



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO
MOLECULAR - PPBM



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
MODIFICADORA DA AÇÃO ANTIBIÓTICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Baccharis coridifolia* DC. E *Baccharis
reticulata* (Ruiz & Pav.) E DO COMPOSTO α -PINENO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PRISCILLA RAMOS FREITAS

CRATO – CE

2020

PRISCILLA RAMOS FREITAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODIFICADORA DA AÇÃO
ANTIBIÓTICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Baccharis coridifolia* DC. E *Baccharis
reticulata* (Ruiz & Pav.) E DO COMPOSTO α -PINENO**

Dissertação apresentada à Universidade
Regional do Cariri, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Bioprospecção Molecular, área de
concentração em Bioprospecção Molecular
para a obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Orientador

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino

Coorientador

CRATO - CE

2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri – URCA
Bibliotecária: Ana Paula Saraiva de Sousa CRB: 3/1000

Freitas, Priscilla Ramos.

F862a Avaliação da atividade antibacteriana e modificadora da ação antibiótica dos óleos essenciais de *Baccharis coridifolia* DC. e *Baccharis reticulata* (Ruiz & Pav.) e do composto α -pineno/ Priscilla Ramos Freitas. – Crato-CE, 2020.

62p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA
Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Coorientador: Prof. Dr. Saulo Relison Tintino

1. *Baccharis*, 2. Óleos essenciais, 3. Antimicrobiano, 4. Sinergismo; I. Título.

CDD: 615.32

PRISCILLA RAMOS FREITAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODIFICADORA DA AÇÃO
ANTIBIÓTICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Baccharis coridifolia* DC. E *Baccharis
reticulata* (Ruiz & Pav.) E DO COMPOSTO α -PINENO**

Dissertação apresentada à Universidade Regional do Cariri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, área de concentração em Bioprospecção Molecular, para a obtenção do título de Mestre

Aprovada em: ____/____/____

Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga - URCA
(Avaliadora interna)

Prof. Dr. Jaime Ribeiro Filho - Fiocruz
(Avaliador externo)

Prof. Dra. Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues - URCA
(Suplente interna)

Profa. Dra. Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro - UFCA
(Suplente externa)

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho – URCA
(Orientador)

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino – URCA
(Coorientador)

CRATO - CE
2020

Dedico este trabalho a Deus, a minha família, aos meus amigos que me acompanharam durante esse período, sempre me auxiliando e apoiando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser essencial na minha vida, de todas as formas, e por me fazer capaz de concluir mais uma etapa da minha vida.

A minha família, especialmente aos meus pais, Holandir e Valmir, e a minha irmã, Patrícia, que me apoiaram na decisão de realizar este mestrado, como sempre me apoiam em muitos aspectos da minha vida. Um agradecimento especial, por me fazer sempre admirá-los, principalmente em relação às lutas diárias, que mesmo com todas as batalhas do dia-a-dia manter esta família unida, por isso agradeço e dedico esse trabalho, sendo de vocês também essa vitória.

Ao meu namorado, Italo Alexandre, por sempre estar comigo em todos os momentos, sendo estes tristes ou alegres, por sempre me mostrar uma solução para qualquer obstáculo. Obrigada por ser esse amigo que sempre me ajuda e me aconselha, por isso agradeço e dedico esse trabalho.

A minha amiga Carol Justino, por estar presente em todas as etapas deste mestrado, desde a luta para a seleção até o auxílio para a realização desta dissertação. Obrigada, por me proporcionar ótimos momentos durante esse período, como conselheira, como irmã, como amiga.

A Maria Luiza, pela sua ajuda a ingressar neste mestrado, em que mesmo depois de todo esse período que passou, não poderia esquecer-se do seu auxílio.

Aos meus amigos que me auxiliaram na realização dos testes, em especial a Cristina Rodrigues, Débora Muniz, José Neto, Maria Milene e Janaína Esmeraldo.

A todos os meus amigos que o LMBM me proporcionou, que diariamente presentes como uma família científica, em que cada um ajudou de uma forma diferente e especial.

Ao meu coorientador Saulo Relison, que com toda paciência compartilhou seus conhecimentos para a realização não só desse, mas de muitos estudos feitos durante esse período, e pela disponibilidade que sempre teve para auxiliar os seus alunos.

Ao meu orientador Henrique Douglas, pela dedicação aos seus alunos e orientandos, com a finalidade de transmitir muitos conhecimentos tanto na área acadêmica e profissional.

As instituições de fomento CAPES, Funcap e CnPq, pela ajuda financeira para a realização deste trabalho.

E a todos que passaram por minha vida e me auxiliaram indiretamente nesse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 BIODIVERSIDADE E UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS	4
2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS	5
2.3 GÊNERO <i>Baccharis</i>	6
2.4 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E MECANISMO DE RESISTÊNCIA	9
2.4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.4.2. <i>Escherichia coli</i>	10
2.4.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
3 PROCEDIMENTOS E RESULTADOS	15
Capítulo 1 - GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of <i>Baccharis reticulata</i> (Ruiz & Pav.) Pers. and α-pinene	15
1. INTRODUCTION	16
2. MATERIALS AND METHODS	17
2.1 Plant material	17
2.2 Extraction and determination of the chemical composition of essential oil and bacterial preparation	18
2.3 Preparation of the essential oil solution and antibiotics	18
2. 4. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration and Evaluation of the antibiotic-modulating activity	19
2. 5. Statistical analysis	19
3. RESULTS AND DISCUSSION	19
4. CONCLUSION	23

REFERENCES	23
Capítulo 2 Antibacterial and antibiotic-modulating activities of the essential oil obtained from the leaves of <i>Baccharis coridifolia</i> DC against MDR strains	29
1. INTRODUCTION	30
2. MATERIALS AND METHODS	31
2.1 Plant material	31
2.2 Extraction and chemical analysis of <i>Baccharis coridifolia</i> essential oil	31
2.3 Bacterial strains	32
2.4 Essential oil preparation	32
2.5 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	32
2.6 Evaluation of the antibiotic-modulating activity	33
2.7 Statistical analysis	33
3. RESULTS	33
4. DISCUSSION	36
5. CONCLUSION	37
REFERENCES	39
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIA GERAL	43

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 : Folhas da espécie <i>Baccharis coridifolia</i>	8
Figura 2 : Folhas da espécie <i>Baccharis coridifolia</i>	8
Capítulo 1 - GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of <i>Baccharis reticulata</i> (RUiz & Pav.) Pers. and α-pinene	
Figure 1 : Molecular structures of major components of EOBr	19
Figure 2 : The antibiotic-modulating activity of <i>B. reticulata</i> oil in association with norfloxacin, gentamicin, and penicillin against multiresistant strains of <i>E.coli</i> 06, <i>S. aureus</i> 10 and <i>P. aeruginosa</i> 24 **** p<0.0001	21
Figure 3 : The antibiotic-modulating activity of alpha-pinene in association with norfloxacin, gentamicin, and penicillin against multiresistant strains of <i>E.coli</i> 06, <i>S. aureus</i> 10 and <i>P. aeruginosa</i> 24. **** p<0.0001.....	22
Capítulo 2 Antibacterial and antibiotic-modulating activities of the essential oil obtained from the leaves of <i>Baccharis coridifolia</i> DC against MDR strains	
Figure 1 : GC-MS chromatogram of the essential oil of <i>Baccharis coridifolia</i>	34
Figure 2 : Antibiotic-modulating activity of <i>B. coridifolia</i> essential oil in combination with antibiotics against multiresistant strains of <i>E. coli</i> 06, <i>P. aeruginosa</i> 24 and <i>S. aureus</i> 10.	36

LISTAS DE TABELAS

Capítulo 1 - GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (Ruiz & Pav.) Pers. and α -pinene

Table 1: Origin and antibiotic resistance profile of the strains..... 18

Table 2: Relative composition of the EOBr20

Table 3: Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of the EOBr against bacterial strains .20

Capítulo 2 Antibacterial and antibiotic-modulating activities of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against MDR strains

Table 1: Relative composition (%) of *Baccharis coridifolia* Essential Oil..... 34

Table 2: Minimum Inhibitory Concentration Against Multiresistant Strains by Essencial Oil of *Baccharis coridifolia* 35

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Breat Heart Infusion</i>
CCCP	<i>Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl-hydrazone</i>
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplado à Espectrometria de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC	<i>Escherichia coli</i>
HIA	<i>Heart Infusion Agar</i>
MDR	<i>Multiple drug resistance</i>
MIC	<i>Minimum Inibitory Concentration</i>
MRSA	<i>Methicillin resistant Staphylococcus aureus</i>
OEBc	Óleo Essencial de <i>Baccharis coridifolia</i>
OEBr	Óleo Essencial de <i>Baccharis reticulata</i>
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SA	<i>Staphyococcus aureus</i>

RESUMO

A utilização de plantas com finalidade terapêutica é considerada uma prática antiga. As plantas medicinais possuem atividade farmacológica devido à presença de metabólitos secundários. As plantas do gênero *Baccharis* são amplamente distribuídas em escala mundial e utilizadas principalmente por sua atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e modificadora da ação de antibióticos dos óleos essenciais das folhas de *Baccharis coridifolia* e *Baccharis reticulata*, como também do composto α -pineno. O material vegetal foi obtido a partir de ramos terminais e inflorescentes de plantas coletadas no Paraná, Sul do Brasil. Para a análise química dos óleos essenciais das plantas foi utilizado o método de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM), e posteriormente realizados os testes de microdiluição para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e de modificação da atividade antibacteriana dos antibióticos norfloxacino, gentamicina e penicilina frente as cepas de *Staphylococcus aureus* 10 (SA 10), *Escherichia coli* 06 (EC 06) e *Pseudomonas aeruginosa* 24 (PA 24). A partir da identificação dos componentes químicos, foi possível observar a presença dos compostos majoritários de cada espécie, que na análise do óleo essencial de *Baccharis coridifolia* (OEBc) foram os compostos germacreno D (23,7%), biciclogermacreno (17,1%) e E-cariofileno (8,4%); na análise química do óleo essencial de *Baccharis reticulata* (OEBr) foram os compostos dilapiol (33,8%), α -pineno (31,7%) e β -pineno (9,4%). Após a realização da CIM foi observado a atividade antibacteriana do OEBc contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* 24 (128 $\mu\text{g/ mL}$) e *Staphylococcus aureus* 10 (512 $\mu\text{g/ mL}$), enquanto o OEBr apresentou ação apenas frente a cepas *Staphylococcus aureus* 10 (256 $\mu\text{g/ mL}$). O teste de atividade antibacteriana também foi realizado com um dos componentes majoritários do OEBr e também presente no OEBc, α -pineno, em que o composto isolado não apresentou atividade antibacteriana, quando realizado a CIM frente as cepas multirresistentes testadas, com valor $\geq 1024 \mu\text{g/ mL}$. Em relação à modificação da atividade antibiótica, foi possível observar sinergismo do OEBr com o antibiótico norfloxacina e gentamicina frente a todas as cepas testadas. Quanto a atividade do OEBc, observou-se sinergismo quando associado ao antibiótico norfloxacino frente as cepas multirresistentes, e também redução da CIM da gentamicina frente as cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Por fim, foi observada atividade modificadora do α -pineno, em que este apresentou ação sinérgica quando associado ao norfloxacino e gentamicina, contra a cepa de *S. aureus*. Dessa forma, os óleos essenciais das espécies analisadas no presente estudo, como também o seu composto majoritário quando associados a antibióticos possuíram atividade contra cepas multirresistente, sendo necessária a realização de mais pesquisas para comprovar atividade dos produtos testados.

Palavras-Chave: *Baccharis*. Óleos essenciais. Antimicrobiano. Sinergismo.

ABSTRACT

The use of plants for therapeutic purposes is considered a once practice. Medicinal plants present pharmacological activity due to the presence of secondary metabolites. Plants of the genus *Baccharis* are widely distributed worldwide and used mainly due to their antimicrobial and anti-inflammatory activity. The present study aimed to observe the antibacterial and modifying activity of antibiotics in the essential oils of the leaves of *Baccharis coridifolia* and *Baccharis reticulata*, and the compound α -pinene. The plant material was obtained from terminal and inflorescent branches of plants collected in Paraná, Southern Brazil. For the chemical analysis of the essential oils of the plants, it was used a Gas Chromatography associated with Mass Spectrometry method (GC / MS), and then the microdilution tests were carried out to assess the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) as well as to evaluate the ability of the essential oils to modify the antibacterial activity of antibiotics norfloxacin, gentamicin and penicillin against the strains of *Staphylococcus aureus* 10 (SA 10), *Escherichia coli* 06 (EC 06) and *Pseudomonas aeruginosa* 24 (PA 24). From the identification of the chemical components, it was possible to observe the presence of the major compounds of each species, which in the analysis of the essential oil of *Baccharis coridifolia* (OEBc) were the compounds germacrene D (23.7%), bicyclogermacrene (17.1%) and E-caryophyllene (8.4%); in the chemical analysis of the essential oil of *Baccharis reticulata* (OEBr) were the compounds dilapiol (33.8%), α -pinene (31.7%) and β -pinene (9.4%). After the MIC was performed, the antibacterial activity of OEBc against strains of *Pseudomonas aeruginosa* 24 (128 μ g / mL) and *Staphylococcus aureus* 10 (512 μ g / mL) was observed, while OEBr showed action only against *Staphylococcus aureus* 10 (256 μ g) / mL). The antibacterial activity test was also performed with one of the major components of the OEBr, too present in the OEBc, α -pinene, in which the isolated compound did not show antibacterial activity, when the MIC was performed against the tested multiresistant strains, with a value ≥ 1024 μ g / mL. About the modification of antibiotic activity, it was possible to observe synergism of OEBr with the antibiotic norfloxacin and gentamicin in relation to all tested strains. As for OEBc activity, synergism was observed when associated with the norfloxacin antibiotic against multidrug-resistant strains, and also a reduction in gentamicin MIC against strains of *S. aureus* and *E. coli*. Finally, antibiotic-modifying activity of α -pinene was observed, as it showed synergistic action when associated with norfloxacin and gentamicin, against the *S. aureus* strain. Thus, the essential oils of the species analyzed in the present study, as well as their major compound when associated with antibiotics, had activity against multidrug-resistant strains, requiring further research to prove the activity of the tested products.

Keywords: *Baccharis*. *Baccharis*. Essential Oils. Antimicrobial. Synergism.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com finalidade terapêutica é uma prática antiga que tem sido usada como base para o desenvolvimento de pesquisas científicas, principalmente nas áreas etnobotânicas e etnofarmacológicas, fator este que torna a fitoterapia importante para a descoberta de novos compostos bioativos derivados de produtos naturais (REMPEL *et al.*,2019).

