

Susceptibilidade in vitro de *Escherichia coli* na avaliação da atividade bactericida de óleo-resinas dopadas com óxidos metálicos

Diogo José Horst (UTFPR) diogohorst@gmail.com
Sergio Mazurek Tebcherani (UTFPR) sergiom@utfpr.edu.br
Evaldo Toniolo Kubaski (UEPG) evaldotk@outlook.com
Thiago Sequinel (UFGD) sequinel.t@gmail.com

Resumo:

Este trabalho teve como objetivo avaliar atividade bactericida de diferentes óleo-resinas vegetais (*Styrax Benzoim*, *Commiphora mirrha*, e *Boswellia papyrifera*) dopadas com óxidos metálicos de TiO_2 (P25), MoO_3 e Cu_2O . Verificou-se a susceptibilidade in vitro do patógeno bacteriano Gram-negativo *E.coli*. O antibiograma foi realizado utilizando o método semi-quantitativo Kirby-Bauer (KB) teste de difusão em ágar. Os materiais obtidos foram caracterizados por técnicas de espectrofotometria na região ultravioleta visível e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados mostram que na maioria dos casos, as composições estudadas apresentaram atividade bactericida, inibindo o crescimento do micro-organismo em questão, principalmente durante as primeiras 24 horas de ensaio.

Palavras chave: Atividade bactericida, Materiais, Resinas vegetais, Biopolímeros, Óxidos cerâmico-metálicos.

In vitro susceptibility of *Escherichia coli* in the evaluation of bactericidal activity of oleoresins with metal oxides

Abstract

This work aimed to evaluate bactericidal activity of vegetable oil-resins (*Styrax benzoin*, *Commiphora mirrha*, and *Boswellia papyrifera*) with metal oxides TiO_2 , P25, MoO_3 e Cu_2O . The in vitro susceptibility of Gram-negative bacteria pathogen *E. coli* was tested. The antibiogram was performed using the semi-quantitative method Kirby-Bauer (KB) agar diffusion test. The materials were characterized by spectrophotometry in the ultraviolet visible (UV-Vis). In addition, the morphology of the materials was characterized by scanning electron microscopy (SEM). The results show that in most cases the materials showed bactericidal activity, inhibiting the growth of micro-organism in question, particularly within the first 24 hours of testing.

Key-words: Bactericidal activity, Materials, Plant resins, Biopolymers, Ceramic-metal oxides.

1. Introdução

A história da medicina e da farmácia é conhecida por usar extratos e óleo-resinas de plantas para curar doenças. Estas são conhecidas por apresentarem ação analgésica, antioxidante, antifúngica, antisséptica, antibacteriana, adstringente, sedativa e estimulante entre outras propriedades terapêuticas (KONG et al., 2014; SHIKOV et al., 2014; SULTANA et al., 2015; ÖZDEMİR & ALPINAR, 2015; BAHMANI et al., 2015).

A demonstração da presença de produtos naturais, tais como terpenos, alcaloides, flavonoides, cumarinas e outros metabolitos secundários em plantas medicinais proporciona uma validação científica para a utilização popular destas plantas (MOHAMED et al., 2014; SU et al., 2011; CAETANO DA SILVA et al., 2014).

As resinas contêm principalmente compostos terpenóides com pouco ou nenhum carboidrato e são geralmente insolúveis em água, ao contrário de gomas que são solúveis em água e, predominantemente compostas de inúmeros carboidratos (VELMURUGAN et al., 2016). Estas características significam que as resinas desempenham um bom papel como meios de ligação e adesivos (MATHESON & MCCOLLUM, 2014).

Do ponto de vista analítico, a maioria dos estudos presentes na literatura estão focados na caracterização de compostos aromáticos do tipo monolignóis que constituem a maior parte das resinas (LANGENHEIM, 2003; PHILLIPI et al., 2009).

Recentemente, o uso de resinas para a síntese mais verde de novos compostos antibacterianos tem sido amplamente estudado por diversos pesquisadores (DONG et al., 2014; POOJA et al., 2014; BAJPAI & KUMARI, 2015; LI et al., 2015; KORA & RASTOGI, 2015).

De fato, a síntese de novos agentes antimicrobianos, vem ganhando maior interesse na pesquisa acadêmica e também na indústria, devido as suas potenciais aplicações, proporcionando qualidade e benefícios seguros para muitos materiais. Contudo, os baixos pesos moleculares dos agentes antimicrobianos sofrem de muitas desvantagens, tais como a toxicidade para o ambiente e a atividade antimicrobiana de curto prazo (NISHAT et al., 2010).

Nanopartículas de metal/cerâmica tem demonstrado determinada bioatividade devido à ação oligodinâmica. A adição de partículas de metais como ouro, prata e titânio tem sido sugerida por diversos pesquisadores como eficiente no combate a diversos micro-organismos patógenos (KONG et al., 2014).

Diferentes compósitos foram estudados com o intuito de se obter um material com propriedades específicas desejadas para aplicações biomédicas, normalmente matrizes de polímero dopadas com partículas de cerâmica/vidro tem sido investigadas (WANG, 2003; VENKATESHAM et al., 2014; SIMPSON et al., 2015).

No entanto, enquanto numerosos materiais têm sido investigados, o material ótimo (ideal) ainda tem de ser desenvolvido devido à natureza complexa da aplicação pretendida (REZWAN et al., 2006).

A natureza pode combinar minerais frágeis e moléculas orgânicas em compósitos híbridos que são altamente organizados para alcançar excepcional resistência à fratura (MAYER, 2005; MUNCH et al., 2008). Nanoestruturas híbridas com fase orgânico-inorgânica e materiais sobre a sua base se apresentam como uma classe promissora de avançados materiais multifuncionais (YUAN & MULLER, 2010; ZIMA et al., 2013).

