

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE FOLHAS E GALHOS DE *Casearia sylvestris* CONTRA *Enterococcus faecium* RESISTENTES À VANCOMICINA

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACT OF LEAVES AND TWIGS OF Casearia sylvestris AGAINST VANCOMYCIN RESISTANT Enterococcus faecium

Nathalia Grosbelli Vicari; Karina Ferrazzoli Devienne; Adriana Gonçalves Oliveira; Aline Dias Paiva*

Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Rua Frei Paulino, 30. Uberaba (MG) *aline.paiva@uftm.edu.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antibacterianos de *Casaria sylvestris* contra isolados clínicos de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina (VREs). O extrato bruto das folhas e galhos de *C. Sylvestris* foi obtido através de maceração em álcool 70% e o produto foi liofilizado. Os isolados de *Enterococcus faecium* (n = 20) foram obtidos previamente a partir de espécimes clínicos de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da UFTM. A resistência à vancomicina foi determinada pela concentração inibitória mínima (CIM > 32µg/mL). A atividade antibacteriana do extrato de *C. sylvestris* foi avaliada por difusão em meio sólido (50, 100, 200 e 400 µg/mL) e também pela determinação da CIM (75, 100, 125, 150, 175 e 200 µg/mL). Todos os enterococos avaliados apresentaram CIM para vancomicina superior a 32 µg/mL, confirmando o perfil de resistência a esse antimicrobiano. O extrato bruto de *C. sylvestris* apresentou CIM de 175 µg/mL para todos os isolados. O teste de difusão em meio sólido resultou em halos de inibição de crescimento bacteriano com diâmetros variando de 17 à 22 mm, na maior concentração de extrato avaliada (400 µg/mL). O extrato bruto de *C. sylvestris* demonstrou importante atividade inibitória contra *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina, apresentando-se promissor no controle de infecções causadas por tais bactérias.

PALAVRAS-CHAVE: *Enterococcus* resistentes à vancomicina, *Casearia sylvestris*, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antibacterial effects of *Casaria sylvestris* against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREs). The crude extract of the leaves and twigs of *C. sylvestris* was obtained through maceration in 70% alcohol and the product was lyophilized. *Enterococcus faecium* strains (n = 20) were previously obtained from clinical specimens of patients attended at the Hospital de Clínicas da UFTM. Vancomycin resistance was determined by the minimum inhibitory concentration (MIC > 32 µg/mL). The antibacterial activity

of the *C. sylvestris* extract was evaluated by diffusion in solid medium (50, 100, 200 e 400 µg/mL) and also by the MIC determination (75, 100, 125, 150, 175 e 200 µg/mL). All enterococci strains shown MIC above 32 µg/mL vancomycin, confirming the resistance profile to this antimicrobial. The crude extract of *C. sylvestris* showed MIC of 175µg/mL for all enterococci. The diffusion test in solid media resulted in zones of bacterial growth inhibition with diameters ranging from 17 to 22 mm, in the highest concentration of extract evaluated (400 µg/mL). The crude extract of *C. sylvestris* demonstrated an important inhibitory activity against vancomycin resistant *Enterococcus faecium*, which is promising in the control of infections caused by such bacteria.

KEY-WORDS: Vancomycin-resistant enterococcus, *Casearia sylvestris*, antibacterial activity.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas é o recurso mais antigo da medicina para tratamento e prevenção de doenças. Ele reflete a preocupação do homem em entender e encontrar, na natureza, formas de amenizar o sofrimento causado pelas enfermidades. Desde a pré-história, quando ainda não havia o registro escrito, sabe-se que o homem já usufruía das plantas medicinais, utilizadas a partir do conhecimento empírico baseado em observação, tentativa e erro⁽¹⁾.

A partir do século XIX, com o avanço da química e suas técnicas, o estudo de fitoterápicos apresentou um crescimento considerável. Atualmente, até 86% da população mundial que necessita de atenção primária à saúde recorre a produtos de origem natural^(2,3). Além do uso direto na medicina natural alternativa, as plantas são a base para mais de 50% do arsenal medicamentoso disponível⁽⁴⁾.