Os compostos bioativos presentes nas plantas, denominados de metabólitos secundários, proporcionam as atividades farmacológicas de cada espécie, tanto de forma isolada ou suas associações. Sendo que estes metabólitos podem estar presentes no extrato ou no óleo essencial, materiais obtidos e habitualmente usados na prática fitoterápica (SHER,2009; SHITAN,2016).

Em relação a forma do material, os óleos essenciais são substâncias voláteis, que possuem composição química complexa, com presença de uma variedade de terpenos, e possuem papel fundamental na sobrevivência dos vegetais nos quais estão presentes, podendo apresentar atividade contra micro-organismos (MANION; WIDDER,2017). Essa possível atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem feito com que uma grande variedade de vegetais seja alvo de pesquisas científicas, de modo que estes podem ser utilizados conjuntamente a antibióticos comerciais, uma vez que os vegetais proporcionam inibição direta de crescimento ou o aumento do efeito gerado pelo fármaco (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA,2017; ONOFRE; CANTON; PIRES,2013).

Nesse contexto, Asteraceae é uma família que apresenta grande quantidade de gêneros e espécies, sendo considerada uma das mais numerosas do grupo das angiospermas (PEGORINI; MARANHO; ROCHA,2008). As espécies desta família se destacam por possuírem compostos químicos que auxiliam diretamente na sua atividade farmacológica, tendo grande importância na medicina, no tratamento e na prevenção de doenças (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI,2005).

Dentre as plantas da família Asteraceae, destaca-se o gênero *Baccharis*, cujas espécies são encontradas em várias regiões do mundo, com ampla distribuição no território brasileiro (AGOSTINI *et al.*,2005). Muitas espécies deste gênero são amplamente utilizadas na medicina atual como analgésicos, possuindo atuação no tratamento de úlceras, diabetes, doenças gastrointestinais e infecções causadas por bactérias e fungos (ABAD; BERMEJO,2007). Sua utilização farmacológica pode ser explicada principalmente pelos

constituintes químicos presentes, sendo os principais pertencentes ao grupo dos terpenos (ONOFRE; CANTON; PIRES,2013).

Dentre estas espécies, destacam-se *Baccharis reticulata* e *Baccharis coridifolia*. *Baccharis reticulata* é caracterizada como um arbusto com média de 0,4 a 1,5 metros de altura e fortemente ramificado (MÜLLER,2014). *Baccharis coridifolia*, popularmente conhecida no Brasil por mio-mio, e como romerillo nos demais países, é caracterizada como um subarbusto (BARÃO,2016). *Baccharis coridifolia* possui utilização farmacológica demonstrada por meio do seu uso externo para casos de processos inflamatórios, e o vapor das suas folhas, quando misturado com enxofre, é utilizado para o tratamento de doenças, como a cinomose em animais (ABAD; BERMEJO,2007).

A busca pela atividade antimicrobiana de plantas tem sido motivada pelo aumento no número de infecções bacterianas e também pelo crescente desenvolvimento de bactérias resistentes a múltiplas drogas (SILVA; FERNANDES JÚNIOR,2010). Deste modo, o crescimento progressivo de bactérias multirresistentes pode ser desencadeado por fatores como o uso indiscriminado de antibióticos, decorrente da pressão seletiva do ambiente, como também por meio de outros mecanismos, como a modificação enzimática e a alteração da permeabilidade celular e das moléculas alvo dos antibióticos (LOUREIRO *et al.*,2016).

Dentre as espécies bacterianas de importância clínica, *Pseudomonas aeruginosa* é uma das principais causas de infecções hospitalares. Seu mecanismo de resistência está relacionado principalmente à produção de beta-lactamases, mutação das porinas e alteração da permeabilidade de membrana (ÁLVAREZ *et al.*,2005). Este último mecanismo também é um dos principais responsáveis pela resistência de bactérias da família Enterobactérias, como no caso da espécie *Escherichia coli*, responsável principalmente pelos casos de infecções oportunistas que, além desta forma de resistência, apresentam mecanismos como a inativação enzimática e as alterações do sítio de ligação (MOSQUITO *et al.*,2011).

Outra espécie de bactéria que apresenta grande importância clínica, considerando seus elevados números de infecções, é a espécie *Staphylococcus aureus*, que também é considerada patógeno oportunista, e seu processo infeccioso está relacionado a quadros de infecções de pele, que em casos mais graves podem resultar em endocardites e bacteremia. A resistência desta espécie se dá principalmente através da produção de beta-lactamases, alteração de genes e modificação da parede celular (MENDES *et al.*,2017; PÉREZ-CANO; ROBLES-CONTRERAS,2013).

Portanto, a busca por novos agentes antibacterianos é necessária para que possa fornecer alternativas contra cepas multirresistentes, sendo uma possível forma terapêutica a descoberta de novas substâncias a partir de produtos naturais, que atualmente têm demonstrado resultados promissores contra esses micro-organismos. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar atividade antibacteriana e modificadora da ação de antibióticos dos óleos essenciais de *B. coridifolia* e *B. reticulata*, e do componente químico α -pineno frente a cepas de bactérias multirresistentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIODIVERSIDADE E UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS

O Brasil apresenta uma biodiversidade bastante privilegiada comparada aos demais países, caracterizada por uma variedade de espécies e grande riqueza de flora que se distribui em sete biomas principais. Também é visto que o país apresenta a segunda maior quantidade de espécies endêmicas, e a maior quantidade em números relativos, considerando as espécies atualmente catalogadas no mundo (BOLZANI,2016; PIMENTEL *et al.*,2015).

A diversidade biológica presente no mundo é o fator que contribui como suporte para a vida, fornecendo benefícios que são necessários para o seu desenvolvimento. As interações provenientes da importância que a biodiversidade dispõe, sofreram modificações ao longo do tempo o que pode ser evidenciado em relação à utilização atual destes recursos, que ocorre através do seu uso na alimentação, medicina, ciência e tecnologia (ELIAS; SANTOS; CITADINI-ZANETTE,2017; LAGOA; RODRIGUES,2016).

Ainda no que se refere à utilização de produtos naturais, a bioprospecção é um termo utilizado para definir a procura por compostos provenientes de micro-organismos, vegetais ou animais que possam ter utilidade para a humanidade. Além disso, esta busca por novos compostos pode ser realizado por diferentes abordagens, podendo ser estas, etnofarmacológicas, quimiossistemáticas, entre outras (ASTOLFI FILHO; SILVA; BIGI,2015).

A etnofarmacologia é a ciência que por sua vez utiliza métodos variáveis, principalmente para busca de produtos naturais com finalidade terapêutica, considerando que se trata de uma abordagem que proporciona a seleção das espécies a partir de um conhecimento popular e a sua forma de utilizar empiricamente (ALBUQUERQUE; HANAZAKI,2006). Nesse aspecto, o conhecimento tradicional sobre o modo e a finalidade da utilização das plantas medicianais, auxilia diretamente na busca pela criação de novos fármacos, considerando que já é conhecida a atividade biológica sobre a qual o produto natural pode ter ação (BRITO; POZZETTI,2018).

A utilização de produtos naturais com finalidade terapêutica apresenta benefícios, importantes por sua facilidade e disponibilidade, bem como ao seu baixo risco de efeitos colaterais e toxicidade, e o baixo custo, quando comparado aos medicamentos habitualmente utilizados na clínica (ROCHA; PEIXOTO; SANTOS,2019).

Em resumo, a criação de novas drogas provenientes de plantas e seus compostos tem se tornado importante, o que pode ser explicado pela biodiversidade presente no país, aliada ao conhecimento popular sobre a utilização de plantas medicinais (FUNARI; FERRO,2005). Dessa forma, mesmo com a diversidade genética vegetal existente no Brasil e a utilização empírica por parte da população, ainda existem muitos compostos bioativos que não foram estudados, assim proporcionando uma grande diversidade para novas abordagens farmacológicas (BADKE *et al.*,2011).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

O aumento na utilização derivados provenientes de plantas, tem se tornado uma prática comum, o que permite o uso de produtos como os óleos essenciais para diversas finalidades. Tais produtos são utilizados de diferentes formas, sendo aplicados em indústrias de perfumaria, alimentos, bebidas e também utilizados por apresentarem como uma possível ação antibacteriana (ANDRADE *et al.*,2012; FONSECA *et al.*,2015).

Os óleos essenciais são caracterizados como metabólitos secundários e provenientes de várias partes das plantas, como o caule, folhas, raízes. A composição destes produtos possui variações para cada óleo, visto que os componentes se alteram de acordo com as características da espécie, como também de acordo com a parte da planta da qual foi extraído o material (HÜSNÜ; BAŞER; DEMIRCI,2007; POMBO *et al.*,2018).

De acordo com Franco e colaboradores (2007), as possíveis causas para a variação da quantidade e do tipo destes compostos se dá através de fatores genéticos, e também pode ser decorrente de fatores ambientais, como o solo, clima, forma de plantio, coleta, entre outros. Ainda assim, na composição dos óleos essenciais é possível evidenciar a presença de compostos terpenóides, que na sua maioria apresentam monoterpenos e sesquiterpenos (FIGUEIREDO; PEDRO; BARROSO,2017).

A análise química dos óleos essenciais é necessária para composição e quantificação dos seus constituintes, visto que estes auxiliam diretamente na sua atividade e utilização. Para a determinação dos compostos químicos provenientes dos óleos essenciais, é possível destacar o método da Comatografia Gasosa como um dos principais para a análise qualitativa destes componentes (PEREIRA *et al.*,2008).

Entre os fatores que influenciam na alteração da composição química dos óleos essenciais, a coleta deste produto torna-se um fator crítico, visto que o estágio de desenvolvimento da planta pode modificar os metabólitos secundários provenientes da espécie. Além da composição química, fatores como o rendimento também pode ser influenciado, e em consequência a estas alterações, a atividade farmacológica dos óleos essenciais (LIMA *et al.*,2017; RIBEIRO; BONILLA; LUCENA,2018).

Em relação a sua atividade, os óleos essenciais possuem ação comprovada contra bactérias, sendo normalmente Gram-positivas mais susceptíveis a esta ação. Para casos de infecções estes produtos são utilizados na maioria das vezes, na medicina popular, por meio da aplicação tópica, podendo também ser utilizada por nebulização, devido a sua volatilidade. (MIRANDA *et al.*,2016; OKOH; SADIMENKO; AFOLAYAN,2010).

2.3 GÊNERO *Baccharis*

A família Asteraceae é amplamente distribuída em todo o mundo possuindo cerca de 23.600 espécies, divididas em 205 gêneros, sendo representada como arbustos de pequeno porte, plantas herbáceas, em que raramente se apresentam como árvores. As plantas desta família são consideradas fontes de proteínas, óleos essenciais e vitaminas e a sua composição química apresenta elevada concentração de sesquiterpenos, compostos que contribuem para uma ampla variedade de atividades biológicas (ABAD; BERMEJO,2007; BADER *et al.*,2019; GÜNEŞ *et al.*,2019).

Dentre os gêneros da família Asteraceae, *Baccharis* compreende, aproximadamente, 500 espécies amplamente distribuídas nos continentes da América do Norte e do Sul, ocupando principalmente países como Argentina, Chile, México, Paraguai e Uruguai. No Brasil é possível encontrar, em média, 167 espécies, conhecidas popularmente por carqueja, e presentes na flora de todo o país, destacando sua presença nas regiões sul e sudeste, principalmente no estado do Paraná (CAMPOS *et al.*,2016; HEIDEN; LEONI; NAKAJIMA,2014; LONNI *et al.*,2003; PAROUL *et al.*,2016).

As plantas do gênero *Baccharis* são ricas na produção de óleos essenciais, em que nestes são identificados diferentes constituintes químicos, representados principalmente por sesquiterpenos e monoterpenos. Ainda sobre estes compostos, estudos realizados com estas plantas evidenciam a presença de germacreno D, α -cadinol, β -pineno, espatulenol, entre outros,

considerando que a atividade dos óleos derivados destas plantas pode estar relacionada a presença destes constituintes (ABAD; BERMEJO,2007; BOGO *et al.*,2016; DEMO *et al.*,2005).

Entre essas atividades, as plantas do gênero *Baccharis* possuem atividade biológica relacionada a ação fungicida, antibacteriana, contra úlceras e até mesmo com potencial inseticida. Estudos também mostram sua atividade relacionada a um possível efeito antioxidante e vasodilatador, em que podem estar relacionados a presença de compostos diterpenoides na composição química de muitas espécies deste gênero. Além destas atividades também foram observadas atividades relacionadas aum potencial gastroprotetor, principalmente pela espécie *B. trimera* (CHAABAN *et al.*,2018; MARTINEZ-CORREA *et al.*,2012; VEIGA *et al.*,2017; VELÁZQUEZ *et al.*,2019) .

A partir da variedade de constituintes químicos na composição dessas espécies, bem como pela sua atividade biológica resultante da presença destes compostos, muitas plantas do gênero *Baccharis* são utilizadas para o tratamento de doenças gastrointestinais, de processos anti-inflamatórios, como agentes antirreumáticos, entre outras formas de terapias. Na medicina popular ocorre sua preparação, principalmente, por meio de chás a partir de folhas das plantas (LORENZI; MATOS,2002; TAPIA *et al.*,2004).

Além das propriedades terapêuticas, outros métodos de utilidades das plantas deste gênero tornam um fator importante para a economia, considerando que a população também fazem o uso ornamental de algumas espécies, bem como a utilização na indústria alimentícia, de cosméticos, entre outros (DE OLIVEIRA-LIMA *et al.*,2019; TOGNON; CUQUEL,2016; YOKO SUZUKI *et al.*,2017).

Entre as espécies deste gênero, *Baccharis coridifolia*, demonstrada na figura 1, é um arbusto, popularmente conhecido como mio-mio ou romerillo, com média de 20 a 80 cm de altura. Trata-se de uma planta cuja distribuição geográfica é bastante ampla na região Sul do Brasil, e presente em outros países da América do Sul, entre estes Uruguai e Argentina. Em relação a sua atividade, de acordo com estudos da espécie, esta planta pode causar toxicidade em alguns animais, como gado, ovelhas e cavalos, o que pode ocorrer pela presença de toxinas produzidas por fungos presentes no solo e armazenadas pela planta. Por outro lado, algumas partes desta espécie são utilizadas como agente hepatoprotetor, e por ter atividade anti-inflamatória (HAMMERSCHMITT *et al.*,2018; HUNZIKER; WULFF; ESCOBAR,2002; MONGELLI *et al.*,1997).