Tendo isto posto, o objetivo desta investigação foi estudar a atividade bactericida de resinas vegetais em estado puro e também dopadas com óxidos metálicos na tentativa de inibir o crescimento da bactéria bacilar Gram-negativa *Escherichia coli*.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

Para realização deste trabalho, utilizou-se o ágar Muller-Hilton (Kasvi), a resina de Benjoim (*Styrax benzoin*) originalmente proveniente de Singapura, a resina de Mirra (*Commiphora myrrha*) proveniente da Somália, e a resina de Olíbano (*Boswellia papyrifera*) proveniente da

Etiópia foram adquiridas da Mountain Rose Herbs (Eugene, Oregon, USA). O micro-organismo *Escherichia coli* ATCC 8739 foi adquirido através do Laboratório de Controle de Qualidade e Pesquisa (Curitiba – PR, Brasil) com procedência original da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA).

2.2 Métodos

Os testes in vitro foram realizados usando o método de difusão semi-quantitativo Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966; BONEV et al., 2008). Placas com ágar Mueller-Hinton (MHA) foram usadas para determinar a atividade antimicrobiana das resinas em estado puro e dopadas com os óxidos de metal. Óxidos de Titânio (TiO_2) - P25, de molibdênio (MoO_3), e óxido de cobre (Cu_2O) foram adicionados às resinas a uma concentração fixa de 5 % em peso, este valor foi definido pela sensibilidade dos microorganismos ao antimicrobiano através da concentração inibitória mínima (MIC) (ADREWS, 2001).

Nos testes, o meio de ágar foi preparado em placas de Petri, em sequência furo foram realizadas para inserção do material a ser testado. Utilizando um swab estéril de transferência, $1,5 \times 10^8$ UFC / mL de suspensão contendo microorganismos foram inoculadas no meio de ágar. As placas foram incubadas na estufa bacteriológica a 37 °C durante 48 h, com controles de crescimento realizados a cada 6 horas; a intenção foi causar a produção de biofilme bacteriano. A eficácia antibacteriana foi medida tendo em conta o halo criado entre o material e unidades formadoras de colônias (UFC). Para obter uma contagem mais precisa das células viáveis, foi utilizado o software ImageJ com o plug-in automatizado para contagem de colônias (MAROTZ et al., 2001; PUTMAN et al., 2005; SIEWERTS et al., 2008).

A análise de microscopia foi utilizado o microscópio Jeol (JSM-6610LV). Os testes foram realizados consultando as normas técnicas ISO-16700:2004 e ASTM E2809-13.

Foram realizadas análises de espectroscopia na região do UV-visível (Shimadzu IR-Prestige-21) na faixa espectral de 300nm a 900nm.

Para a análise estatística do ensaio de antibiograma o conteúdo utilizado foi o delineamento experimental de blocos contextualizado (RODRIGUES & LEMA, 2009; MUCELIN 2006). Nesta pesquisa os blocos são as 16 amostras (dados brutos) e os tratamentos são os 15 tipos de material bactericida + placa de teste controle ou placa prova (totalizando portanto 16 ensaios). Para o tratamento dos dados obtidos, foi utilizado o software de estatística SASM Agri-8.1 (CANTERI et al., 2001).

3. Resultados e discussão

A Figura 1, Figura 2, Figura 3 e a Figura 4 apresentam os resultados referentes à realização do teste antibiograma de difusão em ágar para o microorganismo patógeno Gram-negativo *Escherichia coli*, utilizando as resinas de *S. benzoim* (resina B), *C. myrrha* (resina M) e *B. papyrifera* (resina P) em estado puro e também dopadas com óxidos metálicos de titânio (TiO_2 - P25), molibdênio (MoO_3), e cobre I (Cu_2O).

Durante o período inicial de 6 horas, as análises foram similares para as composições em estudo, com exceção da resina de *S. benzoim* dopada com óxido de titânio, a qual apresentou maior atividade bactericida durante este intervalo de tempo, porém após 12 horas de ensaio esta apresentou queda na atividade.

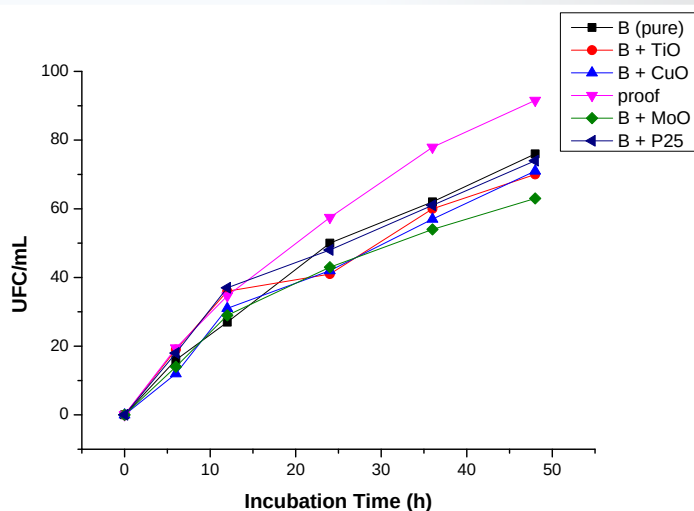


Figura 1 – Antibiograma de *E. coli* utilizando a resina de *S. benzoin* em fase pura e também dopada com óxidos

Durante o período de tempo 12 horas, notou-se que a placa sem material bactericida (placa prova) diferiu significativamente ($p=5\%$) da maioria dos casos, com exceção da resina de *S. benzoin* dopada com óxido de molibdênio ($B+MoO_3$), resina de *S. benzoin* dopada com óxido de cobre I ($B+Cu_2O$), resina de *B. papyrifera* dopada com óxido de titânio ($P+TiO_2$), *B. papyrifera* dopada com óxido de molibdênio ($P+MoO_3$), resina de *B. papyrifera* dopada com óxido de cobre ($P+Cu_2O$), resina de *C. myrrha* em estado puro (*M* pura), e resina de *C. myrrha* dopada com óxido de titânio ($M+P25$).