Dentre tantas ervas utilizadas na medicina natural brasileira e listadas na RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde), encontra-se a *Casearia sylvestris* (Salicaceae). Esta espécie vegetal é nativa do Brasil e conhecida popularmente como Guaçatonga ou Erva-de-Bugre. As propriedades farmacológicas atribuídas à *C. sylvestris* incluem potencial diurético, antisséptico oral, cicatrizante, antídoto para picada de cobra, depurativo do sangue, anestésico, anti-herpético⁽⁵⁾, anti-inflamatório⁽⁶⁾, antitumoral⁽⁷⁾ e antimicrobiano⁽⁸⁻¹⁰⁾.

Estudos sobre a atividade antibacteriana da *C. sylvestris* demonstraram efetividade contra diversas espécies de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O óleo essencial extraído dessa espécie vegetal foi capaz de inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, efeito verificado através do método de difusão em ágar e confirmado pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)⁽¹⁰⁾. A inibição do crescimento também foi observada em *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, e *Enterococcus faecalis*⁽⁹⁾.

O gênero *Enterococcus* engloba bactérias em formato de cocos, Gram-positivos, presentes no meio ambiente e na microbiota do trato gastrointestinal (TGI). As espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são as mais encontradas no trato digestório, embora possam atuar como patógenos, estando comumente envolvidas em infecções do trato urinário, de cateter, de ferida, sepse, endocardite, dentre outras infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS)⁽¹¹⁾.

Desde o primeiro relato, em 1980, a emergência de isolados de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) em infecções é uma preocupação dos epidemiologistas e de toda a equipe de saúde. Tal fato deve-se ao potencial de disseminação do micro-organismo, pela facilidade na aquisição de elementos genéticos móveis e pela escassez de fármacos efetivos para tratar as infecções por eles causadas^(11,12).

A busca por substâncias com ação antimicrobiana tem aumentado devido ao surgimento de bactérias com resistência aos fármacos já existentes. O problema ocasionado por essa resistência é considerado um importante obstáculo para a saúde pública^(13,14).

Percebendo a importância de se conhecer o potencial farmacológico das plantas, o Ministério da Saúde do Brasil documenta a necessidade de se estimular o uso da medicina fitoterápica. A RENISUS reúne espécies vegetais que são de interesse para a farmacologia brasileira, em especial para o atendimento público pelo SUS, e tem ainda o objetivo de estimular e orientar pesquisas externas

envolvendo essas plantas⁽¹⁵⁾.

Nesse sentido, em consonância ao proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela RENISUS, justifica-se a avaliação do potencial farmacológico do extrato de *C. sylvestris* contra isolados clínicos de *Enterococcus* resistentes à vancomicina, visando uma alternativa ao controle de infecções causadas por tais micro-organismos.

METODOLOGIA

A matéria-prima vegetal foi adquirida da empresa Chá & Cia e apresentava laudo de identificação botânica, informações sobre o fornecedor (Quimer Comercial LTDA) e número do lote (83/14). Para obtenção do extrato de *C. sylvestris*, 50 gramas de folhas e galhos secos foram submetidos à maceração em 1 litro de solução hidroalcoólica (álcool 70%), em frasco âmbar por sete dias, com agitação manual a cada dois. Posteriormente, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado. O material que restou no frasco foi submetido a um segundo processo de maceração. O extrato obtido das duas macerações foi congelado a -80°C e liofilizado. O extrato seco foi diluído em DMSO até a concentração de 400 mg/mL, sendo denominado extrato bruto, e armazenado em geladeira. Para os experimentos, o extrato bruto foi diluído com solução de NaCl (0,9%) para obtenção das concentrações teste.

A partir do banco de culturas bacterianas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), foram selecionados e reativados, em caldo BHI, 20 isolados clínicos de *Enterococcus faecium*, identificados anteriormente como sendo resistentes à vancomicina, todos provenientes de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UFTM (HC-UFTM).

A CIM de vancomicina foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo metodologia do *Clinical and Laboratory Standards Institute*⁽¹⁶⁾. Inicialmente, foi preparada a solução estoque de vancomicina, na concentração de

2560 µg/mL, para ser diluída 1:10 antes da utilização. Nos poços da placa foram adicionados 180 µL de caldo Mueller-Hinton (MH) e procedeu-se a diluição seriada da solução estoque de vancomicina (32 µg/mL a 256 µg/mL). O inóculo (20 µL) foi feito com suspensão bacteriana na escala 0,5 de *McFarland*, diluída 1:20 em caldo MH. A placa foi incubada em aerobiose, a 37°C, por 24h.

