myers e Clark (2021), a respeito da resistência de bactérias Gram-negativas, em que segundo os autores, tais microrganismos patogênicos possuem duas membranas, sendo que a externa é polar, e ao associar esta informação aos resultados obtidos, das melhores frações orgânicas de *Z. officinale*, os quais as cepas testadas foram de modo geral, menos resistentes, são nas escalas mais polares (Tabela 2), embora não evidente na fração aquosa. Segundo Myers e Clark (2021), com o aumento da polaridade do agente antibacteriano, assemelha-se as características químicas dos antibióticos convencionais, tendo em vista a potencialidade biológica das espécies vegetais.

Com relação aos resultados da concentração letal mínima (CLM), ou seja, a concentração bactericida mínima, em que o crescimento bacteriano não é visível em meio ao tratamento estabelecido (BARROS, 2021). Dados de CLM expressos na Tabela 2, evidenciam o caráter insuficiente na totalidade dos extratos fracionados de *Z. officinale* e *H. coronarium*, frente aos isolados ambientais testados. No entanto, houve inibição bactericida em duas frações dos extratos, éter e clorofórmio, em *Z. officinale* e além destes extratos, na fração acetato em *H.*

coronarium, perante a cepa padrão de *E. coli*, nas maiores concentrações examinadas, comprovando a resistência bactericida encontradas nos isolados ambientais coletados no rio Lajeado Pardo, aos agentes antimicrobianos de gengibre. Yousfi *et al.* (2021), obteve resultado em seu extrato de acetato de etila da espécie *Z. officinale*, de modo mais efetivo nas estirpes bacterianas gram-positivas, do que as gram-negativas testadas, fortalecendo os resultados obtidos, os quais demonstram maior resistência bacteriana de *E. coli*, aos extratos de gengibre.

A tabela 2 expressa ainda os resultados obtidos através da metodologia MIC, a partir dos extratos de *H. coronarium* apresentando os efeitos de CIM/CLM das frações hexano, éter, clorofórmio, acetato e água, frente as cepas *E. coli* ATCC 25922 e aos quatro isolados ambientais (S1, S2, S3 e S4) isoladas e testadas. Observando os dados percebe-se que em todas as frações houveram suscetibilidades antibacterianas dos extratos perante a cepa ATCC, em concentrações mínimas igualmente identificadas nos resultados apresentados com os extratos de *Z. officinale* ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), portanto, da mesma forma, evidenciando uma forte inibição dos extratos de *Hedychium coronarium* à cepa padrão.

Entre as isolados ambientais testados às concentrações de inibição, ocorreram variações de CIM ($80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $320 \mu\text{g.mL}^{-1}$), demonstrando um perfil de suscetibilidade nas maiores concentrações averiguadas. Nagore, Lokhande e Mujawar (2022) obtiveram resultados distintos por meio do método da microdiluição em caldo de $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para CIM, frente a cepa *E. coli* MTCC 443, a partir da extração por hidrodestilação do óleo essencial do rizoma de gengibre-branco, com aparelho Clevenger.

Os resultados evidenciados nas cepas ambientais de *E. coli* demonstram nas frações Hexano e Acetato de etila, valores de inibição na maior concentração testada, exceto no isolado S4 em que não houve inibição da fração Acetato. Em outro estudo com o uso do extrato fracionado pelo solvente acetato de etila, do óleo essencial do rizoma da espécie *Hedychium coronarium*, pelo método de disco difusão, observou-se um valor para CIM ainda menor de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$, contra uma cepa de bactéria gram-negativa (AZIZ, HABIB, KARIM, 2009).

Por conseguinte, pode-se atentar para as frações Éter e Clorofórmio, onde ambas obtiveram ações inibitórias mínimas nas concentrações ($80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $320 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e ($80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivamente baixas comparadas às obtidas por hexano e Acetato versus às cepas ambientais (S2 e S3). A cepa S1 apresentou resultados idênticos nas frações hexano e éter, e ao fato que houve maior suscetibilidade desta cepa ao extrato clorofórmico, com menor valor de CIM ($160 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Miranda *et al.* (2016) obtiveram resultados para CIM de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do óleo essencial das folhas de *H. coronarium*, em que a bactéria gram-negativa *E. coli* foi inibida pelo extrato da planta.

No que tange aos resultados obtidos da CLM dos extratos obtidos a partir dos diferentes solventes, o caráter bactericida (CLM) foi alcançado parcialmente pelo extratos clorofórmio e acetado para ambas as espécies vegetais, na maior concentração testada, e no extrato éter da espécie *H. coronarium*, com CLM de $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para os isolados ambientais. Todavia os resultados da CLM dos extratos foram diferentes para A cepa padrão ATCC, visto que houve suscetibilidade da mesma, às frações éter, clorofórmio de *H. coronarium*, nas maiores concentrações testadas, porém se diferenciando da fração éter de *Z. officinale*, em que a CIM foi mais elevada frente a cepa bacteriana padrão de *E. coli*.

Na fração água, os resultados de CIM e CLM foram semelhantes aos encontrados em *Z. officinale*, não havendo suscetibilidade dos microrganismos aos extratos aquosos de ambas as plantas testados até a concentração máxima. Possivelmente os resultados dos extratos aquosos não terem sido satisfatórios, devido à polaridade da água que dificulta a solubilidade da maioria dos compostos evidenciados nas plantas a esta fração polar, frente à uma bactéria gram-negativa, visto que são mais inibidoras das gram-positivas.

3.4 CONCLUSÕES

Constatou-se a presença de sete fitocompostos nos extratos da planta *Z. officinale*, sendo Geranial, 2-Undecanona e Nerol, os compostos majoritários. Ao passo que *H. coronarium*, apresentou quatro compostos fitoquímicos, sendo Nerol, Farnesol e Neral, os majoritários, extraídos por diferentes solventes.

A partir da análise qualitativa cromatográfica, muito embora, fatores internos (genética) e externos (ambiente e colheita) às plantas, influenciem na qualificação dos compostos bioativos, houve semelhanças entre os mesmos em ambas às plantas, com destaque para maiores concentrações dos fitocompostos identificados na planta *Z. officinale*.

O método de extração em frações por diferentes solventes demonstrou resultados em termos de rendimento, para os extratos aquoso e hexano, nas duas espécies vegetais, sendo o maior rendimento para o solvente aquoso e o menor para os solventes acetato e clorofórmio, tanto para *H. coronarium* quanto *Z. officinale*, respectivamente.

