



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA E
RECURSOS NATURAIS - PPGDR

RAIMUNDO LUIZ SILVA PEREIRA

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Vitex gardneriana* SCHAUER: EFEITOS DA
SAZONALIDADE NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO
ESPECTROSCÓPICA E NA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA CONTRA CEPAS
BACTERIANAS**

CRATO-CE

2021

RAIMUNDO LUIZ SILVA PEREIRA

ÓLEO ESSENCIAL DE *Vitex gardneriana* Schauer: EFEITOS DA SAZONALIDADE NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E NA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA CONTRA CEPAS BACTERIANAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Co-orientadores: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho e Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos

CRATO - CE

2021

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

Pereira, Raimundo Luiz Silva.

P436o Óleo essencial de *Vitex gardneriana schauer*: efeitos da sazonalidade na composição química, caracterização espectroscópica e na atividade antibacteriana contra cepas bacterianas/ Raimundo Luiz Silva Pereira. – Crato - CE, 2021

74p.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Recursos Naturais da Universidade Regional do Cariri – URCA

Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Co-orientadores: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho e Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos

1. Infravermelho, 2. Produto natural, 3. Efeito modulador;
I. Título.

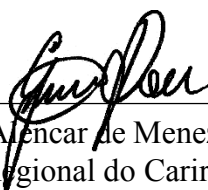
CDD: 615.32

RAIMUNDO LUIZ SILVA PEREIRA

ÓLEO ESSENCIAL DE *Vitex gardneriana* SCHAUER: EFEITOS DA SAZONALIDADE NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E NA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA CONTRA CEPAS BACTERIANAS. Dissertação do Mestrado em Diversidade Biológica e Recursos Naturais apresentada na Universidade Regional do Cariri – URCA, para obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica e Recursos Naturais.

APROVADO (A) EM: 28/07/2021

BANCA EXAMINADORA



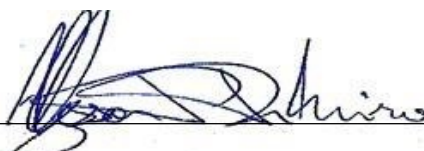
Prof^o. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (**Orientador**)
Universidade Regional do Cariri - URCA



Prof^o. Dr. Luiz Marivando Barros (**Avaliador Interno**)
Universidade Regional do Cariri - URCA



Prof^a. Dra. Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro (**Avaliadora Externa**)
Universidade Federal do Cariri – UFCA



Prof. Dr. Allysson Pontes Pinheiro (**Suplente Interno**)
Universidade Regional do Cariri – URCA



Prof^a. Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga (**Suplente Externa**)
Universidade Regional do Cariri - URCA

“Tenho certeza que você vai colher tudo o que tem plantado. Coisas boas chegarão e o mundo vai dar voltas e trazer aquilo que você realmente precisa”

Victor Fernandes

AGRADECIMENTOS

Á Deus por ser meu porto seguro, pois minha alma tem sede de ti ó meu deus minha alma suspira por ti.

Aos progenitores da minha vida, os que me ensinaram a ser humilde, bondoso, carinhoso, e que me educaram como puderam são eles: Maria Geneci Silva Pereira e Luiz Antônio Gomes Pereira que amo tanto e que me fazem querer procurar conhecimento mais e mais, e minha irmã Vaneuza que me ensina da sua forma como ser forte.

A minha Tia Geane que sempre esteve comigo, me dando conselhos, me acolhendo, gerenciando minha vida, sendo uma segunda mãe. Obrigado por sempre me apoiar e me dizer o caminho certo a seguir, pois sem suas intervenções eu não teria chegado hoje onde estou.

Aos meus familiares: Janyelle, Jucimar, Marinalva por não me deixarem estudar nas horas vagas sempre me chamando pra sair, sem me deixar enlouquecer de estudar.