Como controle negativo foi utilizado somente meio de cultura e como controle positivo do crescimento foi utilizado meio de cultura e suspensão bacteriana (sem adição de vancomicina). Adicionalmente, foi utilizada a amostra de referência *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 para determinação da CIM para vancomicina (concentrações entre 1 µg/mL a 8 µg/mL).

A interpretação dos resultados foi feita mediante análise do crescimento bacteriano, pela turbidez do meio de cultura. A CIM foi considerada como a menor concentração de agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do micro-organismo.

A atividade inibitória de *C. sylvestris* contra isolados clínicos de *Enterococcus faecium* (n = 20) foi avaliada pelo método de difusão em meio sólido, por ser considerado um método mais sensível para determinação de atividade antimicrobiana de extratos de planta quando comparado à disco-difusão⁽¹⁷⁾. Brevemente, o micro-organismo teste (10⁵ UFC/mL) foi inoculado em meio BHI sólido (1,5% de ágar) e vertido em placas de Petri estéreis. Após solidificação do meio, foram perfurados poços de 4 mm de diâmetro nos quais foi adicionado o extrato de *C. sylvestris* em diferentes concentrações (50 a 400 µg/mL). Como controle positivo da atividade inibitória foi utilizado vancomicina (2560 µg/mL) e como controle negativo foi utilizado NaCl (0,9%). As placas foram mantidas em temperatura ambiente, por 30 minutos, para a difusão dos extratos e, em seguida, incubadas em aerobiose a 37°C. Após 18 horas, as placas foram avaliadas em relação à formação de halos de inibição do crescimento do micro-organismo ao redor dos poços contendo o extrato. Atividade inibitória foi considerada quando houve formação de halos com diâmetro igual ou superior a 9 mm⁽¹⁸⁾.

A CIM do extrato de *C. sylvestris* contra os isolados de *E. faecium* também

foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, utilizando o extrato nas concentrações de 75 µg/mL a 200 µg/mL (com incrementos de 25 µg/mL), obtidas a partir da solução estoque do extrato bruto (concentração original de 400 mg/mL). Entretanto, a coloração marrom do extrato de *C. sylvestris* dificultou a visualização do crescimento bacteriano pela turbidez. A fim de minimizar essa interferência, foi utilizado resazurina (0,01%), um marcador de viabilidade celular por oxirredução que, na presença de células viáveis, é oxidado, alterando sua cor original de roxo para rosa⁽¹⁷⁾. Posteriormente, a viabilidade das células bacterianas foi avaliada, transferindo uma alíquota contida em cada poço para placas contendo ágar BHI. As placas foram incubadas a 37°C, em aerobiose, por até 24 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes metodologias têm sido descritas para obtenção de extratos de plantas. No caso de *C. sylvestris* podem ser obtidos óleos essenciais, ou extratos aquoso, hidroalcoólico, alcoólico e metanólico. De acordo com Cavalheiro *et al.*⁽⁹⁾, o maior rendimento para esta planta foi observado quando o extrato foi obtido por maceração em álcool 70% (extrato hidroalcoólico), o que justifica a escolha do procedimento no presente trabalho. Obteu-se 2,85 gramas de extrato seco, o qual foi ressuspenso em DMSO para realização dos experimentos.

Os isolados clínicos de *E. faecium* resistentes à vancomicina selecionados (Tabela 1) foram provenientes de sete diferentes sítios, e isolados no período de 2009 a 2016.

No teste de microdiluição em caldo, para determinação da CIM de vancomicina, todos os isolados de *E. faecium* selecionados cresceram na maior concentração de vancomicina avaliada (256 µg/mL), caracterizando-os como VREs, de alto nível de resistência para vancomicina (CIM > 64 µg/mL). Para a linhagem de referência *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a CIM de vancomicina foi de 4 µg/mL.

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de *C. sylvestris*, realizada pelo teste de difusão em meio sólido, mostrou que os isolados de VRE

foram, em geral, sensíveis ao extrato, uma vez que foi possível observar halos de inibição (Tabela 2).