Figura 1 – Partes aéreas da espécie *Baccharis coridifolia*



Fonte: ONOFRE;CANTON; PIRES, 2013

Em relação a espécie *B. reticulata*, demonstrada na figura 2, trata-se de arbusto de até 2 metros de altura, em que há a presença de flores pistiladas. Apresenta uma ampla distribuição nos países da América do Sul, que ocorre principalmente nas regiões sul do Equador, do Peru e do Brasil, em que o seu cultivo e crescimento da planta ocorre geralmente em locais de pastagens (MÜLLER,2014; TELES,2015).

Figura 2 – Partes aéreas da espécie *Baccharis coridifolia*



Fonte: W. do Amaral, 2012

2.4 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E MECANISMO DE RESISTÊNCIA

2.4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é caracterizada como um bacilo Gram-negativo, não fermentador de glicose, encontrado em solos, ambientes marinhos e também presente em vegetais e animais. Trata-se de uma bactéria móvel, com um ou mais flagelos, sendo considerado um dos principais patógenos oportunistas em decorrência dos mecanismos de resistência, bem como a sua capacidade de inibir outras espécies bacterianas (ROSANOVA *et al.*,2019; STOVER *et al.*,2000).

Entre as principais patologias causadas pela espécie podem ser destacadas infecções em casos de queimaduras, pacientes imunocomprometidos e portadores de doenças fibrocísticas. Em geral acomete principalmente pacientes hospitalizados, podendo gerar quadros de bacteremia, infecção urinária, de pele, entre outros tipos de infecção (ANDUEZA LEAL *et al.*,2015; DE SOUZA *et al.*,2019).

Em relação aos mecanismos de resistência desenvolvidos nas cepas de *P. aeruginosa* podem acontecer pela diminuição da permeabilidade dos antibióticos através da alteração da parede externa e modificação da membrana celular, por mecanismo de bomba de efluxo, e também por meio da presença de beta-lactamases (VOOR *et al.*,2014).

A resistência gerada pela diminuição da permeabilidade acontece por meio da modificação de porinas, visto que estes canais proteicos presentes na membrana bacteriana permitem a penetração de compostos. Desta forma, a alteração das porinas, bem como sua ausência, permite a resistência a um elevado número de antibióticos (BALIBAR; GRABOWICZ,2016; CHAMBERS,2001).

Neste contexto, a resistência ocasionada pela alteração da porina OprD é um dos mecanismos que contribuem para a inibição da atividade de antibióticos utilizados frente a cepas de *P. aeruginosa*, como os carbapenêmicos. Estes são considerados antibióticos de amplo espectro de atividade e possuem sua ação através da entrada na célula bacteriana pela parede celular, que nas bactérias gram-negativas é localizada na porção após a membrana externa, local o qual se encontram as porinas (ÁLVAREZ *et al.*,2005; ESTEPA *et al.*,2017)

A presença de bomba de efluxo é um mecanismo de resistência importante. O bombeamento de moléculas é mediado por proteínas localizadas na membrana citoplasmática de células, denominada bombas de efluxo, que podem resultar em resistência, como resultado da modificação ou amplificação dos genes responsáveis por codificar estas proteínas, os quais estão presentes no cromossomo bacteriano (LI; PLÉSIAT; NIKAIDO,2015; TINTINO *et al.*,2018).

Cepas de *P. aeruginosa* que possuem a capacidade de inibir antibióticos através das bombas de efluxo, apresentam resistência principalmente contra antibióticos beta-lactâmicos. Este mecanismo pode ser específico a um antibiótico ou a uma ampla variedade de drogas, o que torna este mecanismo de resistência bacteriana um grande problema na medicina atualmente (SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA,2015; SOTO,2013).

Nas cepas de *P. aeruginosa* a resistência desencadeada pelas beta-lactamases é desenvolvida pelo gene Amp-C e através das BLEE. O gene Amp-C é codificado no cromossomo bacteriano e é capaz de ser induzida pelos próprios antibióticos que possuem beta-lactâmicos, como cefalotina e ampicilina (LIVERMORE; WOODFORD,2000).

2.4.2. *Escherichia coli*

A espécie *Escherichia coli* é comumente encontrada em solos, água e colonizando o trato gastrointestinal, mas também possui capacidade patogênica, principalmente relacionada a quadros diarreicos, sendo considerada como uma infecção que causa índices de mortalidade e morbidade significativas (SHARMA *et al.*,2016).

Escherichia coli é caracterizada como um bacilo Gam-negativo, oxidase-negativo, que possui a capacidade de crescer tanto de forma aeróbica quanto anaeróbica. Pertence a família Enterobacteriaceae, podendo ser móvel ou não móvel, apresentando flagelos em peritríquio, distribuídos em toda célula (CROXEN *et al.*,2013; JORGE; CANOVA; DE CASTRO,2014).

A primeira vez que foi relatada a presença de cepas com características bastões delgados, em fezes infantis, no ano de 1885, por Theodor Escherich, que nomeou inicialmente como *Bacterium coli comme*, e posteriormente ficou conhecida como *Escherichia coli*, em 1954 (MÉRIC *et al.*,2016).

Esta espécie é considerada como uma das principais causadoras de doenças diarreicas, como também entre a espécie causadora de formas mais graves da doença. Além de apresentar

relação a infecções gastrointestinais, também pode estar relacionada a infecções do trato urinário, como também sepsis ou meningite em neonatais (MENG *et al.*,2013; PÉREZ *et al.*,2015).

Em relação a sua patogenia é classificada em grupos, sendo estes: comensais, patogênicas intestinais e patogênicas extraintestinais. O grupo de *E. coli* patogênica intestinal, é dividido em alguns subgrupos, denominados patotipos, que são categorizadas de acordo com a virulência de cada espécie. A identificação de cada patotipo é feita a partir de técnicas moleculares, dividindo em enterotoxinogênicas (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativas (EAEC), aderência difusa (ADEC) e enteropatogênica (EPEC) (CLARK *et al.*,2013; KAPER; NATARO; MOBLEY,2004; SOUZA *et al.*,2016).

No que se refere a *E. coli* enterotoxinogênica, possui como principais fatores de virulência, mecanismos relacionados a atuação de enterotoxinas e adesinas fimbriais resultando em quadros diarreicos (NASCIMENTO; SAND,2007). Esta espécie possui plasmídeos que são capazes de codificar genes para a produção de toxinas termo-lábéis (LT) e termo-estáveis (ST) sendo responsável por quadros de diarreias em regiões com baixos níveis de saneamento básico, principalmente em crianças, causando também elevados índices de mortalidade e morbidade em leitões (OZEROL *et al.*,2005; SHAHEEN *et al.*,2004).

A EPEC é caracterizada como um dos principais grupos de *E. coli* causadora de quadros de diarreias em crianças. O contato de adesão desta espécie bacteriana às células do tecido do hospedeiro, acontece essencialmente por conta da mediação de fimbrias do tipo IV, que são codificadas por genes decorrente de plasmídeos e a produção de enzimas periplasmáticas (OLIVA *et al.*,1997; SILVA; DA SILVA,2005).

O patotipo enterohemorrágico é caracterizado por quadros de infecções alimentares, que ocorrem principalmente por sua presença no trato gastrointestinal de animais. Este subgrupo preferencialmente expressa a toxina SLT (Shiga-like toxin), em que a substância liberada possui maior afinidade pelas células presentes no glomérulo renal, causando desde diarreias leves a síndrome hemolítica urêmica (HUS) (BERTÃO; SARIDAKIS,2007; ROSA; BARROS; DE OLIVEIRA,2016).

O subgrupo de EHEC é classificado como um dos principais patotipos responsáveis por causar diarreias, podendo apresentar ou não o plasmídeo pO157, responsável por proporcionar

maior patogenicidade à cepa bacteriana e gerar mecanismos frente às defesas do hospedeiro (ROSA; BARROS; DE OLIVEIRA,2016).

Dentre os mecanismos gerados, a resistência bacteriana das cepas de *E. coli* pode ocorrer em decorrência da produção de beta-lactamases de espectro estendido (BLEE). Estas enzimas produzidas principalmente por bactérias Gram-negativas possuem a capacidade de inibir além das penicilinas, as cefalosporinas de primeira e segunda geração. A produção destas enzimas ocorre por meio de genes cromossômicos ou a partir de plasmídeos, que este último possui genes de resistência (transposons) a outros antibióticos, os aminoglicosídeos (GARCÍA-HERNÁNDEZ *et al.*,2011; GARCÍA,2013).

A resistência das cepas de *E.coli* também podem ocorrer em relação ao antibiótico ciprofloxacina, devido a este patógeno ser responsável por infecções do trato urinário. O mecanismo desencadeado ocorre por conta que este medicamento é considerado um dos principais antibacterianos utilizados no tratamento de infecções do trato urinário, classificado como um antibiótico de amplo-espectro, como também pela facilidade na via de administração, que ocorre por meio de via oral ou injetável (DINIZ; SANTOS,2017; IONETE *et al.*,2014).

2.4.3. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* foi descrito pela primeira vez em 1880, por Alexandre Ogston, um cirurgião escocês, em pus de abscessos cirúrgicos. A partir de então, atualmente, existem cerca de 52 espécies e 28 subespécies conhecidas, em que a espécie *Staphylococcus aureus* é considerada a de maior importância clínica (LEE *et al.*,2018; SANTOS *et al.*,2007).

As cepas bacterianas de *S. aureus* possuem sensibilidade a elevadas temperaturas, como também em relação a desinfetantes e a solução antissépticas, por outro lado, fatores como sua capacidade de sobrevivência em superfícies durante longos períodos de tempo, fazem com que sejam classificadas como um dos micro-organismos mais virulentos do seu gênero (LIMA *et al.*,2015).

Além destas características, a espécie *Staphylococcus aureus* trata-se de uma bactéria Gram-positiva, beta-hemolítica, que apresenta forma de cocos ou arredondada e não apresenta motilidade. Esta espécie refere-se a uma bactéria comensal, sendo encontrada em aproximadamente 30% da população humana, como também uma cepa patogênica para o

organismo humano, responsável principalmente por casos de bacteremia e endocardites (LAKHUNDI; ZHANG,2018; TONG *et al.*,2015).

No organismo humano estas cepas bacterianas são encontradas principalmente nas fossas nasais, onde não causam sintomas, por outro lado, a presença nesta região tende a ser veículo de contaminação da espécie bacteriana, em que a facilidade de transmissão a torna de grande importância clínica. São encontrados também, em indivíduos saudáveis, colonizando a pele normal, o que é um importante fator em relação a infecções relacionadas a *S. aureus* a partir da injeção de drogas intravenosas (DAVIS,2005; DELEO; CHAMBERS,2009)..

As infecções por esta espécie estão geralmente associadas ao ambiente hospitalar, sendo considerada patógeno oportunista e podendo resultar em casos de infecções comuns na pele e em feridas, ou até mesmo episódios mais graves, como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite e meningite (CHAMBERS,2001; MENDES *et al.*,2017). Sua patogenicidade está diretamente ligada à capacidade de multiplicação e facilidade de dispersão e também pela produção de enzimas e toxinas, que acabam gerando a resposta do sistema imunológico e a produção dos sintomas em relação às infecções sistêmicas. Dentre as substâncias que auxiliam na capacidade patogênica da espécie *S. aureus* podem ser destacadas a catalase, coagulase, DNase, betalactamases, hialuronidases, como também as toxinas esfoliativas, toxinas do choque e enterotoxinas (IWATSUKI *et al.*,2006; SANTOS *et al.*,2007).

Considerando esses fatores, antes da introdução de antibacterianos, a infecção causada por esta espécie foi responsável pela letalidade de cerca de 80% dos pacientes acometidos. No início da década de 40, a partir da introdução da penicilina na prática clínica, este índice foi reduzido, e por outro lado, tornou-se responsável pelos casos de resistência do *S. aureus* a esse antibiótico. O mecanismo de resistência que permite que a penicilina não tenha atuação farmacológica sobre a cepa bacteriana é decorrente da produção de beta-lactamases, enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico presente nesta classe de antibacterianos (CHENG *et al.*,2016; HARKINS *et al.*,2017; PEACOCK; PATERSON,2015).

Posteriormente à resistência gerada a penicilina, também foi observada uma evolução de resistência à oxacilina, antibiótico pertencente ao grupo de penicilinas semissintéticas, ou também denominadas de penicilinas resistentes as beta-lactamases. As penicilinas semissintéticas foram produzidas a partir do isolamento do 6-amino-penicilâmico, em que foi possível modificar a cadeia deste precursor e gerar uma proteção aos anéis beta-lactâmicos presentes nas penicilinas (MIMICA; BEREZIN,2018; PUTAROV; GALENDE,2011).

A resistência das cepas de *S. aureus* à oxacilina é decorrente de um gene *mecA*, contido no cassete *mec* do cromossomo de *Staphylococcus*, elemento genético móvel presente nesta espécie. Este gene é responsável pela produção de PPB2a, que gera uma superprodução de tais proteínas fazendo com que a oxacilina tenha baixa afinidade a parede celular bacteriana, o que torna medicamentos dessa classe não efetivos contra estas cepas. Tal mecanismo também foi responsável pela evolução da resistência destas cepas ao antibiótico meticilina, também pertencente a classe de penicilinas semissintéticas (HAMILTON *et al.*,2017; MOUSSALLEM; KURY; MEDINA-ACOSTA,2007).

Inicialmente, a infecção de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) foi desencadeada apenas no ambiente hospitalar, visto que, só eram acometidos com as infecções causadas por estas cepas pacientes que tinham contato direto com o serviço de saúde. Contudo, os MRSA foram adquiridos também pela comunidade, descrito em muitas regiões e se tornando um agravante para a saúde pública (LEE *et al.*,2018; VUONG *et al.*,2016).

A partir da elevação destas taxas de resistência ocasionada pelo MRSA, começaram a ser utilizados glicopeptídeos, como a vancomicina. Este antibiótico atua por meio da ligação da parte terminal dos produtores de peptidoglicanos presentes na parede celular bacteriana, em que, desta forma, inibe a síntese da parede celular (GARDNER *et al.*,2018; MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO,2017).

Por fim, em 1997, no Japão, foi relatado o primeiro caso de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA), decorrente da expressão de genes que modificam a parede celular impedindo a atuação farmacológica da vancomicina. Desde então, foram encontradas outras cepas de VRSA em outros países, tornando-se um alerta, já reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para a necessidade da criação de outros antibacterianos que possuam eficácia contra estas cepas bacterianas (MAMISUKA,2005; SIEVERT *et al.*,2008).