Os resultados dos ensaios da atividade antimicrobiana através da metodologia de CIM e CLM, demonstrou que a primeira identificou-se efeito antibacteriano nas menores concentrações testadas, nas frações hexano, éter, clorofórmio e acetato, frente à cepa padrão ATCC *E. coli*, dos extratos de *Z. officinale* e *H. coronarium*. Entre os isolados ambientais, S3 demonstrou maior sensibilidade nas concentrações intermediárias, aos extratos antimicrobianos de *Z. officinale*, em todas as frações, exceto a fração aquosa, que não obteve efeito sob nenhuma estirpe bacteriana testada, tanto para CIM quanto para CLM, em ambas as plantas utilizadas no estudo.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P.; D.; KOLLURU, VC. Análise comparativa da atividade antimicrobiana de extratos de ervas contra micróbios patogênicos. **Avanços em Bioquímica e Biotecnologia**, v. 10, p. 2574-2578, 2018a,b. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/4abb/4a1bcbcf1bd8b25ace83e05358bb1613b653.pdf>>. Acesso em: 04 fev. 2023. DOI: 10.29011/2574-7258. 000063.
- ALBERTI, M. A. *et al.* The challenge of urban food production and sustainable water use: Current situation and future perspectives of the urban agriculture in Brazil and Italy. **Sustainable Cities and Society**, v. 83, p. 103961, Ago. 2022. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2210670722002815?token=1EB98456016871618F01D3303365042CEC3DB23D66D5F560AFFD7243134FA41E5730103C4A840576C3A6C57404D93726&originRegion=us-east-1&originCreation=20220822135233>. Acesso em: 16 jul. 2022. DOI:10.1016/j.scs.2022.103961.
- ALIGIANNIS, N. *et al.* Composição e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de duas espécies de *Origanum*. **Revista de química agrícola e alimentar**, v. 49, n. 9, pág. 4168-4170, 2001. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf001494m?casa_token=5NqRIRxiH6MAAAAA%3AwR2yW7Z_5Vo510XoGXUTd97SznPte61D28axnUs_u_tq9OP4XIMkGJ9oB7XCcxDcl9dtPbYFkDJmaui>. Acesso em: 05 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf001494m>.
- ANDRADE, M. A. *et al.* Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 399-408, 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rca/a/BwBhC5BshjJswWT3VW4Wfnc/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 04 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-66902012000200025>.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Notificação de eventos adversos a medicamentos**. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias/anvisa/2021/anvisa-alerta-para-riscos-do-uso-indiscriminado-demedicamentos/20213103_comunicado_ggmon_003_2021.pdf. Acesso em: 27 de maio 2022.
- ARBEX, M. A. *et al.* A poluição do ar e o sistema respiratório. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, p. 643-655, Out. 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/sD3cLkXqQwmDFpgzsyj7gBm/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 06 jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132012000500015>.
- AZIZ, M. A. *et al.* Antibacterial and cytotoxic activities of *Hedychium coronarium* J. Koenig. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 969-972, 2009. Disponível em: <<http://www.aensiweb.net/AENSIWEB/rjabs/rjabs/2009/969-972.pdf>>. Acesso em: 06 fev. 2023.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, Saad K.. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 6, n. 2, p.

71-79, 2016. Disponível

em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177915300150>>. Acesso em: 24 set. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.

BARRETO, J. M. B.; MACIEL, N. F.; GARCIA, D. S.

Siqueira. 13 Plantas Medicinais e COVID-19: Expectativas de Investimento em Produção de Fitoterápicos no Cenário Pós-Pandemia no Brasil. *In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL-GOVERNANÇA E SUSTENTABILIDADE*, 16, 2020. Itajaí. **Anais de Constitucionalismo, Transnacionalidade e Sustentabilidade**. Itajaí: UNIVALI, 2020, p. 177-186.

BARROS, A. V.. **Avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme in vitro de óleos essenciais de plantas condimentares sobre bactérias potencialmente patogênicas**. 2021. Dissertação (Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

BERISTAIN, B., DEL CARMEN, S. *et al.* Antimicrobial activity of ginger (*Zingiber officinale*) and its application in food products. **Food Reviews International**, v. 35, n. 5, p. 407-426, 2019. Disponível em:< [Antimicrobial Activity of Ginger \(Zingiber Officinale\) and Its Application in Food Products: Food Reviews International: Vol 35, No 5 \(tandfonline.com\)](https://www.tandfonline.com/doi/10.1080/10407813.2019.1644444)>. Acesso em: 05 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.07.010>.

BISCHOFF-KONT, I.; FÜRST, R. Benefits of ginger and its constituent 6-shogaol in inhibiting inflammatory processes. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 6, p. 571, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8247/14/6/571>. Acesso em: 03 set. 2022. DOI:<https://doi.org/10.3390/ph14060571>.

BIHAREE, A. *et al.* Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104720, Oct. 2020. Disponível em:<<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0367326X20303026?token=3E14ED8512BEE45062039B1ED4051E8FFA59727217BF8354BEB732CFCB43CFDEF0E370A9C6279B5DC9AAE0588AB498DF&originRegion=us-east-1&originCreation=20220906132015>>. Acesso em 21 ago. 2022. DOI:10.1016/j.fitote.2020.104720.

BISCHOFF-KONT, I.; FÜRST, R.. Benefits of ginger and its constituent 6-shogaol in inhibiting inflammatory processes. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 6, p. 571, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8247/14/6/571>. Acesso em: 03 set. 2022. DOI:<https://doi.org/10.3390/ph14060571>.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**. Módulo 6: Detecção e Identificação e Bactérias de Importância Médica, Brasília, p. 150, v. 9, 2013h. Disponível em: <https://spdbcfmusp.files.wordpress.com/2014/09/iras_modulodeteccaobacterias.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Brasília: ANVISA. **Implementação do Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos (PGA) pelos hospitais**, 2021c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**. Módulo 10: Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica, Brasília, p. 160, v. 10, 2020g. Disponível em:

<https://www.gov.br/anvisa/ptbr/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-10_manual-demicrobiologia.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução de Diretoria Colegiada Nº 471, de 23 de Fevereiro de 2021**. Dispõe sobre os critérios para a prescrição, dispensação, controle, embalagem e rotulagem de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos de uso sob prescrição, isoladas ou em associação, listadas em Instrução Normativa específica. Ed. 36, s.1, p. 85, fev. 2021a. Disponível em:<<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-471-de-23-de-fevereiro-de-2021304923190>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução de Diretoria Colegiada Nº 26, de 13 de Maio de 2014f**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, 2014c. Disponível em:<https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2022.

BRASIL. Lei 9.433 de 8 de janeiro de 1997. **Institui a Política Nacional dos Recursos Hídricos**. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1997b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Implementação da Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília, 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria-Executiva. Secretaria de Atenção à Saúde. **Glossário temático: práticas integrativas e complementares em saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 180 p.

BRASIL. Decreto Nº 5.813 de 22 de Junho de 2006. **Institui a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2006e.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010d. **Substâncias farmacêuticas químicas, vegetais e biológicas, medicamentos e correlatos, especificações e métodos de análise**.

BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1340, Mar. 2020. Disponível em:<<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/6/1340>>. Acesso em: 21 ago. 2022. DOI:10.3390/molecules25061340.

BRUNING, Maria Cecília Ribeiro; MOSEGUI, Gabriela Bittencourt Gonzalez; VIANNA, Cid Manso de Melo. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & saúde coletiva**, v. 17, p. 2675-2685, out. 2012. Disponível em:<<https://www.scielo.br/j/csc/a/z6RsN7j4bRKfM8Lq8tQNX4N/?lang=pt>>. Acesso em: 28 ago. 2022. DOI:<https://doi.org/10.1590/S1413-81232012001000017>.