Ao meu amigo Judson por me ajudar na minha formação por ser meu pilar, minha base, de referência estudantil, por me ajudar nas dificuldades, sempre me apoiando obrigado amigo você e sua sempre terá um lugar especial em meu coração. Esse mestrado tem forte intervenção de vocês. Ao meu amigo Igor por tudo mesmo, por me ajudar a estudar um novo idioma, a organizar minha vida financeira, pelos concelhos e tudo mais. Também digo obrigado a Cícero por sempre esta comigo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira pela oportunidade de fazer parte da sua equipe de trabalho, pelos ensinamentos, atenção, confiança e incentivo durante esses anos. Agradeço ao Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes por me aceitar ser orientando, obrigado professor você é exemplo de pesquisador. Ao Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho pela amizade, conhecimento, artigos, trabalhos laboratoriais, por ter me formado um profissional sem medo de trabalhar, e agradeço a sua esposa Debora que me ajudou, me deu forças, me encorajou, me fortaleceu, eu tenho a afeto por ela.

Aos coordenadores do LMBM por terem me mantido no mestrado Janaiana, Thiago (opressor e amigão), Yedda, Jacqueline, Saulo. Agradeço aos membros do laboratório: Socorro, Fabia, Neto, Carol (minha eterna doutoranda), Priscila, Ray, Eduardo, Anésia, Milena, Raquel..

A FUNCAP e a URCA pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

I am happy to have met all those who will help me on my journey.

My thanks to everyone: A todos meu muito obrigada

RESUMO

O uso indiscriminado de antibióticos tem aumentado o desenvolvimento de mecanismos de resistência de micro-organismos. Assim, a busca por compostos ativos para essas atividades aumentou e, nesse contexto os óleos essenciais têm sido uma alternativa promissora devido as mais diversas atividades biológicas que lhe são atribuídas como antivirais, inseticidas, antiparasitárias, antioxidantes e antibacterianas. Este estudo foi realizado para investigar os efeitos da sazonalidade na composição química, nos espectros espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier de refletância total atenuada (ATR-FTIR) e na atividade antibacteriana e modificadora da ação antibiótica de óleos essenciais das folhas de *Vitex gardneriana* Schauer. Os óleos essenciais foram extraídos das folhas de *Vitex gardneriana* Schauer no período sazonal de janeiro a dezembro de 2016 e caracterizados espectroscopicamente pela técnica FTIR-ATR. Os ensaios microbiológicos foram realizados por microdiluição em caldo, sendo determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e avaliado o efeito modificador da ação antibiótica. Pela primeira vez são mostrados espectros de absorvância FTIR-ATR desses óleos essenciais, bem como a influência da sazonalidade sobre os mesmos. A principal influência da sazonalidade nos espectros FTIR-ATR dos óleos essenciais de *Vitex gardneriana* ocorreu no mês de junho (último mês da estação chuvosa). Os principais componentes químicos foram o composto 6,9-guaiadieno que apresenta as maiores concentrações nos meses de outubro (30,15%), janeiro (28,86%) e fevereiro (22,73%), o *cis*-calameneno apresentando as maiores concentrações nos meses dezembro (35,62%), abril (34,92%), Novembro (34,63%) e março (33,57%), e o óxido de cariofileno com maiores concentrações em setembro (16,68%), janeiro (15,06%) e agosto (14,39%). Os óleos extraídos de *Vitex gardneriana* possuem CIM de 1024 μ g / mL para *Staphylococcus aureus* 10, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Escherichia coli* 06. Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cada mês apresentou uma concentração inibitória. Efeitos sinérgicos foram observados para os óleos essenciais associados aos antibióticos testados (gentamicina, ampicilina e ofloxacina). A caracterização sazonal pela espectroscopia (FTIR -ATR) permitiu obter os espectros de absorvância dos óleos essenciais das folhas de *Vitex gardneriana*. Os óleos essenciais das folhas de *Vitex gardneriana* não apresentaram efeito direto nas cepas testadas exceto para *Staphylococcus aureus* 25923. Entretanto, foi observado o efeito sinérgico da ação modificadora dos antibióticos, com os meses do período sazonal.