3 PROCEDIMENTOS E RESULTADOS

Capítulo 1 - GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. and α -pinene

Revista: Industrial Crops & Products **Situação:** Publicado **Qualis em Biodiversidade:** B1 **Fator de impacto:** 4.191

Priscilla Ramos Freitas^a, Ana Carolina Justino de Araújo^a, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa^a, Débora Feitosa Muniz^a, Ana Cristina Albuquerque da Silva^a, Janaína Esmeraldo Rocha^a, Cícera Datiane de Moraes Oliveira-Tintino^b, Jaime Ribeiro-Filho^c, Luiz Everson da Silva^d, Camila Confortin^d, Wanderlei do Amaral^e, Cícero Deschamps^f, José Maria Barbosa-Filho^g, Natanael Teles Ramos de Lima^g, Saulo Relison Tintino^a, Henrique Douglas Melo Coutinho^{a,*}

^a Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri - URCA, Crato, Brazil

^b Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, Brazil

^c Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation - IGM-FIOCRUZ/BA, Salvador, Brazil

^d Post Graduation Course of Sustainable Territorial Development, Federal University of Paraná – UFPR, Matinhos, Brazil

^e Department of Chemical Technology, Federal University of Paraná - UFPR, Curitiba, Brazil

^f Post Graduation Course of Agronomy, Federal University of Paraná - UFPR, Curitiba, Brazil

^g Department of Pharmacy, Federal University of Paraiba - UFPB, João Pessoa, PB, Brazil

ABSTRACT

The genus *Baccharis* (Asteraceae) demonstrated the presence of compounds with antibacterial, antifungal and antioxidant activities. Because of the increasing rates of antimicrobial resistance, adequate treatment of infections caused by Gram-negative bacteria has become challenging. The objective of the present study was evaluate the antibacterial and antibiotic-modifying activity of the essential oil obtained from *Baccharis reticulata* (Ruiz & Pav.) Pers. and the compound α -pinene against *Pseudomonas aeruginosa* and other multiresistant bacteria. An analysis by gas chromatography associated with mass spectrometry (GC/MS) revealed the presence of dilapiol (33.8 %), α -pinene (31.7 %) and β -pinene (9.4 %) as major components of

the oil. The determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) revealed that the oil has antibacterial activity against *S. aureus* only. However, the oil potentiated the norfloxacin and gentamicin against all strains evaluated. Also, α -pinene increased the activity of norfloxacin against *E. coli*, as well as potentiated the activity of norfloxacin and gentamicin against *S. aureus*. Therefore, the authors conclude that the essential oil of *B. reticulata*, as well as the compound α -pinene, have antibacterial and antibiotic-modulating activities that make them useful in the development of new weapons against bacterial resistance.

Keywords: *Baccharis reticulata*. α -pinene. *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiotics.

1. INTRODUCTION

The use of medicinal plants for therapeutic purposes has been common for thousands of years (Souza et al., 2013). In this context, the popular known transmitted through generations has been investigated by scientific studies, especially in the fields of ethnobotany and ethnopharmacology, contributing to the discovery of new bioactive compounds (Medeiros et al., 2013).

The genus *Baccharis L.* (Asteraceae) has 179 species in Brazil, including plants that people use in folk medicine as analgesics, anti-inflammatories, diuretics, antidiabetics, and antispasmodics (Heiden and Schneider, 2015; Budel et al., 2008; Campos et al., 2016). These plants may have secretory ducts that besides serving as morphological markers, are associated with the production of essential oils, particularly monoterpenes and sesquiterpenes (Budel et al., 2012; Campos et al., 2016). Also, studies indicate that these substances work as antibacterials, antifungals, and antioxidants (Perera et al., 2017; De Oliveira et al., 2012; Botas et al., 2017).

Previous studies have demonstrated the bactericidal activity of essential oils obtained from plants of this genus against strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* (Cazella et al., 2019; Negreiros et al., 2016). The monoterpene α -pinene is one of the main constituents of the essential oil of *Baccharis reticulata*. This compound has fungicidal activity and has been used for many years to produce fragrances (Yang et al., 2011). In addition, Silva et al. (2012) reported that this compound has both antimicrobial activity and antibiotic-modulating activity.

Bacterial infections have been worrying in public health over the years. Although the discovery of antibiotics represents an essential mark in the control of infectious diseases, the misuse of these drugs contributes to the emergence of resistant microorganisms (Goodman, 2008; BRASIL and Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, 2006). This phenomenon occurs as an intrinsic characteristic of each species, but also as a result of mutations or horizontal gene transfer (Blair, 2015).

Because of the increasing rates of antimicrobial resistance, adequate treatment of infections caused by Gram-negative bacteria has become challenging (Pena et al., 2009). *Pseudomonas spp.* is one of the leading causes of bacteremia in hospitals (Magill et al., 2014). Studies indicate an increased risk of death in patients infected with *Pseudomonas aeruginosa* when compared with other Gram-negative bacilli (Thaden et al., 2017). This species presents several mechanisms of antibacterial resistance, including antibiotic-inactivating enzymes, efflux systems, and permeability reduction, which confer resistance to the main classes of antibiotics (Medeiros et al., 2013).

Although previous studies demonstrate the antibacterial activity of essential oils obtained from some species of *Baccharis*, the antibacterial properties of the essential oil of *Baccharis reticulata* (EOBr) remain to be investigated. Therefore, this work aims to evaluate the antibacterial and antibiotic-modulating activities of the EOBr and α -pinene against strains of *Pseudomonas aeruginosa* and other multiresistant bacteria.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

The essential oil was extracted from terminal branches and inflorescences of plants collected in the "Private Reserve of Natural Patrimony" (RPPN), a segment of Atlantic Forest in the State of Paraná, Southern Brazil. The dried specimens were herborized and deposited in the Herbarium of "Faculdades Integradas Espirita" (HFIE), and registered in the collection under number HFIE 8.252.

2.2 Extraction and determination of the chemical composition of essential oil and bacterial preparation

The extraction and chemical characterization of the essential oil was performed as described previously by Adams (2001). This study used multiresistant strains of *Staphylococcus aureus* 10, *Pseudomonas aeruginosa* 24 and *Escherichia coli* 06. The Table 1 shows the origin and resistance profile of these strains, described in the work of Bezerra et al. (2017). Bacterial cultures were seeded in Petri dishes containing Heart Agar Infusion (HIA) and maintained for growth in the oven at 37 °C for 24 h. After this period, a trawl of each microbial culture was diluted in test tubes containing sterile saline solution in triplicate. After this procedure, the turbidity of the solution was compared to the control of 0.5 of the McFarland scale.

Table 1 – Origin and antibiotic resistance profile of the strains

Bacterial Strain	Origin	Resistance Profile
<i>Staphylococcus aureus</i> 10	Rectum swab	Amc, Amox, Amp, Asb, Azi, Ca Cef, Cf, Cip, Cla, Clin, Ery, Lev, Mox, Oxa, Pen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 24	Nasal discharge	Ami, Cip, Com, Ctz, Imi, Lev, Mer, Ptz
<i>Escherichia coli</i> 06	Urine	Asb, Ca, Cef, Cfo, Cmp, Cro

Subtitle: Amc – Amoxicillin + Clavulanic Acid, Ami – Amikacin, Amox– Amoxicillin, Amp –Ampicillin, Asb – Ampicillin + Sulbactam, Azi – Azithromycin, Ca – Cefadroxil; Cef – Cephalexin, Cfo – Cefoxitin, Cip – Ciprofloxacin, Cla – Clarithromycin, Clin – Clindamycin, Cmp – Cefepime, Cro- Ceftriaxone, Ctz – Ceftazidime, Eri – Erythromycin, Imi – Imipenem, Lev – Levofloxacin, Mer – Meropenem, Mox – Moxifloxacin, Oxa – Oxacillin, Pen – Penicillin and Ptz – Piperacillin.

2.3 Preparation of the essential oil solution and antibiotics

For preparation, 10 mg of the essential oil was diluted by 1.0 mL of DMSO. Then, 8.765 mL of sterile distilled water was added to obtain a solution of the oil at a concentration of 1024 µg / mL, which was used for both antibacterial and antibiotic-modulating tests

2. 4. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration and Evaluation of the antibiotic-modulating activity

The MIC and the antibiotic-modulating activity of the essential oils modulatory determination followed the methodology described by Javadpour et al. (1996) and Coutinho et al. (2010). After 1 h the MIC was determined by ocular observation. All tests were carried out in triplicate.

2. 5. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation, and the differences were evaluated through analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-test using the GraphPad Prism software. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The extraction of the EOBr from dried samples had a yield of 0.52 %. Table 2 shows the percentage of each component of the oil, including dilapiol (33.8 %) as a principal constituent, followed by α -pinene (31.7 %) and β -pinene (9.4 %) (Fig. 1). Also, an analysis of the compounds shown in this table indicates that oil is composed primarily of monoterpenes (56.6%) and sesquiterpenes (43.4%).

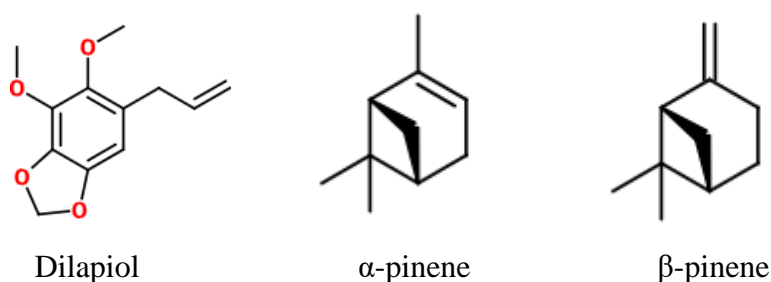


Figure 1: Molecular structures of major components of EOBr

Table 2: Relative composition of the EOBr

Retention Index	Compounds	%
927	α -tujene	0.6
937	α -pinene	31.7
952	Camphene	0.8
979	β -pinene	9.4
991	Myrcene	4.5
1031	Limonene	7.0
1050	(E)- β -ocimene	1.4
1178	Terpinen-4-ol	1.2
1285	Isobornyl acetate	1.7
1478	γ -muurolene	1.4
1493	Bicyclogermacrene	1.5
1625	Dilapiol	33.8
1638	epi- α -cadinol	3.4
1652	α -cadinol	1.6

Like other studies with species of the genus *Baccharis*, this work highlights the highest proportion of monoterpenes. However, *B. dracunculifolia* DC is an exception, for it has 0.30 % of these substances (Lago et al., 2008). According to Kurdelas et al. (2012), the essential oil of *B. darwinii* Hook. & Arn. has a high concentration of monoterpenes (66%), including limonene as a predominant constituent (47.1%). On the other hand, *B. uncinella* DC has a higher proportion of sesquiterpenes (60.8%), such as spathulenol and limonene (Agostini et al., 2005). In this context, the variation of the chemical composition of the essential oils observed in these studies may occur due to the genetic differences between the species, besides the seasonality and mode of extraction and collection (Bogo et al., 2016).

An analysis of the antimicrobial activity of the EOBr revealed a MIC with clinical relevance only against *S. aureus* 10. However, the oil displayed MIC values higher than 256 $\mu\text{g/mL}$ against *P. aeruginosa* and *E. coli*, indicating that EOBr did not have an antibacterial activity against these strains (Sales et al., 2017) (Table 3).

Table 3: Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of the EOBr against bacterial strains

Bacterial Strains	MICs
<i>E. coli</i> 06	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$
<i>P. aeruginosa</i> 24	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$
<i>S. aureus</i> 10	256 $\mu\text{g/mL}$

A previous study demonstrated the antibacterial activity of other species of the genus *Baccharis* against strains of *P. aeruginosa* using the disc diffusion methodology. However, these species did not inhibit growth of strains of *E. coli* and *S. aureus* (Ferronato et al., 2007).

On the other hand, a study by Simonsen et al. (2009) corroborates with our finds, for two species of the genus *Baccharis* had an antibacterial effect against *S. aureus*. Also, Calle et al. (2017) found similar results with the essential oils obtained from five species of *Baccharis* against strains of *S. aureus* 25,923 and *S. aureus* 29,213. This selective activity against *S. aureus* may be favored by its membrane constitution, on the contrary to Gram-negative strains, which have an outer membrane with lipopolysaccharides that hinder the entry of the essential oil into the bacterial cell (Nazzaro et al., 2013).

Following the analysis of the antibacterial activity of the EOBr, have been investigated whether this substance is having an antibiotic-modulating effect when associated with conventional drugs. As shown in Fig. 2, the combination of a subinhibitory concentration of EOBr with norfloxacin and gentamicin against *P. aeruginosa* 24 potentiated the activity of both drugs, reducing their MICs in approximately 3 and twofold, respectively. Against the *E. coli* 06 strain, the associations decreased the MICs of norfloxacin and gentamicin by 3.8 and two-fold, respectively, and against *S. aureus* 10 the MICs of these antibiotics were reduced 1.3 and 3.2 fold respectively. Nevertheless, the oil had no modulating effect on penicillin against the strains used in the present study.

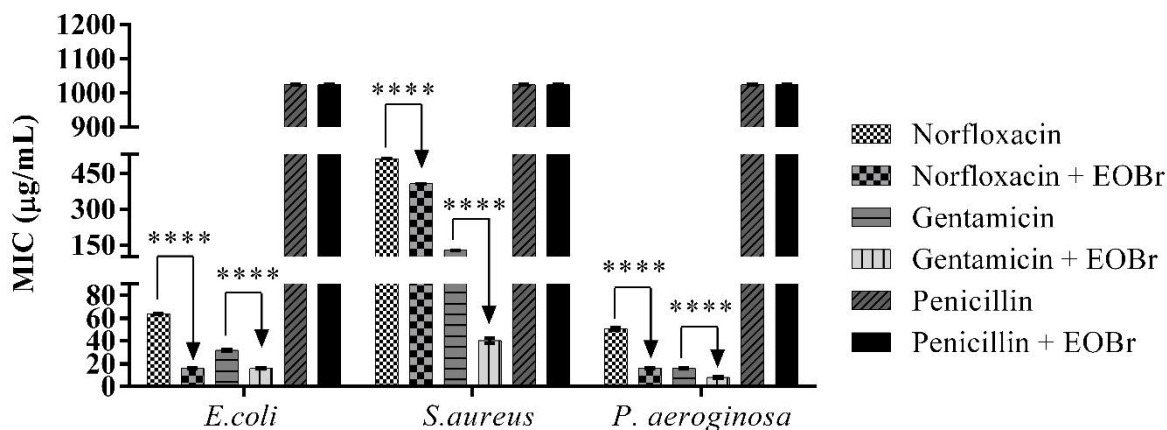


Figure 2: The antibiotic-modulating activity of *B. reticulata* oil in association with norfloxacin, gentamicin, and penicillin against multiresistant strains of *E.coli* 06, *S. aureus* 10 and *P. aeruginosa* 24
 **** p<0.0001

Consistent with the results of the present study, Salazar et al. (2018) demonstrated that the essential oil of *B. dracunculifolia* presented synergism when associated with the antibiotics norfloxacin and gentamicina against strains of *P. aeruginosa* 24 and *E. coli* 06, as well as when associated with norfloxacin against *S. aureus* 10. In this context, there are evidences that the

activity of β -lactamases limits the modulating action of terpenes on penicillins, although these compounds are capable of altering both the permeability and the functions of the bacterial cell membrane (Del Fio et al., 2017; Chistani et al., 2007).