BUCHY, P. *et al.* Impact of vaccines on antimicrobial resistance. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 90, p. 188-196, Jan. 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971219303972>>. Acesso em: 18 ago. 2022. DOI: 10.1016/j.ijid.2019.10.005.

CABANA, R. Efeito de diferentes metodologias de extração na recuperação de metabólitos bioativos de *Satureja parvifolia* (*Phil.*) Epling (*Lamiaceae*). **Culturas e produtos industriais**, v. 48, p. 49-56, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669013001635?casa_token=3vf5-E84BhMAAAA:8LWSFx_T-m5mYG46xMjNDyS36xqvXdEk6fpuM33PIOpAu5xHgF0x01eZ4rpl3fLf1O70yCRyLg>. Acesso em 24 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.003>.

CARDOSO, L. A.. **Revisão Bibliográfica sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de *Melaleuca alternifolia* e de *Zingiber officinale* frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/36099>>. Acesso: 04 fev. 2023.

CASTAGNA, F. *et al.* Green veterinary pharmacology applied to parasite control: evaluation of *Punica granatum*, *Artemisia campestris*, *Salix caprea* aqueous macerates against gastrointestinal nematodes of sheep. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 10, p. 237, Oct. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2306-7381/8/10/237>>. Acesso em: 16 ago. 2022. DOI:10.3390/vetsci8100237.

CHAKOTIYA, A. S. *et al.* *Zingiber officinale*: Sua atividade antibacteriana em *Pseudomonas aeruginosa* e modo de ação avaliado por citometria de fluxo. **Patogênese microbiana**, v. 107, p. 254-260, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401017300815?casa_token=sZRlhLZdv2YAAAAA:3d5MhpCNpeC0E-u5KU02UaiwcQsnLOYKtJ1oK4OEdQ5ZEZHxQOSlu45e5EoMYF8K8ZFNel7fYTY>. Acesso em 25 jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.029>.

CHEN, Z. *et al.* Prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in drinking water sources in Hangzhou City. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p. 1133-1144, jun. 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01133/full>>. Acesso em: 26 ago. 2022. DOI:103389/fmicb.2017.01133.

CHEN, J. *et al.* Survey of pathogenic bacteria of biofilms in a metropolitan drinking water distribution system. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 20, Oct. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article/366/20/fnz225/5614495?login=true>>. Acesso em: 23 ago. 2022. DOI:10.1093/femsle/fnz.225.

CHENG, Yi *et al.* Human Activity Intensity and Its Spatial-Temporal Evolution in China's Border Areas. **Land**, v. 11, n. 7, p. 1089, July 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-445X/11/7/1089>>. Acesso em: 09 ago. 2022. DOI:10.3390/land11071089.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **Journal of molecular evolution**, v. 88, n. 1, p. 26-40,

2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00239-01909914-3>>. Acesso em: 26 out. 2022. DOI: 10.1007/s00239-019-09914-3.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2020. Disponível em: <<https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2023. ISBN 978-1-68440-067-6.

CIMAFONTE, M. *et al.* Screen Printed Based Impedimetric Immunosensor for Rapid Detection of *Escherichia coli* in Drinking Water. **Sensors**, v. 20, n.1, p. 274, Jan. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8220/20/1/274>>. Acesso em: 25 ago. 2022. DOI:10.3390/s20010274.

COELHO, A.A. **EFEITO DA TEMPERATURA DO AR DE SECAGEM E DO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO NO TEOR E NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALECRIM-PIMENTA E GENGIBRE**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2019. Disponível em: <<https://uenf.br/posgraduacao/producao-vegetal/wp-content/uploads/sites/10/2020/02/Tese-Antonione.pdf>>.

COLET, C. F. *et al.* Análises das embalagens de plantas medicinais comercializadas em farmácias e drogarias do município de Ijuí/RS. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 17, n. 2, p. 331-339, jun. 2015. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/g3n8f5VG74QM7n4Rx7P93sL/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 08 jul. 2022. DOI:10.1590/1983-084X/13_027.

CONSELHO NACIONAL DA ÁGUA. **[Portal do] CNA**. Portugal: CNA, [s. d.]. Disponível em: <http://https://conselhonacionaldaagua.weebly.com/aacuteagua-no-planeta-terra.html>. Acesso em: 19 ago. 2022.

CORRÊA, J. S. *et al.* Antimicrobial resistance in Brazil: an integrated research agenda. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 56, Feb. 2022. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/reusp/a/sxzWXMSsRf3WxVpfnLqSTpM/?lang=en>>. Acesso em: 10 jul. 2022. DOI:10.1590/1980-220X-REEUSP-2021-0589.

COUTO, O. S.; CORDEIRO, R. M. S. Manual de reconhecimento de espécies vegetais da restinga do Estado de São Paulo. **Centro de Editoração da Secretaria do Meio Ambiente, Departamento Estadual de Proteção de recursos Naturais, São Paulo**, 2005.

CRISTOFEL, C. J.. **Influência dos parâmetros de secagem e formas de fracionamento na composição química do gengibre (*Zingiber officinale roscoe*) desidratado**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, RS, 2018. Disponível em: <<https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/2308>>. Acesso em: 08 fev. 2023.

CUTRIM, E. S. M. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim). **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 1, p. 60-81, 2019. Disponível em: <<http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v11n1a06.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20190006>.

DA CONCEIÇÃO, A. K. C. *et al.* Plantas medicinais: um saber tradicional como alternativa no processo de cura. **Revista Agroecossistemas**, v. 10, n. 2, p. 238-254, 2018. Disponível em:<<http://novoperiodicos.ufpa.br/periodicos/index.php/agroecossistemas/article/view/5204>>. Acesso em: 30 ago. 2022. DOI:<https://doi.org/10.18542/ragros.v10i2.5204>.

DA SILVA, E. B. *et al.* **Automação & Sociedade Volume 1: A Quarta Revolução Industrial e suas bases tecnológicas**. Brasport, 2019.

DA CUNHA, A. Proença; DA GRAÇA, João Adriano Borralho. **Farmacognosia e fitoquímica**. 2009.

DA SILVA, T. M. F. *et al.* Infecções hospitalares associadas à bacilos gramnegativos não fermentadores em unidade de terapia intensiva: revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 3, p. e6685-e6685, Mar. 2021. Disponível em:<<https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/6685>>. Acesso em: 22 ago. 2022. DOI:10.25248/reas.e6685.2021.

DE ANDRADE, N. D. *et al.* Uso das plantas medicinais para fins terapêuticos por estudantes do Ensino Médio. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e59510414484-e59510414484, Ap. 2021. Disponível em:<<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/14484>>. Acesso em: 30 ago. 2022. DOI:10.33448/rsd-v10i4.14484.

DEMARTELAERE, A. C. F. *et al.* Aspectos farmacológicos das plantas medicinais e as implicações com o meio ambiente: revisão bibliográfica Pharmacological aspects of medicinal plants and the implications with the environment: bibliographic review. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 37288-37309, 2022. Disponível em:<[file:///D:/Downloads/48033-120163-1-PB%20\(2\).pdf](file:///D:/Downloads/48033-120163-1-PB%20(2).pdf)>. Acesso em: 03 set. 2022. DOI:10.34117/bjdv8n5-299.