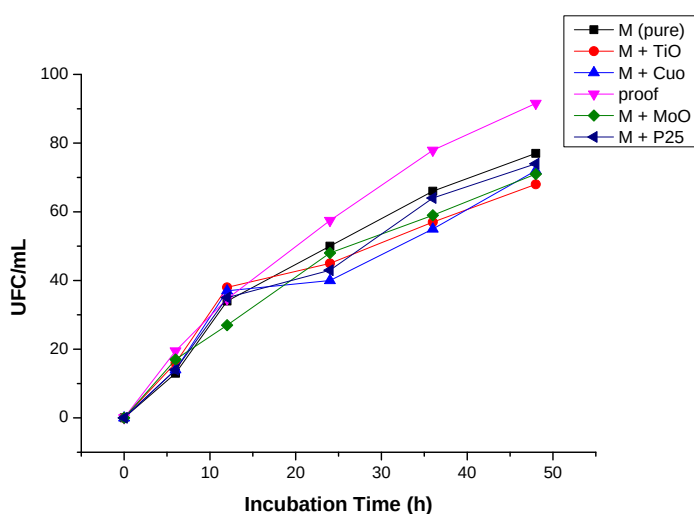


Figura 2 – Antibiograma de *E. coli* utilizando a resina de *C. myrrha* em fase pura e também dopada com óxidos

No período de tempo de 24 horas, percebeu-se que a placa contendo o microorganismo *E. coli* sem adição de material bactericida (placa prova) diferiu significativamente ($p=5\%$) da maioria dos casos, com exceção da placa contendo a resina de *S. benzoin* em estado puro (*B* pura), resina de *S. benzoin* contendo óxido de titânio ($B+P25$), resina de *B. papyfera* em estado puro (*P* pura), resina de *B. papyrifera* contendo óxido de molibdênio ($P+MoO_3$), resina de *C. myrrha* em estado puro (*M* pura), e resina de *C. myrrha* contendo óxido de molibdênio ($M+MoO_3$). Estes materiais apresentaram maior atividade bactericida quanto a colonização inicial e formação de biofilme por *E. coli*.

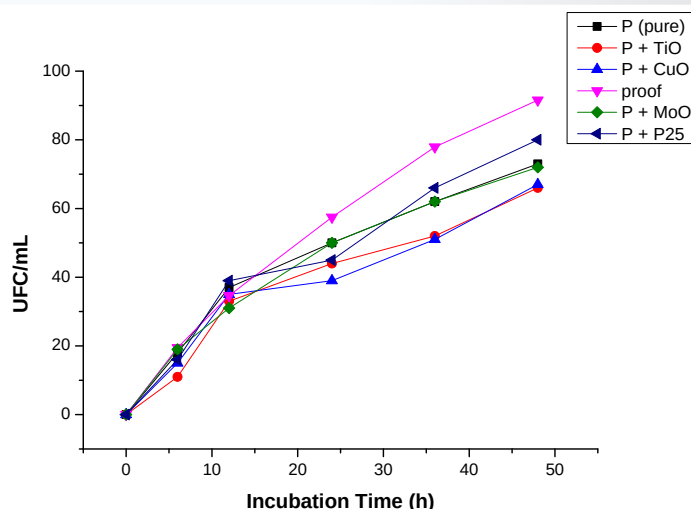


Figura 3 – Antibiograma de *E.coli* utilizando a resina de *B. papyrifera* em fase pura e também dopada com óxidos

Durante as 36 horas iniciais de ensaio, na maioria dos casos a placa prova (sem a presença de bacteriostático) diferiu significativamente das demais placas contendo os materiais em questão, com exceção da resina de *B. papyrifera* contendo óxido de titânio (P+P25), resina de *C. myrrha* em estado puro (M pura), e resina de *C. myrrha* contendo óxido de titânio (M+P25), indicando, portanto que estes materiais apresentaram menor eficiência quanto à colonização inicial e formação de biofilme do micro-organismo neste período de tempo. Já nas últimas 48 horas de ensaio, houve diferença significativa entre a placa prova e a maioria dos casos, com uma única exceção da resina de *B. papyrifera* dopada com óxido de titânio (P+P25).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se perceber que na maioria dos casos os materiais apresentaram atividade bactericida, principalmente durante as primeiras 24 horas de ensaio, portanto inibindo o crescimento e fixação inicial do microorganismo em questão.

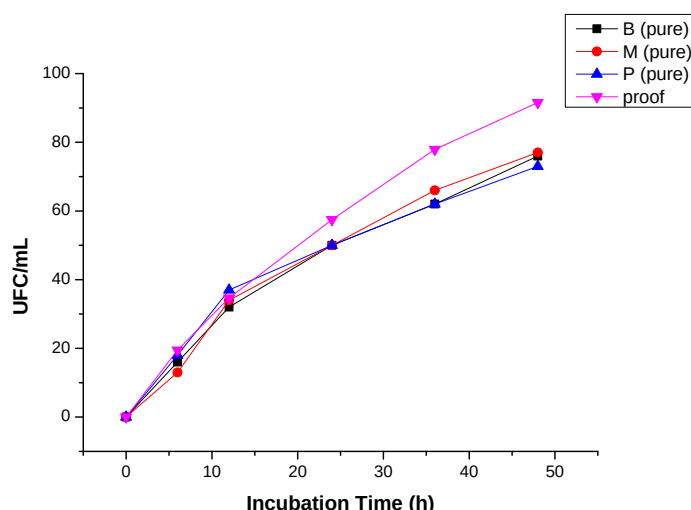


Figura 4 – Antibiograma de *E.coli* utilizando as resinas de *S. benzoin*, *C. myrrha* e *B. papyrifera* em estado puro

Segundo Donland & Costerton (2002), em relação a formação de biofilmes bacterianos, existe uma primeira adesão ainda reversível mantida por interações físico-químicas não específicas constituindo o alicerce para o crescimento do biofilme. A segunda fase da adesão consiste na

transição do estágio reversível para o irreversível, neste as bactérias passam a secretar substâncias que serão responsáveis pela manutenção da adesão e da camada que envolve o biofilme. Ainda nesta fase há o início da formação de microcolônias e do desenvolvimento da arquitetura do biofilme maduro. A Figura 5 apresenta formação de biofilme de *E.coli* durante as primeiras 24 horas de ensaio.