To investigate whether the antibacterial effects of the essential oil of *B. reticulata* would be related to the activity of one of its principal constituents, was calculated the MIC of α -pinene. However, for all strains tested, were found values greater than 1024 $\mu\text{g/mL}$, indicating that this compound does not exhibit relevant antibacterial activity. This observation diverges from some studies suggesting that α -pinene has antibacterial activity demonstrated both by the disc diffusion method and by the microdilution method (Ramdani et al., 2013; Aćimović et al., 2017; Leite et al., 2007). However, it is necessary to consider that the differences in the sensitivity of the strains used in each study may justify the differences concerning the activity of this compound.

On the other hand, an analysis of the α -pinene modulating activity demonstrated that this compound potentiated the activity of norfloxacin against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus* (Fig. 3). This compound modulated the action of gentamicin only against *S. aureus* but did not affect the activity of penicillin against any of the strains tested. These data demonstrate that the modulating effect of α -pinene varies according to the antibiotic and bacterial strain.

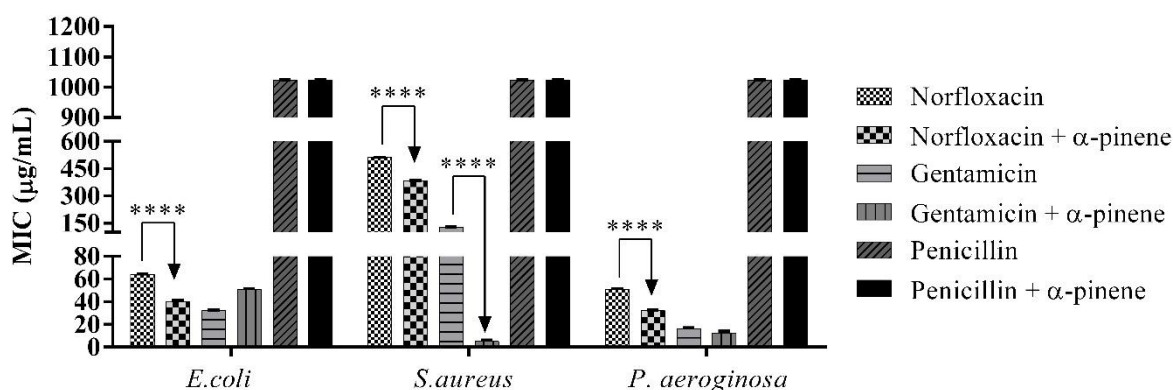


Figure 3: The antibiotic-modulating activity of alpha-pinene in association with norfloxacin, gentamicin, and penicillin against multiresistant strains of *E. coli* 06, *S. aureus* 10 and *P. aeruginosa* 24. **** $p < 0.0001$.

According to Medeiros et al. (2017), α -pinene potentiated the action of norfloxacin against strains of *S. aureus*, causing a MIC reduction of four-fold compared with the drug alone. However, the compound did not affect the resistance profile of these bacteria to tetracycline.

On the other hand, the essential oil of *Eugenia jambolana*, which has α -pinene as a primary constituent presented synergistic effects when associated with gentamicin against *E. coli*, but not against *P. aeruginosa* (Pereira et al., 2017).

4. CONCLUSION

The essential oil of *B. reticulata* presented antibacterial activity against the multiresistant strain of *S. aureus*. Moreover, when associated with the antibiotics norfloxacin and gentamicin, the oil exhibited synergism against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The hypothesis that the anti-bacterial properties of the EOBr is due to the constituent α -pinene was only partially confirmed since this compound did not show activity against multiresistant strains, although it also had a modulating effect against Gram-positive and Gram-negative strains. Thus, the antibacterial properties of the essential oil of *B. reticulata* result at least in part from the action of α -pinene, but it is also likely to be related to the activity of other compounds such as dilapiol and β -pinene.

REFERENCES

- Aćimović, M.G., Pavlović, S.Đ., Varga, A.O., Filipović, V.M., Cvetković, M.T., Stanković, J.M., Čabarkapa, I.S., 2017. Chemical composition and antibacterial activity of *Angelica archangelica* root essential oil. *Nat. Prod. Commun.* 12, 205–206.
- Adams, R.P., 2001. *Identification of Essential Oil Components by Gas chromatography/ mass Spectrometry*. Carol Stream: Allured Publishing Corporation.
- Agostini, F., Santos, A.C.A., Rossato, M., Pansera, M.R., Zattera, F., Wasum, R., Serafini, L.A., 2005. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 15, 215–220.
- Blair, J.M., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature* 13 (42-), 51.

Bezerra, C.F., Camilo, C.J., do Nascimento Silva, M.K., de Freitas, T.S., Ribeiro-Filho, J., Coutinho, H.D.M., 2017. Vanillin Selectively Modulates the Action of Antibiotics Against Resistant Bacteria, vol. 113. pp. 265–268.

Bogo, C.A., Andrade, M.H., Paula, J.P., Farago, P.V., Döll-Boscardin, P.M., Budel, J.M., 2016. Comparative analysis of essential oils of *Baccharis* l.: a review. Rev. Strict. Sensu 1, 1–11.

Botas, G., Cruz, R., de Almeida, F., Duarte, J., Araújo, R., Souto, R., Ferreira, R., Carvalho, J., Santos, M., Rocha, L., Pereira, V.L.P., Fernandes, V.P., 2017. *Baccharis reticularia* DC. And Limonene Nanoemulsions: promising larvicidal agents for *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) control. Molecules 22 (11) pii: E1990.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2006. Pediatria: Prevenção E Controle De Infecção Hospitalar. Brasília: ANVISA, pp. 116.

Budel, J.M., Matzenbacher, N.I., Duarte, M.R., 2008. Genus *Baccharis* (Asteraceae): A Review of Chemical and Pharmacological Studies. Studium Press LLC: Houston, pp. 1–18.

Budel, J.M., Duarte, M.R., Döll-Boscardin, P.M., Farago, P.V., Matzenbacher, N.I., Sartoratto, A., Maia, B.H.L.N.S., 2012. Composition of essential oils and secretory structures of *Baccharis anomala*, *B. Megapotamica* and *B. Ochracea*. J. Essent. Oil Res. 24, 19–24.

Calle, A., San Martin, Á., Melgarejo, M., Flores, Y., Almanza, G.R., 2017. Evaluation of flavonoid contents and antibacterial activity of five bolivian *Baccharis* species. Rev. Bol. Quim. 34, 112–122.

Campos, F.R., Bressan, J., Jasinski, V.C.G., Zuccolotto, T., da Silva, L.E., Cerqueira, L.B., 2016. *Baccharis* (Asteraceae): chemical constituents and biological activities. Chem Biodivers. 13, 1–17.

Cazella, N.L., Glamoclija, J., Sokovic', M., Gonçalves, J.E., Linde, G.A., Colauto, N.B., Gazim, Z.C., 2019. Antimicrobial activity of essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) aerial parts at flowering period. Front. Plant Sci. 10.

- Chistani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G., 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6300–6308.
- Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Falcão-Silva, S., Siqueira-Júnior, J.P., Lima, E.O., 2010. Effect of *Momordica charantia* L. In the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infec. Dis.* 33, 467–471.
- De Oliveira, R.N., Rehder, V.L., Santos Oliveira, A.S., Junior, I.M., de Carvalho, J.E., de Ruiz, A.L., Jeraldo, V.L., Linhares, A.X., Allegretti, S.M., 2012. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. *Exp. Parasitol.* 132, 135–143.
- Del Fio, F.D.S., de Mattos-Filho, T.R., Groppo, F.C., 2017. Resistência bacteriana. *Rev. Bras. Med.* 57, 1129–1140.
- Ferronato, R., Marchesan, E.D., Pezenti, E., Bednarski, F., Onofre, S.B., 2007. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC e *Baccharis uncinella* DC (Asteraceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 17, 224–230.
- Goodman, Gilman's, 2008. *Manual of Pharmacology and Therapeutics*. Nova York: McGraw Hill.
- Heiden, G., Schneider, A., 2015. *Baccharis*. Lista De Espécies Da Flora Do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, Brazil.
- Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.S., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Mann, C.M., Markhan, J.L., 1996. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J. Appl. Microbiol.* 84, 538–544.

Kurdelas, R.R., Lopez, S., Lima, B., Feresinb, G.E., Zygodloc, J., 2012. Chemical composition, anti-insect and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina. Patagonia. Ind. Crops. Prod. 40, 261–267.

Lago, J.H.G., Romoff, P., Oriana, A.F., Soares, M.G., Baraldi, P.T., Corrêa, A.G., Souza F.O., 2008. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de “Campos de Altitude” da mata atlântica paulista. Quim. Nova 31, 727–730.

Leite, A.M., Lima, E.D.O., Souza, E.L.D., Diniz, M.D.F.F.M., Trajano, V.N., Medeiros, I.A.D., 2007. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. Rev. Bras. Cienc. Farm. 43, 121–126.

Magill, S.S., Edwards, J.R., Bamberg, W., Beldavs, Z.G., Dumyati, G., Kainer, M.A., Lynfield, R., Maloney, M., McAllister-Hollod, L., Nadle, J., Ray, S.M., Thompson, D.L., Wilson, L.E., Fridkin, S.K., 2014. Emerging infections program healthcare-associated, T. Antimicrobial use prevalence survey. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. N. Engl. J. Med. 370, 1198–1208.

Medeiros, P.M., Ladio, A.H., Santos, A.M.M., Albuquerque, U.P., 2013. Does the selection of medicinal plants by Brazilian local populations suffer taxonomic influence? J. Ethnopharmacol. 146, 842–852.

Medeiros, V.M., do Nascimento, Y.M., Souto, A.L., Madeiro, S.A.L., Costa, V.C.O., 2017. Chemical composition and modulation of bacterial drug resistance of the essential oil from leaves of *Croton grewoides*. Microb. Pathog. 111, 468–471.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceut. 6, 1451–1474.

Negreiros, M.O., Pawlowski, A., Zini, C.A., Soares, G.L.G., Motta, A.S., Frazzon, A.P.G., 2016. Antimicrobial and antibiofilm activity of *Baccharis psiadioides* essential oil against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* strains. Pharm. Biol. 54, 3272–3279.

- Pena, C., Suarez, C., Tubau, F., Dominguez, A., Sora, M., Pujol, M., Gudiol, F., Ariza, J., 2009. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: factors influencing multidrug-resistant acquisition in non-critically ill patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 519–522.
- Pereira, N.L., Aquino, P.E., Júnior, J.G., Cristo, J.S., Vieira-Filho, M.A., 2017. Antibacterial activity and antibiotic modulating potential of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* in association with led lights. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 174, 144–149.
- Perera, W.H., Bizzo, H.R., Gama, P.E., Alviano, C.S., Salimena, F.R.G., Alviano, D.S., Leitão, S.G., 2017. Essential oil constituents from high altitude Brazilian species with antimicrobial activity: *Baccharis parvidentata* Malag., *Hyptis monticola* Mart. Ex Benth. And *Lippia origanoides* Kunth. *J. Essent. Oil Res.* 29, 109–116.
- Ramdani, M., Lograda, T., Silini, H., Zeraib, A., Chalard, P., Figueredo, G., 2013. Antibacterial activity of essential oils of *Juniperus phoenicea* from *Eastern Algeria*. *Int. J. Appl. Pharm. Sci. Res.* 3, 22.
- Salazar, G.J.T., de Sousa, J.P., Lima, C.N.F., Lemos, I.C.S., da Silva, A.R.P., de Freitas, T.S., 2018. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. *Industr. Crops. Prod.* 122, 591–595.
- Sales, V.S., do Nascimento, E.P., Monteiro, A.B., da Costa, N., Haiele, M., Delmondes, G.A., 2017. In vitro modulation of the antibiotic activity of essential oil from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq. *Rev. Cub. Plant. Med.* 22, 1–10.
- Silva, A.C.R., Lopes, P.M., Azevedo, M.M.B.M., Costa, D.C.M., Alviano, C.L., Alviano, D.S., 2012. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. *Molecules* 17, 6305–6316.
- Simonsen, H.T., Riedel, C., Gade, L.B., Jebjerg, C.P., Guzman, A., Mølgaard, P., 2009. Chemical composition and antibacterial activity of the leaf essential oil of *Baccharis*

magellanica (Lam.) Pers. And *Baccharis elaeoides* Remy from Chile. J. Essent. Oil Res. 21, 377–380.

Souza, C.M., Brandão, D.O., Silva, M.S.P., Palmeira, A.C., Simões, M.O.S., Medeiros, A.C.D., 2013. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande - Paraíba. Rev. Bras. Plant. Mes. 15, 188–193.

Thaden, J.T., Park, L.P., Maskarinec, S.A., Ruffin, F., Fowler Jr, V.G., van Duin, D., 2017. Results from a 13-year prospective cohort study show increased mortality associated with bloodstream infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* compared to other bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 61, 1–16.

Yang, Z., Wu, N., Zu, Y., Fu, Y., 2011. Comparative anti-infectious bronchitis virus (IBV) activity of (–)-pinene: effect on nucleocapsid (N) protein. Molecules 16, 1044–1054.