DENAMUR, E. *et al.* The population genetics of pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 37-54, 2021. Disponível em:<<https://www.nature.com/articles/s41579-020-0416-x>>. Acesso em: 28 ago. 2022. DOI:<https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>.

DE SÁ-FILHO, G. F. *et al.* Plantas medicinais utilizadas na caatinga brasileira e potencial terapêutico dos metabólitos secundários: uma revisão. **Pesquisa, sociedade e desenvolvimento**, v. 10, n. 13, pág. e140101321096-e140101321096, 2021. Disponível em:<<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21096>>. Acesso em: 15 out. 2023. DOI:<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21096>.

DE SOUZA LEAL, W. *et al.* Análise da automedicação durante a pandemia do novo coronavírus: um olhar sobre a Azitromicina. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 8, p. 580-592, ago. 2021. Disponível em:<<https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/1984>>. Acesso em: 12 ago. 2022. DOI:10.51891/rease.v7i8.1984.

DIDIER, C.; MOREIRA, S. L. Biofármacos: do desenvolvimento à produção industrial. **MENSAGEM DA PRESIDENTE**, p. 18, 2016. Disponível em:<https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4318065/mod_resource/content/1/rebeq2016_JULHO_01L.pdf#page=18>. Acesso em: 27 ago. 2022. ISSN: 01029843.

DIEMER, A. W. **Ação Antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* E *Zingiber officinale* frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em Carne Mecanicamente Separada de Frango**. 2016. 67 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro Universitário Univates, Lajeado, RS, 2016.

DKHIL, M. A. Anti-coccidial, anthelmintic and antioxidant activities of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract. **Parasitology Research**, v. 112, n. 7, p. 26392646, Apr. 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-013-34303>>. Acesso em: 16 ago 2022. DOI:10.1007/s00436-013-3430-3.

DOMÍNGUEZ, D. C.; CHACÓN, L. M.; WALLACE, D.'J. Anthropogenic activities and the problem of antibiotic resistance in Latin America: a water issue. **Water**, v. 13, n. 19, p. 2693, Sept. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/20734441/13/19/2693>>. Acesso em: 19 ago. 2022. DOI: 10.3390/w13192693.

DOS SANTOS, A. A.; BAIENSE, A. S. R.; DE ANDRADE, L. G.. Atenção Farmacêutica e Práticas Integrativas e Complementares no SUS: Conhecimento e Aceitação Por Parte da População de Nova Iguaçu. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 4, p. 656-667, 2022. Disponível em: <<https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/4861>>. Acesso em: 02 set. 2022. DOI: <https://doi.org/10.51891/rease.v8i4.4861>.

DOS SANTOS, Edilaine Soares; SANTOS, Cilmara Perrotti; GOMES, Rebeca Duailibe. Conceito de saúde em tempos de epidemia/pandemia: Revisão de literatura/health in epidemic/pandemic times. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 11, p. 102850-102867, 2021. Disponível em: <[file:///D:/Downloads/39109-98054-1-PB%20\(1\).pdf](file:///D:/Downloads/39109-98054-1-PB%20(1).pdf)>. Acesso em: 08 jul. 2022.

FLACH, K. A. **Detecção de *Escherichia coli* resistente a antibióticos em manancial no noroeste do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) Departamento de Engenharia e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal De Santa Maria, Frederico Westphalen, RS, 2021.

FIGUERAS, J. M.; BORREGO, J.J. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.7, n.12, p. 4179-4202, Dec. 2010. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/7/12/4179>>. Acesso em: 26 ago. 2022. DOI:10.3390/ijerph7124179.

FRATAMICO, P. M. *et al.* Avanços na sorotipagem molecular e subtipagem de *Escherichia coli*. **Fronteiras em Microbiologia**, v. 7, p. 644, 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00644/full>>. Acesso em: 16 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00644>.

FREIRES, M.S.; RODRIGUES JUNIOR, O.M. Bacterial resistance to indiscriminate use of azithromycin versus COVID-19: an integrative review. **Research, Society and Development**, [S.l.], v.11, n.1, p. e31611125035, 2022. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/25035>>. Acesso em: 20 ago. 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i1.25035.

GADELHA, H. S. *et al.* O novo marco regulatório do saneamento básico e o direito ao acesso à água. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e569101118843, Sept.

2021. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/18843>>. Acesso em: 18 ago. 2022. DOI:10.33448/rsd-v10i11.18843.

GARLET, T. M. B. Plantas medicinais nativas de uso popular no Rio Grande do Sul. **Santa Maria, RS: UFSM, Pró-Reitoria de Extensão**, 2019.

GIMENES, L.S. *et al.* A influência da propaganda de medicamentos na automedicação. **Revista Amazônia Science & Health**, v.7, n.2, p.14-19, maio 2019. Disponível em: <https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Gimenes+LS%2C+et+al.+A+influ%C3%A4ncia+da+propaganda+de+medicamentos+na+automedica%C3%A7%C3%A3o.+Revista+Amaz%C3%B4nia+Science+%26+Health+2019.+v.7%3A+n.2%2C+p.14-19&btnG>. Acesso em: 12 ago. 2022. DOI:10.18606/2318-1419/amazonia.sci.health.v7n2p14-19.

GOMES, Tânia AT *et al.* Diarrheagenic escherichia coli. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 3-30, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838216310917?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>.

GRILC, E. *et al.* Drinking Water Quality and the Geospatial Distribution of Notified GastroIntestinal Infections/Kvaliteta Pitne Vode in Geoprostorska Porazdelitev Prijavljenih Črevesnih Okužb. **Slovenian Journal of Public Health**, v. 54, n. 3, p. 194-203, Jun. 2015. Disponível em: <<https://www.sciendo.com/article/10.1515/sjph-2015-0028>>. Acesso em: 25 ago. 2022. DOI: 10.1515/sjph-2015-0028.

HAFNER, S.C.; HARTEK, T.; PARIKH, S.J. Evaluation of Monensin Transport to Shallow Groundwater after Irrigation with Dairy Lagoon Water. **Journal of Environmental Quality**, v. 45, n.2 p. 480-487, Mar. 2016. Disponível em: <<https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2134/jeq2015.05.0251>>. Acesso em: 09 ago. 2022. DOI:10.2134/jeq2015.05.0251.

HE, G. *et al.* Impact of food consumption patterns change on agricultural water requirements: An urban-rural comparison in China. **Agricultural Water Management**, v. 243, Jan. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378377420305266?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 jul. 2022. DOI:10.1016/j.agwat.2020.106504.

HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINGSON, B. **Antibiotics: past, present and future.** Current Opinion in Microbiology. Oct. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527419300190>>. Acesso em: 06 jul. 2022. DOI:10.1016/j.mib.2019.10.008.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2022.

INSTITUTO DE ENERGIA E MEIO AMBIENTE [**Portal do**] IEMA. São Paulo: IEMA [s.d.]. Disponível em: <<http://energiaeambiente.org.br/qualidadedoar>>. Acesso em: 08 set. 2022.