Tabela 1. Origem das amostras de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina.

ORIGEM	ISOLADO
Feridas	324, 391, 1138, 1176
Sangue	445, 1113, 1127, 1173
Swab Anal	1109, 1134, 1157, 1171
Bile	327
Líquido Peritoneal	1123
Líquido Ascítico	1167
Urina	293, 373, 413, 1159, 1183

Fonte: Elaborado pelos autores. Registro dos isolados clínicos mantidos no Laboratório de Microbiologia da UFTM.

Os isolados identificados como 391, 1127, 1176 e 1183 foram os mais sensíveis, sendo inibidos mesmo na menor concentração de extrato avaliada (50 µg/mL) (Tabela 2). Os isolados 324 e 413 foram inibidos somente pelas maiores concentrações do extrato de *C. sylvestris* (200 e 400 µg/mL).

Na avaliação da CIM do extrato de *C. sylvestris* frente aos isolados de VRE, pela técnica de microdiluição em caldo, foi observado que a concentração de 175 µg/mL foi a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento dos isolados de VRE, sendo então definida como a CIM do extrato de *C. sylvestris*.

Apesar da dificuldade na interpretação dos resultados de CIM por se tratar de um extrato escuro, a análise da viabilidade celular confirmou os resultados obtidos nos testes de microdiluição, não sendo observado crescimento bacteriano, com formação de colônias visíveis em meio sólido, para as linhagens de enterococos, na presença do extrato de *C. sylvestris* em concentração igual ou superior a 175 µg/mL. Nenhum crescimento de *E. faecalis* ATCC 29212 em meio sólido foi observado, confirmando também a atividade do extrato de *C. sylvestris* contra a linhagem de referência (CIM=75 µg/mL).

TABELA 2. Diâmetro, em milímetro (mm), dos halos de inibição do crescimento dos isolados VRE pelo extrato bruto de *C. sylvestris*, através do teste de difusão em meio sólido.

Nº amostra	Concentração do extrato de <i>C. sylvestris</i> (µg/mL)			
	50	100	200	400
293	7	12	14	18
324	-	-	12	17
327	7	10	13	18
373	-	11	14	16
391	9	11	15	19
413	-	-	10	19
445	-	10	14	19
1109	8	10	13	18
1113	-	9	13	19
1123	-	11	17	20
1127	9	13	16	21
1134	-	13	16	21
1138	-	9	11	17
1157	-	12	15	20
1159	7	14	16	19
1167	-	12	16	19
1171	6	9	11	18
1173	-	12	15	19
1176	11	15	20	22
1183	9	11	16	21

Fonte: Elaborado pelos autores. Resultados obtidos com o teste de difusão em meio sólido utilizando extrato de *C. sylvestris*.

Aplicando o método de disco-difusão, Falcão *et al.*⁽¹⁰⁾ descreveram a ação antimicrobiana do óleo essencial de *C. sylvestris* contra *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. Neste método, sobre o meio sólido, previamente inoculado com o micro-organismo de interesse, são dispostos discos de papel embebidos com a substância teste em diferentes concentrações; as placas são incubadas e é avaliado o diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano ao redor do papel

contendo a substância teste.

Gonçalves *et al.*⁽¹⁹⁾, utilizando o método de disco-difusão, avaliaram a ação do extrato hidro-alcoólico de folhas de *C. sylvestris* (na proporção de 10%) contra 10 diferentes espécies bacterianas, incluindo Gram-positivas e negativas obtidas de infecções clínicas, e concluíram que não houve atividade inibitória contra nenhuma das bactérias avaliadas. Tal resultado divergente dos resultados obtidos no presente estudo pode ser decorrente da baixa concentração dos extratos avaliados por Gonçalves e colaboradores⁽¹⁹⁾, da fonte do extrato (somente folhas ou folhas e galhos) ou da sensibilidade variável dos diferentes gêneros e espécies bacterianas avaliados.