Palavras-Chave: Infravermelho, produto natural, efeito modulador

ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics has increased the development of microorganism resistance mechanisms. Thus, the search for efficient compounds for these activities has increased. In this context, essential oils have been a promising alternative due to the most diverse biological activities attributed to them as antivirals, insecticides, antiparasitics, antioxidants, and antimicrobials. This study was carried out to investigate the effects of seasonality on chemical composition, FTIR-ATR spectra, and the antibacterial and modifying activity of the antibiotic action of essential oils from the leaves of *Vitex gardneriana* Schauer. The essential oils were extracted from *Vitex gardneriana* Schauer in the seasonal period from January to December 2016 and spectroscopically characterized by the FTIR-ATR technique. The antibacterial effect of these oils and the modifying activity of the antibiotic action were performed by microdilution in broth, and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined. For the first time, FTIR-ATR absorbance spectra of these essential oils are shown and the influence of seasonality on them. The main influence of seasonality on the FTIR-ATR spectra of essential oils of *Vitex gardneriana* occurred in June (the last month of the rainy season). The main chemical components identified the compound 6,9-guaiadiene, which presents the highest concentrations in the months of October (30.15%), January (28.86%), and February (22.73%), the *cis*-calamenene presenting the highest concentrations in December (35.62%), April (34.92%), November (34.63%) and March (33.57%), and caryophyllene oxide with highest concentrations in September (16.68 %), January (15.06%) and August (14.39%). The oils extracted from *Vitex gardneriana* have MICs of 1024 μ g / mL for *Staphylococcus aureus* 10, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 06. For *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, the oils showed variations in the observed inhibitory concentrations. Synergistic effects were observed for essential oils associated with the tested antibiotics (gentamicin, ampicillin, and ofloxacin). Seasonal characterization by spectroscopy (FTIR -ATR) allowed us to obtain the absorbance spectra of essential oils from *Vitex gardneriana* leaves. The essential oils from the leaves of *Vitex gardneriana* had no direct effect on the strains tested, except for *Staphylococcus aureus* 25923. However, when associated with antibiotics, they showed variations in the minimum inhibitory concentration with the months of the seasonal period, indicating synergistic effects against the bacterial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Infrared, natural product, modulating effect

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
SUMÁRIO.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS	ix
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Biodiversidade e o Uso de Recursos Naturais	18
3.2 Plantas Medicinais e seu Metabolismo Secundário	19
3.3 O Uso dos Óleos Essenciais	20
3.4 Variações da Sazonalidade em Óleos Essenciais	21
3.5 O Gênero <i>Vitex</i>	23
3.6 <i>Vitex gardneriana</i> Schauer	24
3.7 Mecanismos de Resistência e Bactérias	25
3.7.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	27
3.7.2 <i>Escherichia coli</i>	29
3.8 Espectroscopia no Infravermelho	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Material Vegetal	32
4.2 Extração de Óleos Essenciais.....	32

4.3 Medições ATR - FTIR e Cálculos DFT	32
4.4 Micro-organismos.....	33
4.5 Drogas e Reagentes.....	33
4.6 Concentração Inibitória Mínima	33
4.7 Atividade Potencializadora de Antibióticos	34
4.8 Análise Estatística.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
SEÇÃO 1: ARTIGO ORIGINAL DA DISSERTAÇÃO	36
1 Introduction	37
2 Materials and Methods	38
2.1 Plant Material	38
2.2 Extraction of Essential Oils	38
2.3 ATR- FTIR Measurements and DFT Calculations	38
2.4 Microorganisms	38
2.5 Drugs and Reagents.....	38
2.6 Minimum Inhibitory Concentration.....	38
2.7 Antibiotic Potentiating Activity.....	39
2.8 Statistical Analysis.....	39
3 Results and Discussion	39
4 Conclusion.....	43
5 References	44
SEÇÃO 2:CAPITULO DE LIVRO ORININAL DA DISSERTAÇÃO	46
1 INTRODUÇÃO	48
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 Material vegetal	50
2.2 Obtenção dos óleos essenciais.....	50