JÚNIOR, J. M. A.; DE OLIVEIRA SALVI, J. Fatores Associados à automedicação em uma farmácia Comunitária de Ouro Preto do Oeste, RONDÔNIA. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 9, n. 2, p. 107-116, 2018. Disponível em:<<https://www.actabiomedica.com.br/index.php/acta/article/view/317>>. Acesso em: 24 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.18571/acbm.177>.

KOAUDIO-NGBESSO, N. *et al.* Comparative Biotypic and Phylogenetic Profiles of *Escherichia coli* Isolated from Resident Stool and Lagoon in Fresco (Côte d'Ivoire). **International Journal of Microbiology**, v. 2019, p. 1-7, Nov. 2019. Disponível em:<<https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2019/9708494/>>. Acesso em: 25 ago. 2022. DOI: 10.1155/2019/9708494.

LARSON, A. *et al.* Antibiotic –resistant *Escherichia coli* in drinking water samples from rural andean households in Cajamarca, Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 1363-1368, June 2019. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6553921/>>. Acesso em: 22 ago. 2022. DOI:10.4269/ajtmh.18-0776.

LEE, Tau Hong *et al.* Antimicrobial stewardship capacity and manpower needs in the Asia Pacific. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 24, p. 387-394, Mar. 2021. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716521000254>>. Acesso em: 19 ago. 2022. DOI:10.1016/j.jgar.2021.01.013.

LIMA, M. E. L. *et al.* Atividade antimicrobiana do óleo essencial de dois espécies de Pimenta *pseudocaryophyllus* (Gomes) LR Landrum (*Myrtaceae*) nativa do Estado de São Paulo-Brasil. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 589-593, 2006. Disponível em:<<https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2006/vol3/063.Lima.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

LIMA, C. C.; BENJAMIM, S. C. C.; SANTOS, R. F. S. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **CuidArte, Enferm**, p. 105-113, jan. 2017. Disponível em:<<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/bde-31632>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

LIU, Y. e cols. Progresso da pesquisa sobre os constituintes químicos do *Zingiber officinale Roscoe*. **BioMed research international**, v. 2019, 2019. Disponível em:<<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/5370823/>>. Acesso em 04 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/5370823>.

LOURENÇO, R. W. *et al.* Reflexos ambientais do desenvolvimento e expansão das atividades humanas sobre a qualidade da água. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 15, n. 1, p. 175-198, 2022. Disponível em:<<https://periodicos.ufpe.br/revistas/rbge/article/view/250917>>. Acesso em: 20 ago. 2022. DOI: ISSN:1984-2295.

LUCESI, Luana Aline *et al.* **Atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante de óleos essenciais**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Disponível em:<<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/2678>>.

MACIP, Salvador. **As grandes epidemias modernas**. Companhia Editora Nacional, 2020.

MALAGI, I. *et al.* Physicochemical quality of and *Escherichia coli* resistance profiles in urban surface waters. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, p. 661-668, July. 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/Qt6vBYsvZ4qsrHnsndpqZZQ/?format=pdf&lang=en>.

Acesso em: 23 ago.

2022. DOI: 10.1590/1519-6984.218915.

MAO, Q.Q. *et al.* Bioactive compounds and bioactivities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Foods**, v. 8, n. 6, p. 185, 2019. Disponível

em: <<https://www.mdpi.com/23048158/8/6/185>>. Acesso em: 26 out. 2022. DOI:

10.3390/foods8060185.

MARTINS, M. B. G. *et al.* Caracterização anatômica e fitoquímica de folhas e rizomas de *Hedychium coronarium* J. König (*Zingiberaceae*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 179-187, 2010. Disponível em: <

<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/XJp8Q984SLHBMRqFGZcv4rH/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 22 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000200009>.

MINIKOWSKI, A. G.; LUCCA, P. S. R.. O Uso de Plantas

Medicinais e Fitoterápicos Por Jovens em um Município na Região

Oeste do Paraná. **Revista Thêma et Scientia**, v. 11, n. 2, p. 217-255, 2021. Disponível

em: <<http://ojsrevistas.fag.edu.br/index.php/RTES/article/view/1337>>. Acesso em: 02 set. 2022.

MIRANDA, C. A.S. F. *et al.* Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, p. 213-220, 2016. Disponível em: <

<https://www.scielo.br/j/rca/a/tgtFRN7Dxp8Hqt6JTgfjrsk/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 20 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160025>.

MORAES, A. L.; ARAÚJO, N. G. P.; BRAGA, T. L. Automedicação: revisando a

literatura sobre a resistência bacteriana aos antibióticos. **Revista Eletrônica Estácio**

Saúde, v. 5, n. 1, p. 122-132, 2016. Disponível

em: <<http://revistaadmmade.estacio.br/index.php/saudesantacatarina/article/view/2234>>.

Acesso em: 10 jul. 2022. ISSN1983-1617.

MOREIRA, B. S; AZOLA, J. S. M.; GOUVÊA, Cibele M. C. P.. Marcadores moleculares para identificação e caracterização do potencial patogênico de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 13, n. 1, p. 41-52, 2018. Disponível em: <

<https://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios/article/view/2401>>. Acesso em: 22 jan. 2023. ISSN: 1980-0002.

MORETO, M. do. R.S. **Relação entre saúde pública e saneamento na bacia hidrográfica do ribeirão marinho, inserido na unidade de gerenciamento de recursos hídricos – 15, estado de São Paulo**. 2010, p. 76. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Gestão e Regulação em Recursos Hídricos – Prof- Água). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, SP, 2019.

MORRISON, L., ZEMBOWER, T.R. **Antimicrobial Resistance**. Journals & Books:

Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America. Disponível em: <<file:///D:/Downloads/1-s2.0-S1052515720300659-main.pdf>>. Acesso em: 18 de julho de 2022.

MUNDA, S. *et al.* Análise química e usos terapêuticos do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.): uma revisão. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 4, pág. 994-1002, 2018. Disponível em:<

https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2018.1524794?casa_token=8TzN3WUBz-kAAAAA:TV9xU4EbWwZoHXbVsQlQnA7YuPTJzTEID-tpVvInby1fatACpgrR6jonBb7a5_j80rbiEU1i4nUPJE>. Acesso em: 13 jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1524794>.

MYERS, A. G; CLARK, R.B. Discovery of Macrolide Antibiotics Effective against MultiDrug Resistant

Gram-Negative Pathogens. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, p. 1635 – 1645, Mar. 2021. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.accounts.1c00020>>. Acesso em: 27 ago. 2022. DOI:10.1021/acs.accounts.1c00020.

NAGORE, P. B.; LOKHANDE, P. B.; MUJAWAR, H. A. Potent medicinal applications of essential oil of *Hedychium coronarium* Koenig species from the Konkan region. **NVEONATURAL VOLATILES & ESSENTIAL OILS Journal| NVEO**, p. 255-261, 2022. Disponível em:< [file:///D:/Downloads/Nveo+-+9+\(2\)+-+23+pdf.pdf](file:///D:/Downloads/Nveo+-+9+(2)+-+23+pdf.pdf)>. Acesso em: 06 fev. 2023.