Utilizando o método de CIM, Falcão *et al.*⁽¹⁰⁾ avaliaram a atividade do óleo essencial de *C. sylvestris*, sendo obtido CIM de 7,5 µL/mL para *E. faecalis*. No presente estudo, a CIM do extrato de *C. sylvestris* frente a *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina foi de 175 µg/mL. Esta diferença pode ser decorrente da maior resistência a antimicrobianos das linhagens bacterianas utilizadas neste estudo, além da própria diferença na atividade inibitória do extrato quando comparado ao óleo essencial de *C. sylvestris*.

Cavalheiro⁽⁹⁾ analisaram a atividade inibitória de extratos de folhas de *C. sylvestris* obtidos por diferentes métodos de extração (infusão, decocção, maceração e percolação) utilizando diferentes sistemas de solventes (100% de água; 100% de etanol; 100% de metanol; água:etanol (3:7); água:etanol (7:3); água:metanol (7:3); água: metanol (3:7)) contra linhagens de referência correspondentes a espécies bacterianas da cavidade oral, dentre elas *Enterococcus faecalis* ATCC 4082. Todos os extratos avaliados apresentaram valores de CIM acima de 400 µg/mL para todas as linhagens avaliadas, e alguns mostraram atividade bactericida.

Além da atividade antibacteriana do extrato de *C. sylvestris* já foram reportadas: (1) atividade antiparasitária; (2) ação fungicida, contra *Saccharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus neoformans*; (3) ação fungistática, contra *Candida*

albicans, *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis*; (4) atividade redutora de biofilmes de *Streptococcus mutans* e *C. albicans*^(20,21).

A atividade antimicrobiana bem como as demais ações descritas para *C. sylvestris* são decorrentes da presença de compostos químicos específicos. As atividades farmacológicas desta planta são devidas especialmente aos compostos diterpenos clerodânicos e aos sesquiterpenos. Dentre os diterpenos estão as casearinas, casearvestrinas e caseargrevinas⁽²²⁾. Já entre os sesquiterpenos estão principalmente o biciclogermacreno, germacros D, óxido de cariofileno e β -cariofileno, identificados através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa⁽⁹⁾. A avaliação da toxicidade destes compostos demonstrou ação citotóxica intermediária^(21,23), com ação sobre linhagens tumorais, como células de melanoma, glioblastoma e do cólon⁽²⁴⁾.

Ameni *et al.*⁽²⁵⁾ avaliaram a toxicidade do extrato etanólico de *C. sylvestris* em camundongos *Wistar*, utilizando doses 2 e 4 vezes acima da dose terapêutica descrita como anti-ulcerativa. Nenhuma alteração histológica foi observada, sendo o extrato considerado sem toxicidade. Adicionalmente, os camundongos também foram tratados com uma única dose de 2000 mg/kg, não sendo observados sinais de toxicidade aguda.

Em suma, o extrato bruto de *C. sylvestris* apresentou importante atividade inibitória contra isolados clínicos de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina, apresentando-se promissor no controle de infecções causadas por tais bactérias. Estudos adicionais avaliando a toxicidade e os compostos responsáveis pela atividade anti-*Enterococcus* de *Casearia sylvestris* devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

- (1) Hoffmann, R; Anjos, MCR. 2018. Construção histórica do uso de plantas medicinais e sua interferência na socialização do saber popular. *Guaju*. 4 (2): 142-163.
- (2) Brasil. Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