Capítulo 2 Antibacterial and antibiotic-modulating activities of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against MDR strains

Revista: Microbial Pathogenesis **Situação:** Publicado **Qualis em Biodiversidade:** B2

Fator de impacto: 2.581

Priscilla Ramos Freitas¹, Ana Carolina Justino de Araújo¹, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa², Debora Feitosa Muniz, Janaina Esmeraldo Rocha¹, José Bezerra de Araújo Neto¹, Maria Milene Costa da Silva¹, Raimundo Luiz Silva Pereira³, Luiz Everson da Silva⁴, Wanderlei do Amaral⁴, Cicero Deschamps⁴, Saulo Relison Tintino¹, Jaime Ribeiro-Filho⁵, Henrique Douglas Melo Coutinho¹

¹ Laboratory of Microbiology and Molecular Biology - LMBM, Regional University of Cariri

² Laboratory of Bioprospecting of Semiarid and Alternative Methods – LABSEMA, Regional University of Cariri

³ Laboratory of Simulations and Molecular Spectroscopy – LASEMOL, Regional University of Cariri

⁴ Federal University of Parana

⁵ Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA), Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40296-710 Salvador, Bahia, Brazil.

ABSTRACT

Essential oils are secondary metabolites with immense pharmacological potential. These substances are abundantly produced by plants of the family Asteraceae, such as *Baccharis coridifolia*. Previous studies have demonstrated that this species has pharmacological properties that make it a promising source of new antibacterial agents. Therefore, the present study aimed to evaluate the antibacterial and antibiotic-modulating activity of *Baccharis coridifolia* essential oil against multidrug-resistant (MDR) strains. The phytochemical analysis was carried out by gas chromatography coupled to Mass Spectroscopy (GC/MS), and realized the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and antibiotic-modulation from the microdilution method in 96-well plates. It was revealed the presence of germacrene D (23.7%), bicyclogermacrene (17.1%), and (E)-caryophyllene (8.4%) as major components. The minimum inhibitory concentration of

essential oil against strains of *Pseudomonas aeruginosa* (512 µg/mL) and *Staphylococcus aureus* (128 µg/mL) demonstrated clinically relevant antibacterial activity. In addition, the combination of subinhibitory doses of the oil with conventional antibiotics showed synergism, indicating potentiation of the antibacterial effect. In conclusion, the essential oil of *Baccharis coridifolia* (EOBc) presented antibacterial and antibiotic-modulating activities that place this species as a source of molecules useful in the fight against bacterial resistance.

Keywords: *Baccharis coridifolia*. *Escherichia coli*. *Pseudomonas aeruginosa*. *Staphylococcus aureus*. Antibacterial agents. Essential Oils.

1. INTRODUCTION

The use of plants for therapeutic purposes is an ancient practice that has been empirically transmitted from generation to generation [1,2]. The therapeutic properties of medicinal plants are due to the action of secondary metabolites, also called phytochemicals [3,4]. In addition to providing phytotherapeutic characteristics, these compounds protect plants against pests and microbial infections [5].

In this context, Asteraceae species have been recognized for their high production of essential oils, metabolites with a wide variety of biological effects, and relevant applications in the cosmetics and perfume industries. This family is represented by about 27,000 species and 1,700 genera [6,7], among which the genus *Baccharis* stands out for presenting about 500 species widely distributed in the American continent, mainly in South America. In Brazil, around 178 species are found, predominantly in the state of Paraná, and approximately 83 species are found [8,9].

Species of the genus *Baccharis* have been widely investigated for the medicinal properties reported in folk medicine. Studies indicate that the plants of this genus present in its composition higher concentration of sesquiterpenes in which they can present anti-inflammatory, analgesic, and gastroprotective effect, among other pharmacological properties [10]. *Baccharis coridifolia*, also known as romerillo or mio-mio, is found in regions such as Paraguay, Uruguay, Brazil, and northern Argentina [11]. It has been shown that this species has anti-inflammatory activity, besides being popularly used for the treatment of parasitic infections and equine distemper, suggesting that *B. coridifolia* may have antibacterial properties [12].

Multiresistant bacterial infections have become a significant public health problem. Multidrug resistance occurs in both Gram-positive and Gram-negative bacteria, which cause

infections that cannot be treated with most conventional antibiotics [13]. Among the Gram-positives, *Staphylococcus aureus* stands out for causing infections ranging from simple skin diseases to severe conditions such as bacteremia and endocarditis [14,15]. The species *Escherichia coli*, of the Enterobacteriaceae family has resistance to several drugs, such as carbapenemases, cephalosporins, among others [16]. *Pseudomonas aeruginosa* are Gram-negative bacteria with high virulence. These bacteria act as opportunistic microorganisms that can cause severe infections and even sepsis [17,18].

The emergence of resistant microorganisms has been directly associated with the indiscriminate use of antibiotics, resulting in a selective pressure that favors the survival of bacteria before treatment with conventional medicines [19]. This scenario has driven the development of research aimed at identifying new antimicrobial agents through chemical synthesis or isolation from natural products [20,21]. Accordingly, the present study aimed to investigate the antibacterial properties of the essential oil of *Baccharis coridifolia* leaves against multiresistant strains, considering that this is the first study to report the antibacterial properties of this species.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

The essential oil was extracted from the terminal branches and/or inflorescences of specimens collected in the environmental Protection area “Reserva Particular do Patrimônio Natural” (RPPN), a segment of the Atlantic Forest in the state of Paraná, southern Brazil. The dried specimens were prepared and deposited in the Herbarium of the “Faculdades Integradas Espiritas” college, under registration number HFIE 8.371.

2.2 Extraction and chemical analysis of *Baccharis coridifolia* essential oil

The essential oil was extracted in a Clevenger type apparatus using 100g of fresh plant material and 1L of distilled water with three repetitions. After extraction, the samples were centrifuged at 5,000 RPM for 2 min to separate the oil, and the total mass of each sample was determined on an analytical balance.

Gas Chromatography, coupled to Mass Spectroscopy, was used to analyze the chemical composition of the oil. The chemical constituents were identified by comparing their mass spectra with the Wiley and NIST library as well as by analyzing the linear retention indices. These indices were calculated from the injection of a homologous series of hydrocarbons (C7–C26) and compared by the data found in the literature. Only peaks higher than 1% were considered for the identification and quantification of chemical components [22].

2.3 Bacterial strains

The following multiresistant strains were used throughout the present study: *Staphylococcus aureus* 10, *Pseudomonas aeruginosa* 24 e *Escherichia coli* 06 is described in the work of Bezerra and collaborators [23] that used the same strains.

2.4 Essential oil preparation

A test tube was added with 10 mg of the essential oil and 1mL of DMSO. This solution was transferred to another tube and diluted in 8.765mL of sterile distilled water, resulting in a solution with a final concentration of 1024µg/mL. This solution was used throughout the tests.

2.5 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Bacterial strains were seeded in Petri dishes containing HIA culture medium and incubated at 37 °C for 24 h. Then, a sample of each culture was dragged and diluted in test tubes containing sterile saline, in triplicate. After this procedure, the turbidity was adjusted according to the 0.5 McFarland scale. An aliquot of 150µL of each bacterial inoculum (referring to 10% of the total solution) was transferred to a tube containing 1350µL of a 10% Brain Heart Infusion Broth (BHI) solution. To prepare the BHI, 10% of the material was weighed, in relation to the total volume used. Every well of a 96-well microdilution plate was filled with 100 µL of this solution, and then the essential oil was diluted at concentrations ranging from 512 µg/mL to 8 µg/mL. A well with no essential oil added was used as bacterial growth positive control. After the treatments, the plates were incubated at 37 °C for 24 h. Bacterial growth was analyzed by adding 20 µL of resazurin to each well, previously prepared at a concentration of 0.04mg /

ml. After the resazurin was added, the plates were incubated for 1 hour at room temperature and after this period the colorimetric variation was observed, considering that there was no bacterial growth in the wells that remained with the blue color, and positive for the bacterial growth in the wells that had changed the blue to pink coloring [24,25] . All test was performed in triple.

2.6 Evaluation of the antibiotic-modulating activity

For analysis of the antibiotic-modulating activity, the *Baccharis coridifolia* essential oil was used at a sub-inhibitory concentration (MIC / 8). The oil was diluted in a variable volume of 10% BHI enough to obtain this concentration and then added to 150 μ L of bacterial inoculum (corresponding to a concentration of 10%) in a tube. Controls were prepared by using 1350 μ L of 10% BHI medium and 150 μ L of the inoculum. Each well of a microdilution plate was filled with 100 μ L of the oil or control solution. Following this procedure, serial dilutions with 100 μ L of Penicillin, Gentamicin, and Norfloxacin at an initial concentration of 1024 μ g/mL. The plates were incubated in an oven at 37 °C for 24 h, and then, the MIC of these antibiotics in the presence of the essential oil was determined by the addition of resazurin [24]. All test was performed in triple.

2.7 Statistical analysis

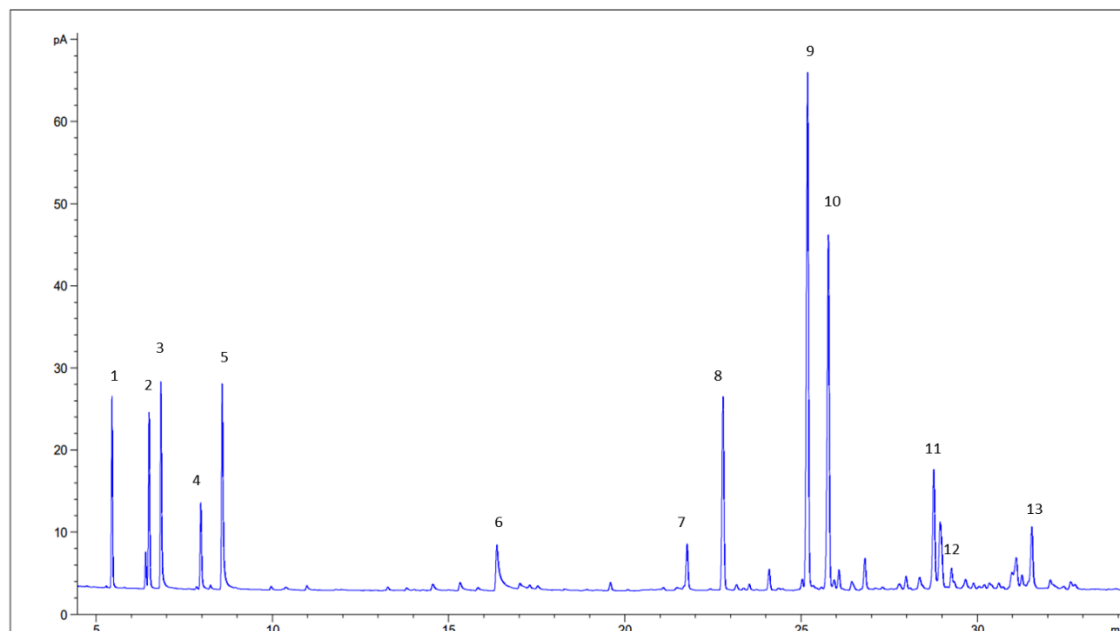
Data were expressed as mean \pm standard deviation and evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test using GraphPad Prism software. Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

3. RESULTS

The essential oil of fresh leaves of *Baccharis coridifolia* had a total yield of 0.17%. The phytochemical characterization by Gas chromatography coupled to mass spectrometry identified the presence of 13 compounds, as shown in figure 1. As shown in table 1, the oil is constituted predominantly by sesquiterpenes (67.1%) and monoterpenes (32.9%). An analysis

of individual constituents revealed the presence of germacrene D (23.7%), bicyclogermacrene (17.1%), and (E)-caryophyllene (8.4%) as major components.

FIGURE 1 GC-MS chromatogram of the essential oil of *Baccharis coridifolia*



1= α -pinene; 2= β -pinene; 3=myrcene; 4=limonene; 5=(E)- β -ocimene; 6=geraniol; 7= β -elemene; 8=(E)-caryophyllene; 9=germacrene D; 10=bicyclogermacrene; 11=spathulenol; 12=caryophyllene óxide; 13= α -cadinol

TABLE 1: Relative composition (%) of *Baccharis coridifolia* Essential Oil

Retention Index	Compound	%
937	alpha-pinene	4.7
979	beta-pinene	5.8
992	Myrcene	6.7
1031	Limonene	3.2
1051	(E)-beta-ocimene	8.2
1258	Geraniol	4.3
1391	beta-elemene	2.8
1417	(E)- caryophyllene	8.4
1479	Germacrene D	23.7
1493	Bicyclogermacrene	17.1
1577	Spathulenol	8.1
1581	Caryophyllene oxide	2.8
1651	alpha-cadinol	4.2

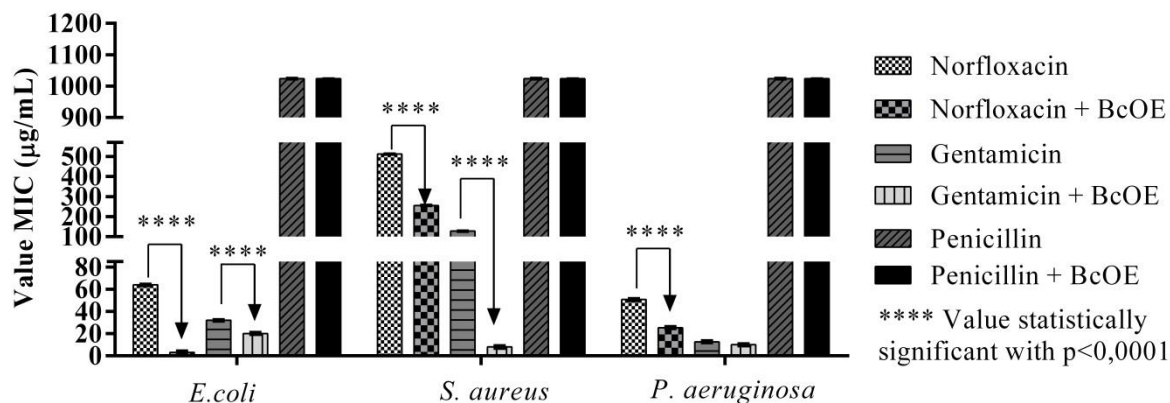
Given this evidence, we used the microdilution method to determine the EOBC MIC. The results revealed that this substance has antibacterial activity against strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, but not against *Escherichia coli* (Table 2), considering a MIC $\leq 1000\mu\text{g} / \text{mL}$ [26] as clinically relevant.