NAVAB-DANESHMAND, T. *et al.* *Escherichia coli* contamination across multiple environmental compartments (soil, hands, drinking water, and handwashing water) in urban Harare: Correlations and risk factors. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 803-813, Mar. 2018. Disponível em:<https://pmc/articles/PMC5930891/>. Acesso em: 26 ago. 2022. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0521.

NELSON, S. *et al.* Predicting climate-sensitive water-related disease trends based on health, seasonality and weather data in Fiji. **The Journal of Climate Change and Health**, v. 6, p. 100112, May 2022. Disponível em:<<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2667278222000013?token=23FA9223E9CF542E869888E96D4FD8A608B4F48977A0F5896F32A88617FD10AC27DE11C0F17BAC795C6302F40B19477E&originRegion=us-east-1&originCreation=20220829144925>>. Acesso em: 23 ago. 2022. DOI:10.1016/j.joclim.2022.100112.

NEVES E CASTRO, P. B. *et al.* Antibiotic consumption in developing countries defies global commitments: An overview on Brazilian growth in consumption. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 17, p. 21013-21020, Apr. 2020. Disponível em:<<https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-020-08574-x>>. Acesso em: 11 ago. 2022. DOI:10.1007/s11356-020-08574-x.

NJI, Emmanuel *et al.* High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* from healthy human sources in community settings. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-11, Feb. 2021. Disponível em:<<https://www.nature.com/articles/s41598-021-82693-4>>. Acesso em: 28 ago. 2022. DOI:<https://doi.org/10.1038/s41598-021-82693-4>.

NIST. National Institute of Standards and Technology. **NIST Chemistry WebBook, SRD 69**. 2022. Disponível em:< <https://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

- OLIVEIRA, M. S. *et al.* Principais bactérias encontradas em uroculturas de pacientes com Infecções do Trato Urinário (ITU) e seu perfil de resistência frente aos antimicrobianos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. 1-5, June 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/16161>. Acesso em: 21 ago. 2022. DOI:10.33448/rsd-v10i7.16161.
- OLIVER, D.M. *et al.* Opportunities and limitations of molecular methods for quantifying microbial compliance parameters in EU bathing waters. **Environ. Int.** 64, 124-128. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016041201300305X>>. Acesso em: 23 Jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.016>.
- O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. **The review on antimicrobial resistance**. May. 2016. Disponível em: <https://amrreview.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf>. Acesso em: 12 ago 2022.
- PALMEIRA, PTSS *et al.* O uso do gengibre (*Zingiber officinale*) em odontologia: propriedades e aplicações terapêuticas. **Brazilian Journal of Surgery Clinical Research**, v. 27, n. 2, p. 110-115, 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/JoseFernandes-Neto/publication/334233824_O_USO_DO_GENGIBRE_Zingiber_officinale_EM_ODONTOLOGIA_PROPRIEDADES_E_APLICACOES_TERAPEUTICAS_THE_USE_OF_GINGER_Zingiber_officinale_IN_DENTISTRY_PROPERTIES_AND_THERAPEUTIC_APPLICATIONS/links/5d1e63c7458515c11c128362/O-USO-DO-GENGIBRE-Zingiber-officinale-EM-ODONTOLOGIA-PROPRIEDADES-E-APLICACOES-TERAPEUTICAS-THE-USE-OF-GINGER-Zingiber-officinale-IN-DENTISTRY-PROPERTIES-AND-THERAPEUTICAPPLICATIONS.pdf>. Acesso em: 03 set. 2022. ISSN online: 2317-4404.
- PANDIT, C. *et al.* Development of magnetic nanoparticle assisted aptamer-quantum dot based biosensor for the detection of *Escherichia coli* in water samples. **Science of The Total Environment**, v. 831, p. 154857, July 2022. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0048969722019507?token=4494D750D41E6EB4693D1F11141EE6FAE26CEBF1BB4D7F86D7078E58DAB0FA519A9B858BA9758D89D78607C039B4DC63&originRegion=us-east-1&originCreation=20220831140444>. Acesso em: 24 ago. 2022. DOI:10.1016/j.scitotenv.2022.154857.
- PEDROSO, R. S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H.. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, maio, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/physis/a/kwsS5zBL84b5w9LrMrCjy5d/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 09 jul. 2022. DOI:10.1590/S0103-73312021310218.
- PEREIRA, A. L.; PITA, J. R.. A. F. (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao prêmio Nobel (1945). **História: revista da Faculdade de Letras da Universidade do Porto**, v. 6, 2018. Disponível em: <<http://193.137.34.195/index.php/historia/article/view/3787>>. Acesso em: 08 jul. 2022. ISSN 0871-164X eISSN 2183-0479.
- PERES, B. M. **Identificação e caracterização de bactérias patogênicas e indicadoras por métodos de cultivo e moleculares**. 2017, p. 84. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2017.

PIEROTTO, Moara Farina. **Análise do perfil fitoquímico e da atividade antioxidante e citotóxica do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*)**. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Alimentos) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, RS, 2018.

PINHEIRO, Amanda Maria. **Atributos ecológicos que criaram para invasibilidade da macrófita *Hedychium coronarium* J. König (*Zingiberaceae*)**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). 2018. Disponível em: <<http://www.repositorio.jesuita.org.br/handle/UNISINOS/10335>>. Acesso em: 04 fev. 2023.

PIRAS, C., *et al.* Plants with Antimicrobial Activity Growing in Italy: A PathogenDriven Systematic Review for Green Veterinary Pharmacology Applications. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 919, July 2022. Disponível em: <<https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2s2.0-85134683826&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&st1=use+of+plant+extract+against+bacterial+resistance+review&sid=88b1ec10b078b1f82fb4e272844f7834&sot=b&sdt=b&sl=71&s=TITLE-ABS-KEY%28use+of+plant+extract+against+bacterial+resistance+review%29&relpos=1&citeCnt=0&searchTerm=>>>. Acesso em: 16 ago 2022. DOI:10.3390/antibiotics11070919.

PO, J. YT; FITZGERALD, J. M.; CARLSTEN, C. Respiratory disease associated with solid biomass fuel exposure in rural women and children: systematic review and metaanalysis. **Thorax**, v. 66, n. 3, p. 232-239, Jan. 2011. Disponível em: <<https://thorax.bmj.com/content/66/3/232.info>>. Acesso em: 06 ago. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/thx.2010.147884>.

POIREL, L., *et al.* Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 6 - 14, July 2018. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>>. Acesso em: 22 ago. 2022. DOI:10.1128/microbioIspec.ARBA-0026-2017.

PRESCOTT, J. F. History and current use of antimicrobial drugs in veterinary medicine. **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**, p. 1-16, Ago. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1128/9781555819804.ch1>>. Acesso em: 11 jul. 2022. DOI:10.1128/9781555819804.ch1.