- (3) WHO. World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023. Geneva: World Health Organization, 2013.
- (4) Pimentel, VP; Vieira, VAM; Mitidieri, TL; Oliveira, FFS; Pieroni, JP. 2015. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? *Revista do BNDS*. 43: 41-89.
- (5) Moreira, RRD; Santos, AG; Carvalho, FA; Perego, CH; Creveli, EJ; Crotti, AEM; Cogo, J; Cardoso, MLC; Nakamura, CV. 2019. Antileishmanial activity of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* essential oils on *Leishmania amazonensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 6: e33.
- (6) Albano, MN; da Silveira, MR; Danielski, LG; Florentino, D; Petronilho, F; Piovezan, AP. 2013. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). *J Ethnopharmacol*. 147 (3): 612-617.
- (7) Ferreira, PMP; Bezerra, DP; Silva, JN; Costa, MP; Ferreira, JRO; Alencar, NMN; Figueiredo, IST; Cavalheiro, AJ; Machado, CML; Chammas, R; Alvez, APNN; Moraes, MO; Pessoa, C. 2016. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: in vivo and ex vivo methods and microscopy examinations. *J Ethnopharmacol*. 186: 270-279.
- (8) Ribeiro, SM; Fratucelli, EDO; Bueno, PCP; de Castro, MKV; Francisco, AA; Cavalheiro, AJ; Klein, MI. 2019. Antimicrobial and antibiofilm activities of *Casearia sylvestris* extracts from distinct Brazilian biomes against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complement Altern Med*. 19 (1): 308.
- (9) Cavalheiro, AH; Godoi, APT; Carvalho, TC; Catirse, AB; Furtado, NAJC. 2016. Antimicrobial potential of *Casearia sylvestris* against oral bacteria. *Rev Odontol Unesp*. 45 (4): 214-218.
- (10) Falcão, L; Roman, SS; Zakrzewski, SBB; Pereira, AAM; Paroul, N; Cansian, RL. 2017. Ação antimicrobiana do óleo essencial de folhas de *Caseariasylvestris* swartz. *Perspectiva*. 41 (153): 115-123.
- (11) Ahmed, MO; Baptiste, KE. 2018. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microb Drug Resist*. 24 (5): 590-606.
- (12) ONU. Organização das Nações Unidas (Brasil). OMS publica lista inédita de bactérias resistentes a antibióticos. 2017. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/oms-publica-lista-inedita-de-bacterias-resistentes-a-antibioticos/>. Acesso em: 01 mar. 2017.

- (13) Silva, MO; Aquino, S 2018. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. *Rev Epidem Contr Infec.* 8 (4): 472-482.
- (14) ONU. Organização das Nações Unidas (Brasil). OMS lança estratégia para combater resistência de bactérias a antibióticos. 2019. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/oms-lanca-estrategia-para-combater-resistencia-de-bacterias-a-antibioticos/>. Acesso em: 19 jun. 2019.
- (15) BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, 2009. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnpmf/ppnpmf/arquivos/2014/renisus.pdf> Acesso em: 12 ago. 2019.
- (16) CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically - Approved Standard M7-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.
- (17) Alves, EG; Vinholis, AHC; Casemiro, LA; Furtado, NAJC; Andrade e Silva, LA; Cunha, WR; Martins, CHG. 2008. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e substâncias puras. *Quim Nova.* 31 (5): 1224-1229.
- (18) Tagg, JR; Dajani, AS; Wannamaker, LW. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756.
- (19) Gonçalves, AL; Alves Filho, A.; Menezes, H. 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol.* 72 (3):353-358.
- (20) Pereira, FG; Marquete, R; Domingos, LT; Rocha, MEN; Ferreira-Pereira A; Mansur, E; Moreira, DL. 2017. Antifungal activities of the essential oil and its fractions rich in sesquiterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. *An Acad Bras Cienc.* 89(4): 2817-2824.
- (21) Espinosa, J; Medeiros, LF; Souza, A; Güntzelb, ARC; Rücker, B; Casali, EA; Ethur, EM; Wink, MR; Torres, ILS. 2015. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* Sw exhibits in vitro antioxidant and antimicrobial activities and in vivo hypolipidemic effect in rats. *Rev Bras Pl Med.* 17 (2): 305-315.
- (22) Araújo, EJF; Araújo, DYML; Freitas, RM; Ferreira, PMP. 2014. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 35 (3): 355-361.

(23) Ferreira, PMP; Militão, GCG; Lima, DJB; Costa, NDJ; Machado, KC; Santos, AG; Cavalheiro, AJ; Bolzani, VS; Silva, DHS; Pessoa, C. 2014. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. *Chem Biol Interact.* 222: 112-125.

(24) Acquaviva, R; Malfa, GA; Loizzo, MR; Xiao, J; Bianchi S; Tundis, R. 2022. Advances on Natural Abietane, Labdane and Clerodane Diterpenes as Anti-Cancer Agents: Sources and Mechanisms of Action. *Molecules.* 27 (15): 4791.

(25) Ameni, AZ; Latorre, OA; Torres, LMB; Górniak, SL. 2015. Toxicity study about a medicinal plant *Casearia sylvestris*: a contribution to the brazilian unified health system (SUS). *J Ethnopharmacol.* 175: 9- 13.