Figura 5 – Formação de biofilme de *E. coli* sobre placa de Petri contendo resina de *B. papyrifera* em estado puro

Para Stooley (2002) e Cooley (2014) os biofilmes maduros apresentam estrutura envoltas por diversas substâncias, principalmente açúcares, e rodeados por poros e canais de água que funcionam como um sistema de troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos que precisam ser secretados para fora do biofilme.

De acordo com Carter et al., (2016) e Anvarian et al., (2016) ao realizarem um estudo sobre a fisiologia de *E. coli*, notaram que a fixação irreversível deste microorganismo, se dá através da formação de biofilme, ocorrendo durante as primeiras horas de colonização do microorganismo. Neste trabalho, a formação de biofilme bacteriano também foi percebido durante as primeiras 24 horas de ensaio, corroborando com a afirmação realizadas pelos autores.

A Figura 6 apresenta os espectrogramas na região UV-vis para as amostras das resinas de *B. papyrifera* (resina P), *C. myrrha* (resina M) e *S. benzoin* (resina B) em estado puro.

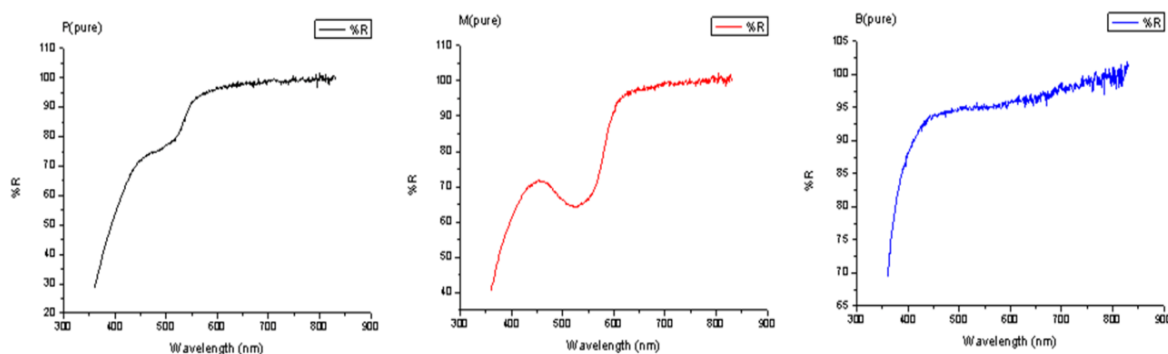


Figura 6 – Espectrograma das amostras de resina de *B. papyrifera*, *C. myrrha* e *S. Benzoin* em estado puro

De acordo com Kora et al., (2012) o pico identificado entre ~ 350 nm a ~ 420 nm confirma a presença da goma de olíbano (*Boswellia papyrifera*). De acordo com Bekana et al., (2014), a resina de *B. papyrifera* apresenta diversos diterpenos e tetranortriterpenos.

Rahman et al., (2005) ao realizar a investigação fitoquímica do extrato da casca e do caule de *B. papyrifera* encontrou diversos grupos glicosídeos estilbeno e triterpenos, juntamente com compostos já conhecidos: ácido boswélico, ácido beta-elemonico, ácido beta-boswélico, e beta-sitosterol. Ainda de acordo com o mesmo autor, os glicosídeos de estilbeno exibem significativa inibição da fosfodiesterase I e xantina-oxidase. Os triterpenos (3-9) exibiram atividades inibitórias da endopeptidase.

As endopeptidases quebram ligações peptídicas de aminoácidos, deste modo à produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) de elevado peso molecular segregadas por *E.coli* são reduzidas, portanto inibindo seu crescimento.

As SPE's estabelecem a integridade funcional e estrutural dos biofilmes, sendo consideradas componentes fundamentais que determinam as propriedades físico químicas de um biofilme (STAUT et al., 2004). Em sua maioria, as SPE's são compostas de polissacarídeos extracelulares (PEC) (exopolissacarídeos) e proteínas, incluindo outras macromoléculas como o DNA, lipídios e substâncias húmicas (FLEMMING et al., 2000; ULLRICH, 2009).

Os PECs são o material de construção dos assentamentos bacterianos, para permanecer ligados à superfície exterior da célula. Estes compostos são importantes na formação de biofilme e células de ligação a superfícies. Os PECs constituem de 50% a 90% de matéria orgânica total de um biofilme (DONLAN, 2002; DONLAN & COSTERTON, 2002; SURESH & MODY, 2009; WELMAN, 2009).

Em relação à Figura 6, o pico identificado em torno de 400nm com um pico secundário proeminente em torno de 480nm prova a presença do extrato de mirra (EL-SHERBINY et al., 2013). Assim como este trabalho, outros estudos comprovam a atividade antimicrobiana presente na óleo resina e extratos de mirra, principalmente devido a presença de monoterpenos e sesquiterpenos (TIPTON et al, 2003, MASSOUD et al, 2004).

De acordo com Shen et al., (2012), os triterpenóides são os principais constituintes isolados a partir da resina do gênero *Commiphora* enquanto os flavonoides e lignanas comumente ocorrem nos caules dessa espécie. Para Baser et al., (2003) e Marongiu et al., (2005), a composição química dos óleos essenciais de várias espécies de *Commiphora* apresentam principalmente monoterpenos, sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos que invariavelmente diferem de espécie para espécie.