QIU, Wenhui *et al.* Remediation of surface water contaminated by pathogenic microorganisms using calcium peroxide: Matrix effect, micro-mechanisms and morphological-physiological changes. **Water Research**, v. 211, p. 118074, Mar. 2022. Disponível em: <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0043135422000379?token=CADD8144F9491F23694B80CC51E42BC71E79BA21391CEA26013F8B1C8C3513894E12BD66965F3DB11F41E351573A83B3&originRegion=us-east-1&originCreation=20220826172039>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

RIBEIRO, J. C. L.. **Análise química e biológica de metabólitos voláteis isolados de plantas das famílias *Myrtaceae* e *Zingiberaceae***. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2013.

ROCHA, F. A. G., *et al.* O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos** (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte), Rio Grande do Norte, v. 1, Ano.

31, p.49-61, mar. 2015. Disponível em:< <https://doi.org/10.15628/holos.2015.2492>>. Acesso em: 30 ago. 2022.

ROCHELLE – NEWALL, E., *et al.* A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-15, Apr. 2015. Disponível em:<<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00308/full>>. Acesso em: 11 ago. 2022. DOI:10.3389/fmicb.2015.00308.

SALVI, S. S.; BARNES, P. J. Chronic obstructive pulmonary disease in nonsmokers. **The lancet**, v. 374, n. 9691, p. 733-743, Sept. 2009. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673609613039?via%3Dihub>>. Acesso em: 06 ago. 2022. DOI:10.1016/S0140-6736(09)61303-9.

SANTOS, C. V., *et al.* **Composição química, avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial e extratos vegetais das folhas de *Myrcia palustris*.** Dissertação (Mestrado Manejo dos Recursos Naturais), 2019. Disponível em:< <https://tede.unioeste.br/handle/tede/5368>>. Acesso em: 07 fev. 2023.

SANTOS, S. B.; PEDRALLI, G.; MEYER, S. T. Aspectos da fenologia e ecologia de *Hedychium coronarium* (*Zingiberaceae*) na estação ecológica do Tripuí, Ouro PretoMG. **Planta daninha**, v. 23, p. 175-180, 2005. Disponível em:< <https://www.scielo.br/j/pd/a/Kh3ZVVpmKJPqDVSGB9Dst4L/?format=html&lang=pt>>. Acesso em: 22 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582005000200002>.

SANTOS, T. C. de S. **Extração de compostos bioativos de *Zingiber officinale* Roscoe e avaliação da sua atividade frente a fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*.** Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia), 2018. Disponível em:< https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/8854/2/TAILANE_CA%c3%8dNA_DE_SOUZA_SANTOS.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2023.

SCALDAFERRI, L. G., *et al.* Formas de resistência microbiana e estratégias para minimizar sua ocorrência na terapia antimicrobiana: Revisão. **Pubvet**, v. 14, p. 163, ago. 2020. Disponível em:<<https://pdfs.semanticscholar.org/74d7/03fccc59afc7d1321bd2e54b56fed1305d0.pdf>>. Acesso em 11 jul. 2022. DOI:10.31533/pubvet.v14n8a621.1-10.

SCANDAR, M. J. **Princípios do Direito Ambiental na Constituição Federal de 1988.** [2019]. Disponível em:<<https://jus.com.br/artigos/72693/principios-do-direito-ambiental-naconstituicao-federal-de-1988>>. Acesso em: 03 ago. 2022.

SANTURIO, D. F., *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1051-1056, 2011. Disponível em:< <https://www.scielo.br/j/cr/a/NCz5Z6BNBGJ7rhrxwscBGHq/?lang=pt&format=html>>. Acesso em: 04 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000067>.

SARAVANAKUMAR, Kandasamy et al. Impact of industrial effluents on the environment and human health and their remediation using MOFs-based hybrid membrane filtration techniques. **Chemosphere**, p. 135593, Nov. 2022. Disponível em:< <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0045653522020860?token=CCC5E4E6523BBC5F1>>

[D217EB48E22B5993F501A27B0985F807AAC70F6367AC6B03A28A941803D5D113BFD077D938E8882&originRegion=us-east-1&originCreation=20220826130027](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135593)>. Acesso em: 22 ago. 2022. DOI:10.1016/j.chemosphere.2022.135593.

SILVA, D.M.; DOMINGUES, L. On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on PCR-based methods. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, 2015, p. 400 – 411. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651314005703?casa_token=cHUB1vQZyCkAAAAA:Z_fF_YdIMHGKaEe0AUx9zooUyVAcEIwJ9PfhtTS1LddsRerO3Rn7fqg6_n3A6Mus5kHTRWlksY>. Acesso em: 23 jan. 2023.

SILVA, É. P.; DE PAIVA, M. M. **Assistência farmacêutica em relação ao uso off-label de medicamentos no âmbito da pandemia do COVID-19**. Research, Society and Development, v. 10, n. 16, p. e128101623246-e128101623246, dez. 2021. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/23246>>. Acesso em: 09 ago. 2022. DOI: 10.33448/rsd-v10i16.23246.

SIMÕES, C. M. O., *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª edição. UFRGS. **1104p**, 2010.

SOARES, A. J. S., *et al.* Potencialidades da prática da atenção farmacêutica no uso de fitoterápicos e plantas medicinais. **Journal Of Applied Pharmaceutical Sciences**, [SL], v. 7, n. 2, p. 10-21, 2021. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Djenane-Oliveira-2/publication/348975474_POTENCIALIDADES_DA_PRATICA_DA_ATENCAO_FARMACEUTICA_NO_USO_DE_FITOTERAPICOS_E_PLANTAS_MEDICINAIS/links/6019966d92851c4ed545c0af/POTENCIALIDADES-DA-PRATICA-DA-ATENCAO-FARMACEUTICA-NO-USO-DE-FITOTERAPICOS-E-PLANTAS-MEDICINAIS.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2022. ISSN 2358-3495.

SOARES, N., *et al.* Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 24, 2016. Disponível em: <<https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/1089>>. Acesso em: 26 fev. 2023. DOI: 10.18677/EnciBio_2016B_094.

SONG, K., MOHSENI, M., TAGHIPOUR, F. Application of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs) for water disinfection: A review. **Water Research**, v. 94, p. 341-349, May 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135416301300?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 ago. 2022. DOI:10.1016/j.watres.2016.03.003.

SONI, K., *et al.* Bacterial antibiotic resistance in municipal wastewater treatment plant; mechanism and its impacts on human health and economy. **Bioresource Technology Reports**, p. 101080, Sept. 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589014X22001372?casa_token=cBSuG_NgFVvKAAAAA:LV0GOWjWUHCNNuGkaiTBdBOtUcMC37x6U1kKCQ52vIj41FEnbcJyxPbJMICyWzGQXSMiLIg8>. Acesso em: 19 ago. 2022. DOI:10.1016/j.biteb.2022.101080.

SOUZA, C. L.; ANDRADE, C. S.. Saúde, meio ambiente e território: uma discussão necessária na formação em saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, p. 4113-4122, Out. 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/csc/a/dVvT665jm9TnnhCpyhft6Gg/?lang=pt>>. Acesso em: 08 jul. 2022. DOI:10.1590/1413-812320141910.08992014.