TABLE 2: Minimum Inhibitory Concentration Against Multiresistant Strains by Essential Oil of *Baccharis coridifolia*

Strain	MIC
<i>Escherichia coli</i> 06	$\geq 1024 \mu\text{g}/\text{MI}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 24	128 $\mu\text{g}/\text{MI}$
<i>Staphylococcus aureus</i> 10	512 $\mu\text{g}/\text{mL}$

As shown in Figure 2, besides having a direct antibacterial activity, the essential oil increased the activity of conventional drugs, demonstrating an antibiotic-modulating effect. Tests with *E. coli* revealed that association of the oil with norfloxacin caused a reduction in the MIC from 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 3.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and in the case of gentamicin, the MIC was reduced from 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Combining the oil with the same antibiotics against the *S. aureus* strain also caused a significant reduction in the MIC of these drugs, especially gentamicin, which was reduced from 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. On the other hand, in the tests using *P. aeruginosa*, only the MIC of Norfloxacin was reduced. Interestingly, the essential oil did not reduce the MIC of Penicillin against any of the bacterial strains tested, indicating that the modulating effect varies with the class of the antibiotic.

Figure 2- Antibiotic-modulating activity of *B. coridifolia* essential oil in combination with antibiotics against multiresistant strains of *E. coli* 06, *P. aeruginosa* 24 and *S. aureus* 10.



4. DISCUSSION

The phytochemical composition of the oil analyzed by the present study presented characteristics similar to other species belonging to the same genus. Studies have shown that the essential oils obtained from *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis trimera* are predominantly composed of sesquiterpenes, including germacrene D and α -caryophyllene, respectively as major components [10]. A study by Valarezo *et al.* [27] found that the essential oil of *Baccharis obtusifolia* has limonene, germacrene D, β -pinene, and bicyclogermacrene as principal constituents. These compounds were also found in *Baccharis coridifolia* essential oil, which had not been previously reported in the literature.

Regarding pharmacological aspects, sesquiterpenes, the leading class of constituents found in the EOBC, were found to present antibacterial activity. Studies have shown that these compounds act on the bacterial membrane, causing an increase in permeability and damage that results in cell autolysis [28].

Literature data demonstrate that the antibacterial spectrum of action of *Baccharis* species is variable. In agreement with the present study, Salazar *et al.* [29] showed that *Baccharis dracunculifolia* essential oil has antibacterial activity against SA10 and PA24 strains, with MICs of 512 μ g/mL and 813 μ g/mL, respectively. However, the oil showed no action against the multidrug resistant *E. coli* strain. In addition, the species has a chemical composition

similar to that found in the present study, characterized by a high concentration of sesquiterpenes, including Germacrene D (18.4%) as the primary component.

A study with species of the same genus found that *B. dracunculifolia* and *B. uncinella* present an antibacterial activity against *E. coli*, *P.aeruginosa* and *S. aureus*, indicated by an increase in the inhibition halo in the disc diffusion method [30]. On the other hand, Valarezo *et al.* [27] demonstrated that *Baccharis latifolia* oil showed no antibacterial activity against *S.aureus*, *P. aeruginosa*, and *E.coli* strains, considering that the oil presented higher concentrations of sesquiterpenes.

The antibiotic-modulating activity of *B. coridifolia* was previously analyzed through the disc diffusion method [31]. The authors demonstrated that the association of the essential oil obtained from this plant with Gentamicin against the *S. aureus* strain had an antagonistic effect. Furthermore, the oil did not modulate the antibacterial effect of gentamicin against *E. coli*, which differs from the results obtained by the present study. On the other hand, a study by Salazar *et al.* [29], using another species of the same genus (*B. dracunculifolia*), demonstrated synergistic effect when the essential oil was associated with gentamicin and norfloxacin against strains of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*.

Essential oils have been shown to have constituents capable of interacting synergistically with antibiotics enhancing their antibacterial effect. Regarding the mechanisms involved in this process, the secondary metabolites present in essential oils seem to facilitate the transport of other oil compounds into the bacteria, enhancing the antibacterial activity of these drugs [32]. In addition, essential oils also have a direct antibacterial activity, whose mechanism involves cell wall lysis, which results in extravasation of cell content, as well as reduction of motor force and coagulation of the cytoplasm. Here, we suggest that these are potential mechanisms involved in the antibacterial and antibiotic-modulating actions of *B. coridifolia* essential oil.

5. CONCLUSION

The essential oil obtained from the leaves of *B. coridifolia* exerted an antibacterial activity against multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. In addition, the oil potentiated the action of aminoglycosides against multiresistant bacteria, which appears to be dependent on the type of drug and bacterial strain. In that its

antibacterial activity possibly occurs due to the present metabolites, which was evidenced as in greater concentration the presence of the germacrene D compound in the essential oil. Thus, further studies with isolated constituents will be crucial to identify the compounds responsible for pharmacological properties of EOBC in this model.

REFERENCES

- 1 Salvagnini, L. E.; Oliveira, J. R. S.; Santos, L. E. D.; Moreira, R. R. D.; Pietro, R. C. L. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L.(Myrtaceae). *Rev. Bras. Farmacog*, **2008**, 241-244.
- 2 Salehi, B. et al. Plant-Derived Bioactives and Oxidative Stress-Related Disorders: A Key Trend towards Healthy Aging and Longevity Promotion. *Applied Sciences*, **2020**, *10*, 947.
- 3 Salehi, B. et al. The therapeutic potential of the labdane diterpenoid forskolin. *Applied Sciences*, **2019**, *9*, 4089.
- 4 Salehi, Bahare et al. Phytochemicals in *Helicobacter pylori* infections: What are we doing now?. *Int. J. Mol. Sci*, **2018**, *19*(8), 2361.
- 5 Shakya, A. K. Medicinal plants: future source of new drugs. *Int. Journ. Herbal Med.*, **2016**,59-64.
- 6 Agostini, F.; Santos, A. C. A.; Rossato, M.; Pansera, M. R.; Zattera, F.; Wasum, R.; Serafini, L. A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. *Rev Bras Farmacogn*, **2005**, *15*, 215-220.
- 7 Pereira, F.C.; de Souza, L. F.; Guilherme, F. A. G.; Freire, J. C.; Teles, A. M. Diversidade de Asteraceae em um campo de murundus no sudoeste de Goiás, Brasil. *Rodriguésia*, **2019**, *70*(1).
- 8 Bogo, C. A.; de Andrade, M. H.; de Paula, J. P.; Farago, P. V.; Döll-Boscardin, P. M.; Budel, J. M. Comparative analysis of essential oils of *Baccharis* L.: A review. *Rev. Stricto Sensu*, **2016**, *1*(2).
- 9 Heiden, G.; Leoni, L. S.; Nakajima, J. N. *Baccharis magnifica* (Asteraceae, Astereae): a striking new species endemic to the summits of Serra do Caparaó, southeastern Brazil. *Phytotaxa*, **2014**, *162*(4), 211-216.
- 10 Paroul, N.; Rosa, R. L. D.; Piazza, S. P.; Bertella, T.; Puton, B. M. S.; Falcão, L.; Missões, U. R. I. Composição química e atividade antioxidante de *Baccharis trimera* PERS e *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Rev persp*, **2016**, *40*(151), 55-64.
- 11 Busam, L.; Habermehl, G. G. Accumulation of mycotoxins by *Baccharis coridifolia*: a reason for livestock poisoning. *Naturwissenschaften*, **1982**, *69*(8), 392-393.
- 12 Martinez, M. J. A.; Bessa, A. L.; Benito, P. B. Biologically active substances from the genus *Baccharis* L.(Compositae). *Elsevier*, **2005**, *30*, 703-759.
- 13 Salehi, B. et al. Therapeutic Potential of α -and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules*, **2019**, *9*(11),738.
- 14 Peacock, S. J.; Paterson, G. K. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual rev. biochem.*, **2015**, *84*.

- 15 Tong, S. Y.; Davis, J. S.; Eichenberger, E.; Holland, T. L.; Fowler, V. G. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2015**, 28(3), 603-661.
- 16 Leo S, Lazarevic V, Gaia N, Estellat C, Girard M, Matheron S, Armand-Lefèvre L, Andremont A The VOYAG-R study group, Schrenzel J, Ruppé E. The intestinal microbiota predisposes to traveler's diarrhea and to the carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae after traveling to tropical regions. *Gut Microbes*. 2019, 10 (5):631-641.
- 17 Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbio.*, **2004**, 2(2), 123.
- 18 Moradali, M. F.; Ghods, S.; Rehm, B. H. Pseudomonas aeruginosa lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **2017**, 7, 39.
- 19 Cui, H., Zhang, C., Li, C., Lin, L. Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Industrial Crop. Prod.*, **2019**, 139, 111498.
- 20 Vargas, A. C.; Loguercio, A. P.; Witt, N. M.; Costa, M. M.; Viana, L. R. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato alcóolico de própolis. *Ci. Rural*. **2004**.
- 21 Cui, H., Zhang, C., Li, C., & Lin, L. Antimicrobial mechanism of clove oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **2018**, 94, 140-146.
- 22 Adams, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, **2007**, v. 456. *Carol Stream*.
- 23 Bezerra, C.F., et al. A vanilina modula seletivamente a ação dos antibióticos contra bactérias resistentes. *Patogênese microbiana* 113, 265–268. **2017**.
- 24 Coutinho, H.D.M., et al., Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*, **2008**, 54(4): 328-330.
- 25 Javadpour, M.M., et al. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J. Appl. Microbiol.* **1996**, 84, 538–544.
- 26 Houghton, P. J., Howes, M. J., Lee, C. C., & Steventon, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J. Ethnopharmac.*, **2007**, 110(3), 391-400.
- 27 Valarezo, E.; Rosales, J.; Morocho, V.; Cartuche, L.; Guaya, D.; Ojeda-Riascos, S.; González, S. Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Baccharis obtusifolia* Kunth from Loja, Ecuador. *J. Essent. Oil.*, **2015**, 27(3), 212-216.

- 28 Stojanović-Radić, Z.; Čomić, L.; Radulović, N.; Blagojević, P.; Denić, M.; Miltojević, A.; Mihajilov-Krstev, T. Antistaphylococcal activity of *Inula helenium* L. root essential oil: eudesmane sesquiterpene lactones induce cell membrane damage. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **2012**, *31*(6), 1015-1025.
- 29 Salazar, G. J. T.; de Sousa, J. P.; Lima, C. N. F.; Lemos, I. C. S.; da Silva, A. R. P.; de Freitas, T. S.; Deschamps, C. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. *Ind. Crop. Prod.*, **2018**, *122*, 591-595.
- 30 Ferronato, R.; Marchesan, E. D.; Pezenti, E.; Bednarski, F.; Onofre, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC e *Baccharis uncinella* DC (Asteraceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2007**, *17*(2), 224-230.
- 31 Onofre, S. B.; Canton, M.; Pires, P. A. Action of Essential Oils Obtained from *Baccharis coridifolia* DC (Asteraceae-Astereae) on the Activity of Antibiotics. *Adv. Microbiol.*, **2013**, *3*(2), 166.
- 32 Silva, J. P. L.; Duarte-Almeida, J. M.; Perez, D. V.; Franco, B. D. M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. *Embrapa Solos-Artigo em periódico indexado (ALICE)*, **2010**.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas medicinais são importantes no processo de criação de novos agentes antibacterianos, considerando sua ação farmacológica decorrente da ação farmacológica isolada ou combinada de seus constituintes. Desta forma, o presente estudo realizou a análise química, atividade antibacteriana e modificadora da ação de antibióticos dos óleos essenciais de *Baccharis coridifolia* e *Baccharis reticulata* e do composto α -pineno, componente presente nas duas espécies estudadas.

A partir disto, foi possível observar que os componentes majoritários do OEBC foram o biciclogermacreno, germacreno D, E-cariofileno, enquanto os principais componentes do OEBr foram o dilapiol, α -pineno e β -pineno.

Nas análises das atividades antibacterianas dos óleos realizadas foi observada atividade frente as cepas de *S. aureus*, sendo que além da ação apresentada contra esta cepa, o OEBC também mostrou resultados contra a cepa de *P.aeruginosa*. Em relação à atividade modificadora da ação antibiótica foi possível observar que para as duas espécies testadas quando associados ao antibiótico norfloxacino, os óleos essenciais demonstraram efeito sinérgico, o que também foi possível ser observado em associações com o antibiótico gentamicina, contra cepas de *P. aeruginosa* e *E. coli*, em ambas as plantas, em que para OEBr apresentou sinergismo também contra a cepa Gram-positiva testada. Desta forma, a atividade antibacteriana destes óleos pode ser associada a sua constituição, em que os metabólitos provenientes dos óleos essenciais podem auxiliar diretamente nesta atividade. A partir da análise do composto alfa-pineno, caracterizado como um dos componentes majoritários do OEBr, também apresentou atividade antibacteriana quando associado aos antibióticos, sendo observado redução da CIM contra todas as cepas, quando associado a norfloxacino, e também foi observado sinergismo contra a cepa de *S. aureus*, quando associado a gentamicina.

Assim, futuras investigações de análises antibacterianas dos óleos essenciais das espécies de *B. coridifolia* e *B. reticulata*, bem como a avaliação da atividade dos componentes majoritários poderiam auxiliar para a comprovação do efeito modificador da atividade dos antibióticos utilizados, de forma que estes produtos possam contribuir como alternativas terapêuticas contra casos de infecções por cepas multirresistentes.

REFERÊNCIA GERAL

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Arkivoc**, 7, n. 1, p. 76-96, 2007.
- AGOSTINI, F. *et al.* Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15, n. 3, p. 215-219, 2005.
- ALBUQUERQUE, U. P. d.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16, p. 678-689, 2006.
- ÁLVAREZ, C. A. G. *et al.* Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. **Revista de la Facultad de Medicina**, 53, n. 1, p. 27-34, 2005.
- ANDRADE, M. A. *et al.* Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ANDUEZA LEAL, F. D. *et al.* Antimicrobial resistance in strains *Pseudomonas aeruginosa* isolated from termal waters at Chimborazo, Ecuador. 2015.
- ASTOLFI FILHO, S. *et al.* Bioprospecção e biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, 19, n. 38, p. 45-80, 2015.
- BADER, A. *et al.* Cytotoxicity of Some Plants of the Asteraceae Family: Antiproliferative Activity of *Psiadia punctulata* Root Sesquiterpenes. **Records of Natural Products**, 13, n. 4, p. 315, 2019.
- BADKE, M. R. *et al.* Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, 15, n. 1, p. 132-139, 2011.
- BALIBAR, C. J.; GRABOWICZ, M. Mutant alleles of *lptD* increase the permeability of *Pseudomonas aeruginosa* and define determinants of intrinsic resistance to antibiotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 60, n. 2, p. 845-854, 2016.
- BARÃO, C. F. Levantamento de espécies da família Asteraceae no município de São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil. 2016.
- BERTÃO, A. M. S.; SARIDAKIS, H. O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, 28, n. 2, p. 81-92, 2007.
- BOGO, C. A. *et al.* Comparative analysis of essential oils of *Baccharis L.*: A review. **Revista Stricto Sensu**, 1, n. 2, 2016.