2.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa(CG-EM).....	50
2.4 Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas (CG-DIC).	50
2.5 Caracterização Espectroscópica por ATR-FTIR.....	51
2.6 Testes Microbiológicos e Análises Estatísticas.....	51
2.6.1 Concentração inibitória mínima (MIC)	51
2.6.2 Potencialização da atividade antimicrobiana.....	51
2.7 Análise estatística.....	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
3.1 Composição Química.....	52
3.2 Análise do espectro infravermelho	53
3.3 Concentração inibitória mínima	55
3.4 Efeito da modificação antibiótica.....	55
4 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	57
6. DISCUSSÃO GERAL.....	60
7. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	62
8. CONCLUSÃO.....	63
9. ANEXO A: COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DE ARTIGO ORIGINAL DA DISSERTAÇÃO	64
10. ANEXO B: COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DE CAPÍTULO DE LIVRO ORIGINAL DA DISSERTAÇÃO.....	65
REFERÊNCIAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Localização e mecanismo em células bacterianas de ação para óleos essenciais.....	21
Figura 2:	Fatores que podem afetar a composição química dos óleos essenciais em vegetais.....	22
Figura 3:	Mecanismos bacterianos mais comuns que resultam em resistência antimicrobiana.....	27

Artigo original da dissertação

Figure 1.	The main chemical constituents of the essential oil from the leaves of <i>Vitex gardneriana</i>	39
Figure 2.	Infrared absorbance spectra of essential oils from the of <i>Vitex gardneriana</i> leaves.....	40
Figure 3.	Modifying effect of the antibiotic action of the essential oils from <i>Vitex gardneriana</i> from January to December against multidrug-resistant strains of <i>Staphylococcus aureus</i> 10 in association with the antibiotic Ofloxacin (A), Gentamicin (B) and Ampicillin (C).....	43
Figure 4.	Modifying effect of the antibiotic action of the essential oils from <i>V. gardneriana</i> from January to December against multidrug-resistant strains of <i>E. coli</i> 06 in association with the antibiotic Ofloxacin (A), Gentamicin (B) and Ampicillin (C).....	44

Capítulo de livro original da dissertação

Figura 1-	<i>Vitex gardneriana</i>	49
Figura 2-	Constituintes majoritários do óleo essencial das folhas de <i>Vitex gardneriana</i>	53
Figura 3-	Espectro experimental de absorvância no infravermelho do óleo essencial das folhas da <i>Vitex gardneriana</i>	53
Figura 4-	Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos orfloxacina, gentamicina, e ampicilina na presença e na ausência do óleo essencial de <i>Vitex gardneriana</i> , em uma concentração subinibitória, frente a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> 10 e <i>Escherichia coli</i> 06.....	55

LISTA DE TABELAS

Artigo original da dissertação

Table 1. Percentual of the three higher concentrations of the three main components of essential oil from the <i>Vitex gardneriana</i> leaves.....	39
Table 2. Experimental wavenumbers (cm^{-1}) and normalized absorbance intensity (in arbitrary units) of the infrared spectra of essential oils from <i>Vitex gardneriana</i> Schauer leaves in the sea-seasonal period from January to December 2016, and assignment of their vibrational modes.....	41
Table 3. Seasonal variation of the minimum inhibitory concentration against the standard and multidrug-resistant bacterial strains.....	43

Capítulo de livro original da dissertação

Tabela 1- Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Vitex gardneriana</i>	52
Tabela 2- Algumas bandas do espectro infravermelho do óleo essencial de <i>Vitex gardneriana</i> Schauer com a respectiva atribuição dos modos vibracionais.....	54
Tabela 3- Resultado das concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial das folhas de <i>Vitex gardneriana</i> – OEFVG, frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Staphylococcus aureus</i> 10, <i>Escherichia coli</i> 06.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI - *Brain Heart Infusion*

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DMSO - Dimetilsulfóxido

E.C - *Escherichia coli*

FTIR-ATR - *Fourier transform infrared spectroscopy by attenuated total reflectance*