SYAFITRI, D. M., *et al.* Uma revisão: O gengibre (*Zingiber officinale* var. *Roscoe*) tem potencial para fitoterápicos futuros. **Jornal indonésio de Ciências Aplicadas**, v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://jurnal.unpad.ac.id/ijas/article/view/16466>>. Acesso em: 24 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.24198/ijas.v8i1.16466>.

ŠVARC-GAJIĆ, J., *et al.* Caracterização de extratos de gengibre obtidos por água subcrítica. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 123, p. 92-100, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0896844616304442?casa_token=hz4gNw4M8V0AAAAA:YcKC7FxaeXIIIRd0T8xLClssLUv5uNmAZFbKr4Ev1zOx_sbQ2Tq7Ull3gnSyc5esPOX7wisOgZU>. Acesso em: 05 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.12.019>.

TAN, C. W.; CHLEBICKI, M. P.. Urinary tract infections in adults. **Singapore medical journal**, v. 57, n. 9, p. 485, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5027397/>>. Acesso em: 28 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.11622%2Fsmmedj.2016153>

TARFAOUI, K., *et al.* Chemical Profile, Antibacterial and Antioxidant Potential of *Zingiber officinale* *Roscoe* and *Elettaria cardamomum* (L.) Maton Essential Oils and Extracts. **Plants** **2022**, 11, 1487. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2223-7747/11/11/1487>>. Acesso em: 26 out. 2022. DOI: [10.3390/plants11111487](https://doi.org/10.3390/plants11111487).

TOWNSEND, E.A., *et al.* Effects of ginger and its constituents on airway smooth muscle relaxation and calcium regulation. *Am. J. Resp. Cell Mol.* 2013, 48, 157–163. Disponível em: <<https://www.atsjournals.org/doi/10.1165/rcmb.2012-0231OC>>. Acesso em: 26 out. 2022. DOI: [10.1165/rcmb.2012-0231OC](https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0231OC).

TULER, A. C.; PEIXOTO, A. L.; SILVA, N. C. B.. Plantas alimentícias não convencionais (PANC) na comunidade rural de São José da Figueira, Durandé, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 70, 2019. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rod/a/t6QpNtZ8dcwsLzZsSPCXhSg/?lang=pt&format=html>>. Acesso em: 02 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201970077>.

VALENTE, C. H. M. C. **Fracionamento e identificação de compostos de extratos de plantas medicinais da Guiné-Bissau com atividade biológica**. 2019. 144p. Dissertação (Parasitologia Médica) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal. 2019.

VAN ECK, N.J., WALTMAN, L. Software survey: Vosviewer, a computer program for bibliometric mapping. **Scientometrics**, v. 84, n. 2, p. 523-538, Jan. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11192-009-0146-3>>. Acesso em: 23 jul. 2022. DOI: [10.1007/s11192-009-0146-3](https://doi.org/10.1007/s11192-009-0146-3).

VARELLA, Marcelo Dias; LEUZINGER, Márcia Dieguez. O meio ambiente na Constituição de 1988: sobrevoo por alguns temas vinte anos depois. **Revista de Informação Legislativa**, v. 45, n. 179, p. 397-402, set. 2008. Disponível em: <file:///D:/Downloads/ril_v45_n179_p397.pdf>. Acesso em: 05 ago. 2022.

VENTROLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277, Apr. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>>. Acesso em: 18 ago. 2022. PMID: 25859123; PMCID: PMC4378521.

VIEIRA, Márcia Lima Festivo. " **Avaliação da presença das Carbapenemases em *Salmonella e Escherichia coli* isoladas de fontes animal, ambiental e humana no período de 2014 a 2017.** 2019. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas. Disponível em: <<http://www.unirio.br/ppgbmc/DissertaoMrciaLimaFestivoVieira1.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2023.

VINOTHKUMAR, V., *et al.* O geraniol modula a proliferação celular, apoptose, inflamação e angiogênese durante a carcinogênese da bolsa bucal de hamster induzida por 7,12-dimetilbenz [a] antraceno. **Bioquímica molecular e celular** , v. 369, p. 17-25, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-012-1364-1>>. Acesso em: 06 fev. 2023. DOI: 10.1007/s11010-012-1364-1.

WANG, W., *et al.* Visible light activation of persulfate by magnetic hydrochar for bacterial inactivation: Efficiency, recyclability and mechanisms. **Water Research**, v. 176, 115746, June 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135420302839?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 ago. 2022. DOI: 10.1016/j.watres.2020.115746.

WEYRICH, L. S., *et al.* Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. **Nature**, v. 544, n. 7650, p. 357-361, Mar. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature21674?dom=pscau&src=syn>>. Acesso em: 30 ago. 2022. DOI: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature21674>.

WALKER, D. I. *et al.* Um qPCR de *Escherichia coli* altamente específico e sua comparação com métodos existentes para águas ambientais. **Pesquisa sobre água** , v. 126, p. 101-110, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135417306942>>. Acesso em: 27 jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.032>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (WHO, UNICEF). **Water for life making it happen**. Geneva, 2005. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/43224>>. Acesso em: 27 ago. 2022.

WU, X., ZHONG, G., WANG, H., ZHU, J. **Temporal association between antibiotic use and resistance in Gram-negative bacteria**. *Brazilian Journal of Biology*. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/bjb/a/DyTnm8fDRhWJdJrQrxcPyJQ/?format=pdf&lang=en>>. Acesso em: 19 de julho de 2022.

YEHB, H. *et al.* Análise de componentes bioativos de dois diferentes gengibres (*Zingiber officinale Roscoe*) e efeito antioxidante de extratos de gengibre. **LWT-Ciência e Tecnologia de Alimentos** , v. 55, n. 1, pág. 329-334, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643813002892?casa_token=Vm0FNricGhEAAAAA:w1lgcr1hZ2KJef9KFWG9bAhgrZafuFB73NqGbllo5ivYCYrk842d_CiV VXZjEsqmyGtTosK0PZA>. Acesso em: 23 jan. 2023.

YOUSFI, F., *et al.* Triagem fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante e antibacteriano de extratos de *Zingiber officinale*. **South African Journal of Botany** , v. 142, p. 433-440, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629921002696?casa_token=aajyT93Q_fgAAAAA:4qDmUuBbL6IasmY1cqL_UgLeqWEftWcyq1vOEx06hqhrV3QoZlqcf5ILSj>

[B5F-MyUqxHeq1BRFY](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.07.010)>. Acesso em: 05 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.07.010>.

ZADOROZHNA, M.; MANGIERI, D.. Mechanisms of chemopreventive and therapeutic proprieties of ginger extracts in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6599, 2021. Disponível em:<<https://www.mdpi.com/14220067/22/12/6599>>. Acesso em: 26 out. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22126599>.

ZHANG, M., *et al.* Ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) and its bioactive components are potential resources for health beneficial agents. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 2, p. 711-742, 2021. Disponível em:<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.6858?casa_token=-QnzhCoalwEAAAAA:Bw_FTGnHrgzUYbQv_jFIK199KKwTbScOdmBK2_YUPNRbt0bLTy0zjGsrZxgAnX30SC2sta3G9dwQ3BL>. Acesso em: 24 out. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.6858>.