Ainda de acordo com a Figura 6, o pico proeminente encontrado por volta de 350 nm com vibração molecular estendendo-se até um pico em 450nm confirma a presença da óleo resina de *Stryx benzoin* (HOVANEISSIAN et al., 2008)

Conforme Modugno et al., (2006), a maior parte da oleoresina de Benjoim é composta por ácido benzoico, ácido cinâmico, ácido oleanóico e terpenos. De acordo com Pauletti et al., (2000), diversos compostos presentes na óleo resina do gênero *Styrax* apresentam atividade antibactericida e antifúngica, principalmente devido à presença de triterpenos e sesquiterpenos.

Portanto, a presença de monoterpenos, diterpenos e triterpenos justifica os resultados apresentados neste trabalho tendo em vista a ação bactericida identificada nas placas contendo as resinas de *C. myrrha*, *S. benzoin* e *B. papyrifera* em estado puro.

A Figura 7 apresenta os espectrogramas na região UV-visível para as amostras de resinas de *B. papyrifera* (resina P), *C. myrrha* (resina M) e *S. Benzoin* (resina B) dopadas com óxidos de titânio (TiO_2 e P25).

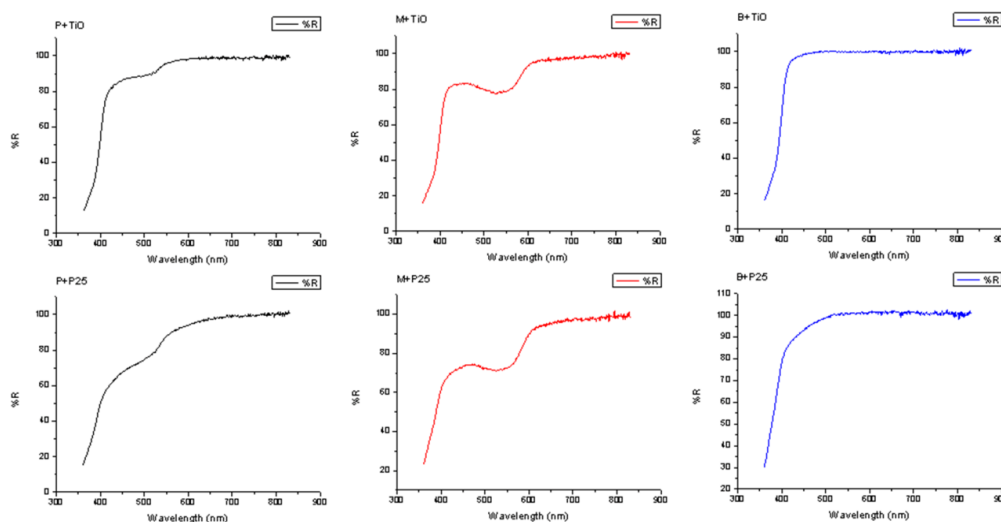


Figura 7 – Espectrograma U.V das amostras das resinas de *B. papyrifera*, *C. myrrha* e *S. benzoin* dopadas com óxidos de titânio (TiO_2 – P25)

Em relação aos resultados apresentados na Figura 7, conforme Mathew et al., (2012) o espectro com intensidade em comprimentos de onda > 350 nm é típico para o dióxido de titânio (TiO_2), e anatase + rútilo (P25), confirmando os resultados obtidos neste trabalho. A figura 10 apresenta os espectrogramas na região U.V-vis para amostras das resinas de *B. papyrifera* (resina P), *C. myrrha* (resina M), e *S. benzoin* (resina B) contendo óxido de molibdênio (MoO_3) e cobre (Cu_2O).

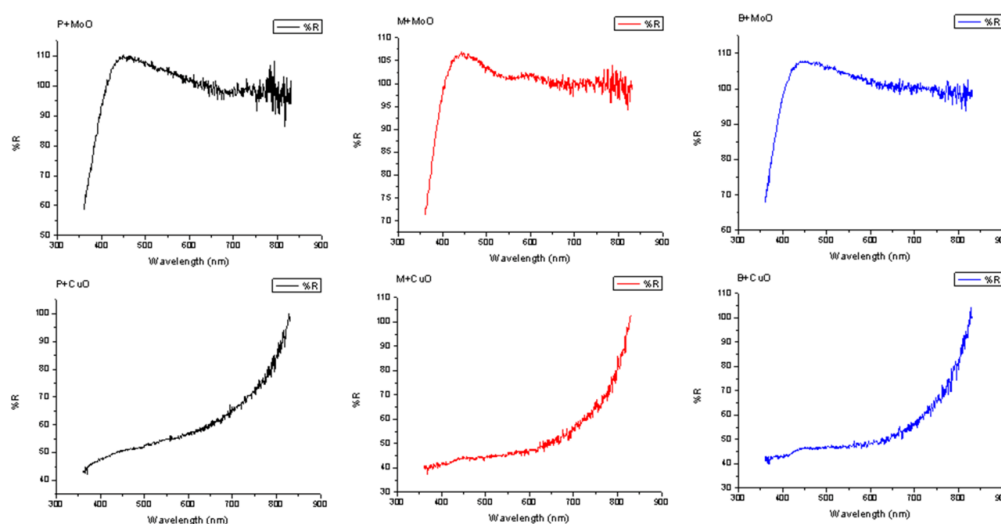


Figura 8 – Espectrograma U.V das amostras da resina de *B. papyrifera* (resina P), *C. myrrha* (resina M) e *S. benzoin* (resina B) contendo óxidos de molibdênio (MoO_3), e cobre (Cu_2O)

De acordo com a Figura 8, o espectro de UV-Vis com intensidade de comprimentos de onda (> 300 nm) para espécies típicas diametraais e/ou oligoméricos, confirma a identificação de MoO_3 (Thielemann et al., 2011). Na mesma figura, picos distintos são observados em torno de

~ 600 nm devido à formação de partículas de cobre (Cu_2O), o pico na intensidade de 800 nm confirma a presença do óxido de cobre I (Varughese et al., 2014).