GC-FID - *Gas Chromatography with Flame Detection Analysis*

GC-MS - *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*

HIA - *Heart Infusion Agar*

MIC - *Minimum Inhibitory Concentration*

NIRS - *Near Infrared Reflectance Spectroscopy*

OEFVG - Óleo essencial das folhas de *V. gardneriana*

S.A - *Staphylococcus aureus*

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

< - menor que

> - maior que

≥ - maior ou igual que

® - Marca registrada

C - carbono

mL - mililitro

°C - graus Celsius

UFC/mL - unidade formadora de colônias por mililitros

µg – microgramas

µg/mL - microgramas de soluto por mililitro de solvente

ml- microlitro

cm⁻¹ - centímetros

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana é um grande problema de saúde pública e é favorecida pelo uso indiscriminado em grande escala, das mais variadas classes de antibióticos disponíveis, principalmente para combater Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde- IRAS, uma realidade muito prevalente nos serviços de saúde brasileiros (BRASIL, 2017). Existem portanto alguns fatores que mostram como o fator resistência pode ocorrer, sendo eles: diminuição da permeabilidade da droga, formação de biofilme reduzindo a suscetibilidade à atividade antibiótica, bombas de efluxo ativa dentre outros mecanismos (ALI; RAFIQ; RATCLIFFE, 2018).

Tendo por finalidade tratar distintas doenças, há milhares de anos atrás, as civilizações pioneiras já faziam uso dos produtos naturais. Existem duas vias responsáveis pela diversidade de compostos químicos produzidos pelas plantas, são elas a via dos metabólitos primários e secundários (MONTEIRO *et al.*, 2015). O metabolismo primário inclui compostos e reações químicas responsáveis pelos mecanismos vitais e essenciais para a planta, como fotossíntese, respiração, absorção e assimilação de água e nutrientes. Já o secundário, por sua vez, emprega moléculas geradas no metabolismo primário para a produção de uma gama de outros compostos que estão envolvidos no aumento da capacidade das plantas se adaptarem as condições ambientais, especialmente moléculas para responder a pressão dos efeitos bióticos e abióticos característicos dos ambientes selvagens (CARDOSO; DE OLIVEIRA; CARDOSO, 2019). Dentes esse compostos secundários pode destacar três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos (TIWARI; RANA, 2015).

Segundo Morais *et al.*, (2005), das plantas em geral pode ser extraído os óleos essenciais, substâncias lipofílicas, de odor agradável, voláteis e de baixo peso molecular cujo fatores como ambientais e genéticos podem influenciar diretamente na diversidade da sua composição química. Apresentando um amplo espectro de propriedades medicinais, os óleos essenciais de acordo com Raut e Karuppayil (2014), podem apresentar atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiprotzoária, possuem propriedades capazes de prevenir o desenvolvimento de câncer e demais mutações genéticas, apresentam potencial

antidiabético, podendo ainda exercer atividade anti-inflamatória. Devido suas propriedades aromáticas e terapêuticas, os óleos essenciais constituem o maior grupo de “agro-produtos” da indústria, sendo utilizados na produção de alimentos e bebidas, perfumes, cosméticos e na área farmacêutica (DJILANI; DICKO, 2012). De acordo com Pierozan *et al* (2009), óleos essenciais, em baixas concentrações, extraídos de algumas espécies de plantas, tem ação similar aos antibióticos, uma vez que conseguem inibir patógenos como: *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, *Mycobacterium* sp e *Escherichia coli* (*E. coli*).

Vitex gardneriana Schauer, popularmente conhecida como “jaramataia”, é uma espécie da família Lamiaceae, do Gênero *Vitex* endêmica do Brasil, com distribuição geográfica confirmadas no Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe) e domínio fitogeográficos (Caatinga). Forma de vida: arbusto árvore substrato: terrícola (REFLORA, 2020). Existe pouca informação sobre suas atividades biológicas, entretanto seu potencial antimicrobiano, anticolinesterásico, moluscicida, larvicida contra as larvas de *Aedes aegypti* e antifúngica já foram relatadas. No que diz respeito a aspectos etnobiológicos, a espécie é descrita para fins patológicos, como por exemplo: verminose, gripe, estalícido, gases, dor de barriga, sinusite, inflamação na próstata (ROQUE, 2009) e ainda para dor nos ossos, problemas nos rins, problema na coluna, calmante, dentre outros (ANDRADE *et al.*, 2012).