- BOLZANI, V. d. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, 68, n. 1, p. 04-05, 2016.
- BRITO, A. C. L.; POZZETTI, V. C. Biodiversidade, conhecimentos tradicionais associados e repartição de benefícios. **Revista de Direitos Difusos**, 69, n. 1, p. 51-63, 2018.
- CAMPOS, F. R. *et al.* Baccharis (Asteraceae): chemical constituents and biological activities. **Chemistry & biodiversity**, 13, n. 1, p. 1-17, 2016.
- CHAABAN, A. *et al.* Insecticide activity of *Baccharis dracunculifolia* essential oil against *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Natural product research**, 32, n. 24, p. 2954-2958, 2018.
- CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging infectious diseases**, 7, n. 2, p. 178, 2001.
- CHENG, M. P. *et al.* Back to the future: penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. **The American journal of medicine**, 129, n. 12, p. 1331-1333, 2016.
- CHOUHAN, S. *et al.* Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. **Medicines**, 4, n. 3, p. 58, 2017.
- CLARK, C. G. *et al.* Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. **Journal of microbiological methods**, 94, n. 3, p. 180-191, 2013.
- CROXEN, M. A. *et al.* Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, 26, n. 4, p. 822-880, 2013.
- DAVIS, J. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*. **Internal medicine journal**, 35, p. S79-S96, 2005.
- DE OLIVEIRA-LIMA, J. *et al.* Effects of Ingested *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) Extract in the Liver of *Prochilodus lineatus* Fish. **Microscopy Research**, 7, n. 3, p. 27-38, 2019.
- DE SOUZA, L. F. *et al.* Avaliação da Atividade Bacteriostática de Carvão Ativado Impregnado com Prata Frente à Bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Processos Químicos**, 13, n. 25, p. 71-78, 2019.
- DELEO, F. R.; CHAMBERS, H. F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. **The Journal of clinical investigation**, 119, n. 9, p. 2464-2474, 2009.
- DEMO, M. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. **Pharmaceutical biology**, 43, n. 2, p. 129-134, 2005.

DINIZ, A. M. M.; SANTOS, R. M. C. *Escherichia coli* resistant Ciprofloxacin in hospitalized patients in University Hospital. 2017.

ELIAS, G. A. *et al.* Biodiversidade vegetal em Santa Catarina. 2017.

ESTEPA, V. *et al.* Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital español. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 35, n. 3, p. 141-147, 2017.

FIGUEIREDO, A. C. *et al.* Voláteis e óleos essenciais. **Parte I/II. Agrotec**, 24, p. 14-17, 2017.

FONSECA, M. C. M. *et al.* Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 17, n. 1, p. 45-50, 2015.

FRANCO, A. L. P. *et al.* Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc.(Alfazema), *Ocimum gratissimum* L.(Alfavaca-Cravo) e *Curcuma longa* L.(Açafrão). 2007.

FUNARI, C. S. d.; FERRO, V. d. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista brasileira de Farmacognosia**, 15, n. 2, p. 178-182, 2005.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, A. M. *et al.* Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. **Revista española de quimioterapia**, 24, n. 2, 2011.

GARCÍA, M. M. Betalactamasas de espectro extendido. **Revista cubana de medicina**, 52, n. 4, p. 272-280, 2013.

GARDNER, S. G. *et al.* Metabolic mitigation of *Staphylococcus aureus* vancomycin intermediate-level susceptibility. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 62, n. 1, p. e01608-01617, 2018.

GÜNEŞ, A. *et al.* Determination of antioxidant enzyme activity and phenolic contents of some species of the Asteraceae family from medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, 137, p. 208-213, 2019.

HAMILTON, S. M. *et al.* High-level resistance of *Staphylococcus aureus* to β -lactam antibiotics mediated by penicillin-binding protein 4 (PBP4). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 61, n. 6, p. e02727-02716, 2017.

HAMMERSCHMITT, M. E. *et al.* Intoxicação espontânea por *Baccharis coridifolia* em cordeiros lactentes. **Acta scientiae veterinariae. Porto Alegre, RS. Vol. 46, supl. 1 (2018), Pub. 316, 5 p.**, 2018.

HARKINS, C. P. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome biology**, 18, n. 1, p. 130, 2017.

HEIDEN, G. *et al.* *Baccharis magnifica* (Asteraceae, Astereae): a striking new species endemic to the summits of Serra do Caparaó, southeastern Brazil. **Phytotaxa**, 162, n. 4, p. 211-216, 2014.

HUNZIKER, J. H. *et al.* Permanent translocation heterozygosity in dioecious *Baccharis coridifolia* DC.(Asteraceae). **Hereditas**, 137, n. 2, p. 132-139, 2002.

HÜSNÜ, K. *et al.* Chemistry of essential oils. In: **Flavours and Fragrances**: Springer, 2007. p. 43-86.

IONETE, O. M. *et al.* Susceptibility to ciprofloxacin of *Escherichia coli* strains isolated from patients with chronic kidney disease. **BMC infectious diseases**, 14, n. 7, p. P67, 2014.

IWATSUKI, K. *et al.* Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of dermatological science**, 42, n. 3, p. 203-214, 2006.

JORGE, H. G. M. *et al.* RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA POR EXTEND SPECTRUM BETALACTAMASES (ESBLS) EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE COELHOS. **Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753)**, 2, n. 3, 2014.

KAPER, J. B. *et al.* Pathogenic *escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

LAGOA, R.; RODRIGUES, J. R. Biodiversidade, as Biotecnologias e a procura de uma nova Bioeconomia. **Guia pedagógico da Floresta**, p. 7-18, 2016.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical microbiology reviews**, 31, n. 4, p. e00020-00018, 2018.

LEE, A. S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature reviews Disease primers**, 4, n. 1, p. 1-23, 2018.

LI, X.-Z. *et al.* The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical microbiology reviews**, 28, n. 2, p. 337-418, 2015.

LIMA, A. E. F. *et al.* Rendimento, caracterização química e antibacteriana do óleo essencial de capim limão coletado em diferentes horários. **Magistra**, 28, n. 3/4, p. 369-378, 2017.

LIMA, M. F. P. *et al.* *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares–Revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, 21, n. 1, 2015.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Carbapenemases: a problem in waiting? **Current opinion in microbiology**, 3, n. 5, p. 489-495, 2000.

LONNI, A. A. *et al.* Differentiation of species of the *Baccharis* genus by HPLC and chemometric methods. **Analytical sciences**, 19, n. 7, p. 1013-1017, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002. 8586714186.

LOUREIRO, R. J. *et al.* O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MAMISUKA, E. Projeto de resistência microbiana em serviços de saúde, *Staphylococcus*. **Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, ANVISA**, 2005.

MANION, C. R.; WIDDER, R. M. Essentials of essential oils. **American Journal of Health-System Pharmacy**, 74, n. 9, p. e153-e162, 2017.

MARTINEZ-CORREA, H. A. *et al.* Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO₂, ethanol and water. **The Journal of Supercritical Fluids**, 63, p. 31-39, 2012.

MCGUINNESS, W. A. *et al.* Focus: infectious diseases: vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Yale journal of biology and medicine**, 90, n. 2, p. 269, 2017.

MENDES, R. *et al.* Update of the activity of telavancin against a global collection of *Staphylococcus aureus* causing bacteremia, including endocarditis (2011–2014). **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 36, n. 6, p. 1013-1017, 2017.

MENG, J. *et al.* Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: **Food Microbiology**: American Society of Microbiology, 2013. p. 287-309.

MÉRIC, G. *et al.* From Escherich to the *Escherichia coli* genome. **The Lancet Infectious Diseases**, 16, n. 6, p. 634-636, 2016.

MIMICA, M. J.; BEREZIN, E. N. *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina: um problema emergente. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, 51, n. 2, p. 52-56, 2018.

MIRANDA, C. A. S. F. *et al.* Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agrônômica**, 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

MONGELLI, E. *et al.* In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. **Journal of ethnopharmacology**, 58, n. 3, p. 157-163, 1997.

MOSQUITO, S. *et al.* Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. **Revista peruana de medicina experimental y salud publica**, 28, p. 648-656, 2011.

MOUSSALLEM, B. C. *et al.* Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus spp.* isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, 2, n. 2, p. 02-09, 2007.

MÜLLER, J. The Alate Species of *Baccharis* (Compositae-Astereae) of the North Andes. **Systematic Botany**, 39, n. 3, p. 980-987, 2014.

NASCIMENTO, A. M.; SAND, S. T. V. D. O uso de PCR na detecção de *Escherichia coli* enterotoxigênica em amostras de água de esgoto. **Acta Scientiae Veterinariae**, 35, n. 2, p. 181-188, 2007.

OKOH, O. *et al.* Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food chemistry**, 120, n. 1, p. 308-312, 2010.

OLIVA, C. *et al.* Diarréia aguda grave associada à *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC): características clínicas e perdas fecais em lactentes hospitalizados. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43, n. 4, p. 283-289, 1997.

ONOFRE, S. B. *et al.* Action of Essential Oils Obtained from *Baccharis coridifolia* DC (Asteraceae-Astereae) on the Activity of Antibiotics. 2013.

OZEROL, I. H. *et al.* The prevalence and molecular typing of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic stools in Malatya, Turkey. **The new microbiologica**, 28, n. 3, p. 237-243, 2005.

PAROUL, N. *et al.* Composição química e atividade antioxidante de *Baccharis trimera* PERS e *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Revista perspectiva**, 40, n. 151, p. 55-64, 2016.

PEACOCK, S. J.; PATERSON, G. K. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual review of biochemistry**, 84, 2015.

PEGORINI, F. *et al.* Organização estrutural das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **Rev. Bras. Farm**, 89, p. 3, 2008.

PEREIRA, A. d. A. *et al.* Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, 32, n. 3, p. 887-893, 2008.

PÉREZ-CANO, H. J.; ROBLES-CONTRERAS, A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. **Revista médica MD**, 4, n. 3, p. 187-192, 2013.

PÉREZ, R. O. *et al.* Sepsis neonatal temprana, incidencia y factores de riesgo asociados en un hospital público del occidente de México. **Revista chilena de infectología**, 32, n. 4, p. 447-452, 2015.

PIMENTEL, V. P. *et al.* Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? 2015.

- POMBO, J. C. P. *et al.* Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar e Nutricional**, 25, n. 2, p. 108-117, 2018.
- PUTAROV, N. B.; GALENDE, S. B. Estudo da relação estrutura química e atividade farmacológica dos antibióticos. **REVISTA UNINGÁ**, 30, n. 1, 2011.
- REMPEL, C. *et al.* Efeito antimicrobiano de plantas medicinais: uma revisão de estudos científicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, 10, n. 4, p. 57-82, 2019.
- RIBEIRO, S. M. *et al.* Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton* spp. da Caatinga. **Iheringia. Série Botânica.**, 73, n. 1, p. 31-38, 2018.
- ROCHA, J. G. *et al.* Bioprospecção no cerrado: fitoquímica foliar de *Justicia Nodicaulis* (Nees) Leonard (Acanthaceae) ocorrente em cerrado goiano. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, 8, n. 2, p. 198-205, 2019.
- ROSA, J. L. R. L. *et al.* Características da escherichia coli enterohemorrágica (EHEC). **Saúde & Ciência em Ação**, 2, n. 1, p. 66-78, 2016.
- ROSANOVA, M. T. *et al.* Epidemiological features and risk factors for mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in children. **Arch Argent Pediatr**, 117, n. 2, p. 128-131, 2019.
- SANTOS, A. L. d. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- SANTOS, I. d. A. L. *et al.* Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. 2015.
- SHAHEEN, H. I. *et al.* Phenotypic profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with early childhood diarrhea in rural Egypt. **Journal of clinical microbiology**, 42, n. 12, p. 5588-5595, 2004.
- SHARMA, G. *et al.* *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. **Journal of applied microbiology**, 121, n. 2, p. 309-319, 2016.
- SHER, A. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. **Gomal Journal of Medical Sciences**, 7, n. 1, 2009.
- SHITAN, N. Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 80, n. 7, p. 1283-1293, 2016.
- SIEVERT, D. M. *et al.* Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. **Clinical Infectious Diseases**, 46, n. 5, p. 668-674, 2008.

SILVA, J. A.; DA SILVA, W. D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, 34, n. 3, 2005.

SILVA, N.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal of venomous Animals and Toxins including tropical diseases**, 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, 4, n. 3, p. 223-229, 2013.

SOUZA, A. *et al.* Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica. **Rev. Bras. Pl. Med.[Internet]**, p. 105-112, 2016.

STOVER, C. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, 406, n. 6799, p. 959, 2000.

TAPIA, A. *et al.* Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. **Journal of ethnopharmacology**, 95, n. 2-3, p. 155-161, 2004.

TELES, A. M. **ASTERACEAE *Baccharis reticulata* (Ruiz & Pav.) Pers.** Lista de Espécies da Flora do Brasil, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=3234202> Acesso em: 09/05/2020.

TINTINO, S. R. *et al.* Vitamin K enhances the effect of antibiotics inhibiting the efflux pumps of *Staphylococcus aureus* strains. **Medicinal Chemistry Research**, 27, n. 1, p. 261-267, 2018.

TOGNON, G. B.; CUQUEL, F. L. Potencial ornamental de *Baccharis milleflora* e *Baccharis tridentata* como folhagem de corte. **Ciência Rural**, 46, n. 1, p. 70-75, 2016.

TONG, S. Y. *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**, 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

VEIGA, R. *et al.* Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, 122, n. 4, p. 911-920, 2017.

VELÁZQUEZ, A. M. *et al.* Assessment of General effects and gastrointestinal prokinetic activity of *Baccharis crispa* in mice. **Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol**, 7, n. 02, p. 30-34, 2019.

VERDI, L. G. *et al.* Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VOOR, A. F. *et al.* A systematic review and meta-analyses show that carbapenem use and medical devices are the leading risk factors for carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 58, n. 5, p. 2626-2637, 2014.

VUONG, C. *et al.* Investigational drugs to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Expert opinion on investigational drugs**, 25, n. 1, p. 73-93, 2016.

YOKO SUZUKI, É. *et al.* Antimicrobial activity of essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC.(carqueja-amarga). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, 21, n. 3, p. 346-358, 2017.