A Figura 9 e a Figura 10 apresentam micrografias da estrutura superficial das resinas de *C. myrrha* contendo óxido de cobre e *B. papyrifera* contendo óxido de titânio, respectivamente.

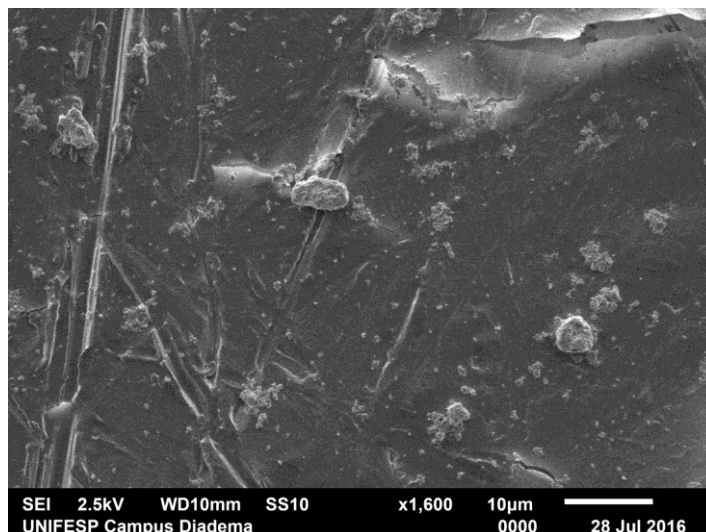


Figura 9 – Morfologia superficial da amostra resina *C. myrrha* dopada óxido de cobre I (Cu_2O)

De acordo com a Figura 9 pode-se perceber que a incorporação dos óxidos à matriz polimétrica da resina de *C. myrrha* não foi eficiente, o óxido de cobre I permaneceu heterogeneamente disperso sobre sua superfície. A Figura 10 mostra a deposição das partículas de óxido titânio (P25) sobre a superfície da resina de *B. papyrifera*, nesse caso a dispersão foi mais uniforme, porém da mesma forma o óxido permaneceu superficialmente agrupado na superfície do material. Pode se perceber também que esta resina apresenta elevada porosidade.

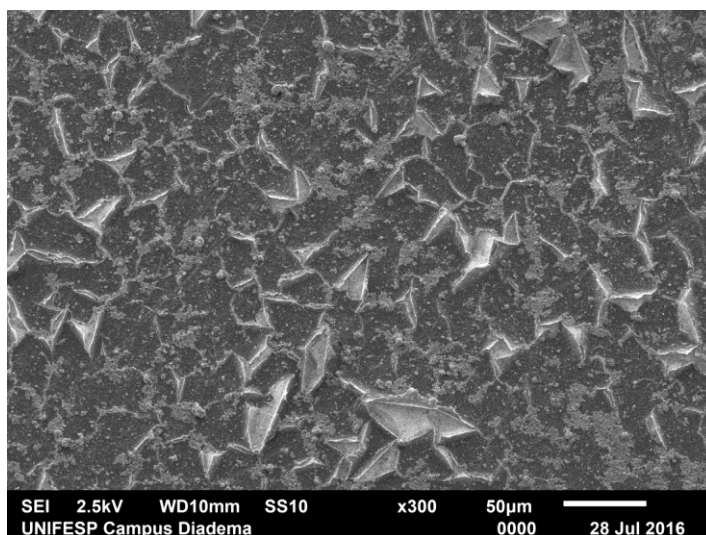


Figura 10 – Morfologia superficial da amostra resina *B. papyrifera* dopada com óxido de titânio (P25)

4. Conclusão

Na maioria dos casos analisados as resinas de *B. papyrifera*, *C. myrrha* e *S. benjoin* em estado puro como também contendo os óxidos de titânio (TiO_2 -P25), molibdênio (MoO_3), e cobre (Cu_2O) apresentaram atividade bacteriostática contra o microorganismo patógeno *E. coli*,

inibindo seu crescimento e formação de biofilme. A incorporação dos óxidos na matriz polimérica das resinas não apresentou homogeneidade, ficando desordenadamente dispersos sobre a sua superfície.