Propriedades biológicas estão intimamente ligadas a variabilidade e diversidade estrutural da composição química, neste sentido, o desenvolvimento de métodos que permita conhecer as propriedades estruturais, vibracionais são essenciais para entender seus potenciais biológicos. Estudo de espectroscopia vibracional de substâncias ativas extraídas de plantas medicinais (BERNARDINO *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2017) e de compostos sintéticos (CAMPELO *et al.*, 2017) tem sido essencial para fornecer informações detalhadas sobre suas propriedades estruturais e vibracionais. E nesse sentido, no que diz respeito a espectroscopia vibracional, óleos essenciais são misturas complexas de numerosas moléculas e suas características espectrais, o resultado de um sinergismo de todos os seus constituintes químicos (TEIXEIRA *et al.*, 2018).

Este trabalho estruturasse em inicial com um manuscrito desta dissertação em seguida ainda com os dados obtidos, um capítulo de livro foi publicado em seguida. Servindo estes resultados na pesquisa científica para melhoramento das técnicas utilizadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos da sazonalidade na: composição química do óleo essencial das folhas de *Vitex gardneriana*, como na atividade antibacteriana e modificação da ação antibiótica contra cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, além da obtenção dos espectros FTIR-ATR dos óleos essenciais.

2.2 Específicos

- Realizar análise da composição química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia gasosa com detecção de chama (GC – FID);
- Obter a caracterização espectroscópica dos 12 óleos obtida nos meses do ano;
- Analisar o efeito da sazonalidade nos espectros;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM);
- Observar o efeito da modificação antibiótica dos óleos em relação aos antibióticos testados;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biodiversidade e o Uso de Recursos Naturais

A biodiversidade ou diversidade biológica incide na multiplicidade de organismos no planeta e de suas complexas relações ecológicas que ocorrem entre as comunidades, ou seja, entre os diferentes seres vivos e deles com o ambiente. A biodiversidade disponibiliza de seus serviços ambientais para os seres humanos, e a partir dessa conservação e funcionamento dessas interações, do homem com o meio ambiente a sociedade obtém os suprimentos, energia e outros produtos e serviços que necessitam que contribuam para o desenvolvimento econômico e social do planeta (ALMEIDA, 2020).

Como um dos países mega diversos, o Brasil tem responsabilidade destacada em relação ao seu conhecimento, ao uso e à conservação da biodiversidade, considerando os valores intrínsecos da vida, os serviços ecossistêmicos associados e sua relação com as perspectivas de bem-estar social, e as oportunidades de elevar o desenvolvimento econômico sustentável utilizando esses conhecimentos (RIBEIRO *et al.*, 2019). A importância de forma global da conservação da biodiversidade soma-se a relevância do Brasil, pois, o país hospeda entre 15-20% da diversidade biológica mundial que se encontra entre as 17 nações que abriga cerca de 70% da biodiversidade total do planeta (DIAS *et al.*, 2017).

Um comparativo quanto aos pedidos de patentes no Brasil relacionados à biodiversidade e suas aplicações na biotecnologia, possibilita nos mostrar os diferentes usos e espécies vegetais que são envolvidas em processos de desenvolvimento em formulações farmacêuticas, compósitos, emulsões, entre outras (ROSA;SABONARO, 2020).

O uso de extratos e compostos bioativos provenientes de plantas com uso medicinal e terapêutico apresenta ampla aplicação em diferentes setores da economia. Dentre as propriedades encontradas, destacam-se os princípios ativos que tem possibilidade de serem utilizados na formulação de produtos relacionados a algumas respostas farmacológicas como: anti-inflamatórias, cicatrização de feridas, dores, doenças parasitárias, inflamações, anemias, antibacterianas dentre outras (EFFERTH *et al.*, 2021; PEDROLLO *et al.*, 2016; SILVA; OLIVEIRA, 2017).

3.2 Plantas Medicinais e seu Metabolismo Secundário

A utilização de plantas com interesses terapêuticos é comprovada desde tempos remotos, sendo constituída como uma prática comum entre os seres humanos, particularmente em comunidades do âmbito rural, onde a população tem maior contato com a natureza e o conhecimento a cerca do uso medicinal de forma empírica, para tratamento de sintomas primários de determinadas enfermidades e isso é passado de geração a geração esse conhecimento. Porém, é de suma importância que as pesquisas científicas possam analisar as propriedades, capacidade terapêutica, forma, manuseio, e toxicidade de determinadas espécies vegetais, pois através destas análises a funcionalidade e praticidade desses produtos naturais poderão ser compreendidas, servindo de métodos alternativos e com recomendações científicas no tratamento de algumas patologias (GOMES *et al.*, 2018; REMPEL, *et al.*, 2019).