Referências

- ANDREWS, J.M. *Determination of minimum inhibitory concentrations*. J. Antimicrob. Chemother., 48(1):5-16, 2001.
- ANVARIAN, A.H.P.; SMITH, M.P.; OVERTON, T.W. *The effects of orange juice clarification on the physiology of Escherichia coli; growth-based and flow cytometric analysis*. International Journal of Food Microbiology, 219:38–43, 2016.
- BAHMANI, M.; SAKI, K.; SHAHSAVARI, S.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; SEPAHVAND, R. *Identification of medicinal plants effective in infectious diseases in Urmia, northwest of Iran*. Asian Pac. J. Trop. Biomed., 5(10):858–864, 2015.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. Am. J. Clin. Pathol., 45:493–496, 1966.
- BASER, K.H.C., DEMIRCI, B., DEKEBO, A., DAGNE, E. *Essential oils of some Boswellia ssp. myrrh and opopanax*. Flavour Fragrance J., 18:153–156, 2003.
- BEKANA, D.; KEBEDE, T.; ASSEFA, M.; HABTEMARIAN, K. *Comparative Phytochemical Analyses of Resins of Boswellia Species (B. papyrifera (Del.) Hochst., B. neglecta S. Moore, and B. rivae Engl.) from Northwestern, Southern, and Southeastern Ethiopia*. ISRN Analytical Chemistry, Vol. 2014, 9 pages, 2014.
- BONEV, B.; HOOPER, J.; PARISOT, J. *Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method*. J. Antimicrob. Chemother., 61(6):1295-301, 2008.
- BAJPAI, S.K.; & KUMARI, M.A. *Green approach to prepare silver nanoparticles loaded gum acacia/poly(acrylate) hydrogels*. International Journal of Biological Macromolecules, 80:177–188, 2015.
- CAETANO DA SILVA, S.D.; MENDES DE SOUZA, M.G.; OLIVEIRA CARDOSO, M.J.; et al. *Antibacterial activity of Pinus elliottii against anaerobic bacteria present in primary endodontic infections*. Anaerobe, 30:146-152, 2014.
- CANEVAROLO JÚNIOR, S.V. *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. Artliber Editora Ltda, São Paulo, 2003.
- CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. *SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan*. Revista Brasileira de Agrocomputação, 1(2):18-24, 2001.
- CARTER, M.Q.; LOUIE, J.W.; FENG, D.; ZHONG, W.; BRANDL, M.T. *Curli fimbriae are conditionally required in Escherichia coli O157:H7 for initial attachment and biofilm formation*. Food Microbiology, 57:81–89, 2016.
- CULLER, H.F. et al. *Atypical Enteropathogenic Escherichia coli Strains form Biofilm on Abiotic Surfaces Regardless of Their Adherence Pattern on Cultured Epithelial Cells*. BioMed Research International, v. 2014, 2014.
- DONG, C., ZHANG, X., CAI, H., CAO, C. *Facile and one-step synthesis of monodisperse silver nanoparticles using gum acacia in aqueous solution*. Journal of Molecular Liquids, 196:135–141, 2014.
- DONLAN, R.M. *Biofilms: microbial life on surfaces*. Emerging Infect. Dis., 8(9): 881–90, 2002.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clin. Microbiol. Rev., 15(2):167–93, 2002.
- FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J.; GRIEBE, T.; MAYER, C. *Physico-Chemical Properties of Biofilms*, in EVANS, L.V. *Biofilms: Recent Advances in their Study and Control*. CRC Press, p. 20, ISBN 978-9058230935, 2000.
- HARRIS, D.C. *Análise Química Quantitativa*. Editora LTC. 8 ed, 886 páginas, 2008.
- HOVANEISSIAN, M., ARCHIER, P., MATHE, C., CULIOLI, G. AND VIEILLES CAZES, C. *Analytical investigation of styrax and benzoin balsams by HPLC- PAD-fluorimetry and GC-MS*. Phytochem. Anal., 19: 301–310, 2008.

- KONG, H.; YANG, J.; ZHANG, Y.; FANG, Y.; NISHINARI, K.; PHILLIPS, G.O. *Synthesis and antioxidant properties of gum arabic-stabilized selenium nanoparticles*. International Journal of Biological Macromolecules, 65:155–162, 2014.
- KORA, A.J.; & RASTOGI, L. *Green synthesis of palladium nanoparticles using gum ghatti (Anogeissus latifolia) and its application as an antioxidant and catalyst*. Arabian Journal of Chemistry, Appl. Nanosci., 5:315–320, 2015.
- LANGENHEIM, J.H. *Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethno botany*. Timber Press, Portland, 2003.
- LI, Y-F.; GAN, W-P.; ZHOU, J.; LU, Z-Q.; YANG, C.; GE.; T-T. *Hydrothermal synthesis of silver nanoparticles in Arabic gum aqueous solutions*. Trans. Nonferrous Met. Soc. China, 25:2081–2086, 2015.
- MARONGIU, B., PIRAS, A., PORCEDDA, S., SCORCIAPINO, A. *Chemical composition of the essential oil and supercritical CO₂ extract of Commiphora myrrha (Nees) Engl. and of Acorus calamus L.* J. Agric. Food Chem., 53:7939–7943, 2005.
- MAYER G. *Rigid biological systems as models for synthetic composites*. Science, 310:1144-1147, 2005.
- MATHESON C.D.; MCCOLLUM, A.J. *Characterising native plant resins from Australian Aboriginal artefacts using ATR-FTIR and GC/MS*. Journal of Archaeological Science, 52:116-128, 2014.
- MATHEW, S.; KUMAR PRASAD, A.; BENOY, T. et al. *UV-Visible Photoluminescence of TiO₂Nanoparticles Prepared by Hydrothermal Method*. J. Fluoresc., 22:1563, 2012.
- MAROTZ, J.; LUBBERT, C.; EISENBEISS, W. *Effective object recognition for automated counting of colonies in Petri dishes (automated colony counting)*. Comput Methods Programs Biomed., 66:183–198, 2001.
- MASSOUD, A.M., EL EBIARY, F.H., ABOU-GAMRA, M.M., MOHAMED, G.F., SHAKER, S.M. *Evaluation of schistosomicidal activity of myrrh extract: parasitological and histological study*. J. Egypt. Soc. Parasitol., 34:1051–1076, 2004.
- MODUGNO, F.; RIBECHINI, E.; COLOMBINI, M.P. *Aromatic resin characterisation by gas chromatography–mass spectrometry Raw and archaeological materials*. Journal of Chromatography A, 1134:298–304, 2006.
- MOHAMED, A.A.; ALI, S.I.; EL-BAZ, F.K.; HEGAZY, A.K.; KORD, M.A. *Chemical composition of essential oil and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of Commiphora myrrha resin*. Industrial Crops and Products, 57:10–16, 2014.
- MUNCH E.; LAUNEY. M.E.; ALSEM. D.H.; SAIZ. E.; TOMSIA. A.P.; RITCHIE., R.O. *Tough, bioinspired hybrid materials*. Science, 322:1516-1520, 2008.
- NICHAT, N.; AHAMAD, T.; ALSHEHRI, S.M.; PARVEEN, S. *Synthesis, characterization, and biocide properties of semicarbazide–formaldehyde resin and its polymer metal complexes*. European Journal of Medicinal Chemistry 45:1287–1294, 2010.
- ÖZDEMİR, E.; ALPINAR, K. *An ethnobotanical survey of medicinal plants in western part of central Taurus Mountains: Aladaglar (Nigde – Turkey)*. Journal of Ethnopharmacology, 166:53–65, 2015.
- PAULETTI, P.M.; ARAÚJO, A.R.; YOUNG, M.C.M.; GIESBRECH, A.M.; BOLZANI, DA S.V. *nor-Lignans from the leaves of Styrax ferrugineus (Styracaceae) with antibacterial and antifungal activity*. Phytochemistry, 55:597–601, 2000.
- HANNEGUELLE, S. *An unusual acenaphthylene-type sesquiterpene hydrocarbon from Siam and Sumatra benzoin gum*. Phytochemistry Letters 2:216–219, 2009.
- POOJA, D.; PANYARAM, S.; KULHARI H.; RACHAMALLA, S.S.; SISTLA, R. *Xanthan gum stabilized gold nanoparticles: Characterization, biocompatibility, stability and cytotoxicity*. Carbohydrate Polymers, 110:1–9, 2014.
- PUTMAN, M.; BURTON, R.; NAHM, M.H. *Simplified method to automatically count bacterial colony forming unit*. J. Immunol. Methods, 302:99–102, 2005.
- REZWAN, K.; CHEN, Q.Z.; BLAKER, J.J.; BOCCACCINI, A.R. *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 27(18):3413–3431, 2006.

SARGIN, S.A.; AKÇICEK, E.; SELVI, S. *An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey.* Journal of Ethnopharmacology, 150:860–874, 2013.

SIMPSON, R.L.; NAZHAT, S.N.; BLAKER, J.J.; BISMARCK, A.; HILL, R.; BOCCACCINI, A.R.; HANSEN, U.N.; AMIS, A.A. *A comparative study of the effects of different bioactive fillers in PLGA matrix composites and their suitability as bone substitute materials: A thermo-mechanical and in vitro investigation.* Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 50:277–289, 2015.

SIEWERTS, S.; DE BOK, F.A.M.; MOLLS, E.; DE VOS, W.M.; VAN HYLCKAMA VLIEG, J.E.T. *A simple and fast method for determining colony forming units.* Letters in Applied Microbiology, 47(4):275–278, 2008.

SHIKOV, A.N.; POZHARITSKAYA, O.N.; MAKAROV, V.G.; WAGNER, H.; VERPOORTE, R.; HEINRICH, M. *Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications.* Journal of Ethnopharmacology, 154:481–536, 2014.

STAUDT, C.; HORN, H.; HEMPEL, D.C.; NEU, T.R. *Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms.* Biotechnol. Bioeng., 88(5): 585–92, 2004.

SHEN, T., LI, G.-H., WANG, X.-N., LOU, H.-X. *The genus Commiphora: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology.* J. Ethnopharmacol., 142:319–330, 2012.

STOODLEY, P. et al. *Biofilms as complex differentiated communities.* Annual Reviews in Microbiology, 56:1:187–209, 2002.

SULTANA, S.; ASIF, H.M.; AKHTAR, N.; AHMAD, K. *Medicinal plants with potential antipyretic activity: A review.* Asian Pac. J. Trop. Dis., 5(1):202–208, 2015.

SU, S.; WANG, T.; DUAN, J.-A.; ZHOU, W.; HUA, Y.-Q.; TANG, Y.-P.; YU, L.; QIAN, D.-W. *Anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts of Commiphora myrrha.* Journal of Ethnopharmacology, 134:251–258, 2011.

SURESH & MODY. *Microbial Exopolysaccharides: Variety and Potential Applications.* Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-36-3, 2009.

TIPTON, D.A.; LYLEA, B.; BABICHB, H.; DABBOUSA, M.KH. *In vitro cytotoxic and anti-inflammatory effects of myrrh oil on human gingival fibroblasts and epithelial cells.* Toxicol. In Vitro, 17:301–310, 2003.

THIELEMAN, J.P.; RESSLER, T.; WALTER, A.; TZOLOVA-MULLER, G.; HESS, C. *Structure of molybdenum oxide supported on silica SBA-15 studied by Raman, UV–Vis and X-ray absorption spectroscopy.* Applied Catalysis A: General, 399:28–34, 2011.

ULLRICH, M. *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends.* Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-45-5, 2009.

VARUGUESE, G.; RINI, V.; SURAJ, S.P.; USHA, K.T. *Characterization and optical studies of copper oxide nanostructures doped with lanthanum ions.* Advances in materials science, 14(42):49–60, 2014.

VELMURUGAN, P.; SHIM, J.; KIM, K.; BYUNG-TAEK, O. *Prunus × yedoensis tree gum mediated synthesis of platinum nanoparticles with antifungal activity against phytopathogens.* Materials Letters, 174:61–65, 2016.

VENKATESHAM, M.; AYODHYA, D.; MADHUSUDHAN, A.; KUMARI, A.S.; VEERABHADRAM, G.; MANGATAYARU, K.G. *A Novel Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Gum Karaya: Characterization, Antimicrobial and Catalytic Activity Studies.* Journal of Cluster Science, 25(2):409–422, 2014.

WANG, M. *Developing bioactive composite materials for tissue replacement.* Biomaterials, 24(13):2133–2151, 2003.

WELMAN, A.D. *Exploitation of Exopolysaccharides from lactic acid bacteria.* Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-45-5, 2009.

YUAN J.; MÜLLER A.H.E. *One-dimensional organic–inorganic hybrid nanomaterials.* Polymer, 51:4015–4036, 2010.

ZIMA, T.; BAKLANOVA, N.; BATAEV, I. *Synthesis and characterization of hybrid nanostructures produced in the presence of the titanium dioxide and bioactive organic substances by hydrothermal method.* Journal of Solid State Chemistry, 198:131–137, 2013.