O uso terapêutico das plantas medicinais é considerado eficaz no tratamento e na cura de várias doenças. Sobre está eficácia, algumas destas plantas medicinais como, por exemplo: *Melissa officinalis* (erva-cidreira); *Cymbopogon citratus* (capim santo); *Mentha spicata* (hortelã); *Anethum graveolens* (Endro); *Ricinus communis* (Mamona), com o decorrer tempo e varias pesquisas, passaram a ganhar credibilidade devido aos seus resultados imediatos (CAVALCANTE; ANDRADE; LIMA, 2020).

Diante dessa prática de utilização, as pessoas buscam na flora, espécies que apresentem cunho terapêutico. Nas últimas décadas, vem ocorrendo um aumento significativo na procura pelas terapias alternativas e produtos oriundos de forma natural. No Brasil, muitos estudos como, por exemplo, os toxicológicos têm buscado a comprovação das atividades biológicas dessas plantas de caráter medicinal. A avaliação desses recursos busca quantificar e qualificar as substâncias presentes na planta, e verificar a sua toxicidade nos organismos vivos (ZARDO *et al* 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

São sintetizados por via do metabolismo secundário das plantas, compostos orgânicos voláteis que podem ser encontrados em diversas partes dos vegetais, formando uma variedade de moléculas químicas, que podem chegar á apresentarem potencial relevante em relação à bioatividade destes compostos (WANI, *et al.*, 2020).

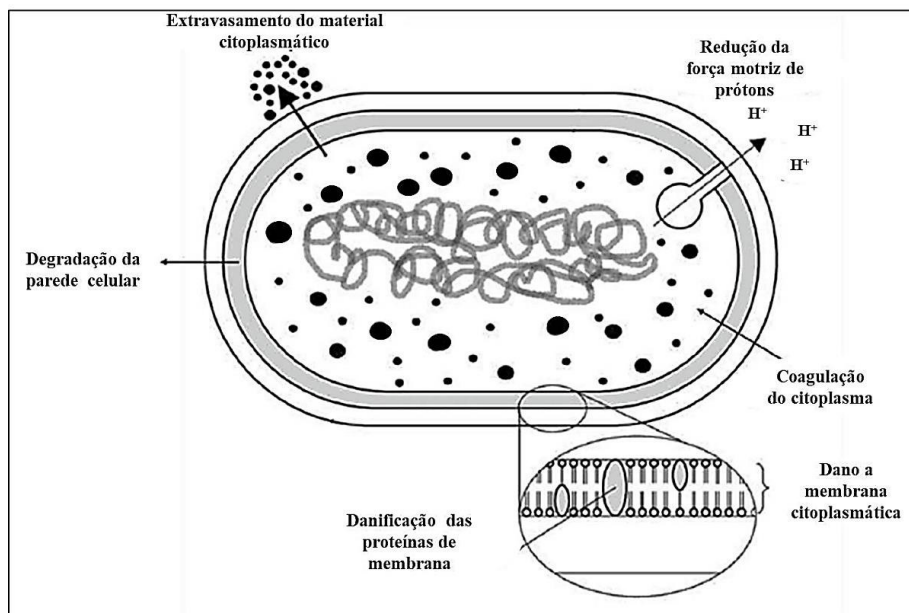
Produtos oriundos de plantas medicinais fornecem um amplo grupo de compostos químicos naturalmente encontrados nas mesmas. A extensa existência desses compostos tem mostrado diversas vantagens benéficas em termos de diversas atividades biológicas como antioxidante, antibacteriana e antifúngica. Eles podem restaurar, de certa forma, a aplicação clínica de antibióticos mais antigos, aumentando sua potência e, como consequência positiva, evitar o desenvolvimento de resistência. Entre essa diversidade química podemos destacar os componentes dos óleos essenciais que apresentam um espectro de propriedades e utilidades tanto medicinais, como em alimentos, cosméticos entre outros (KHAMENEH *et al.*, 2019; BARBIERI *et al.*, 2017).

3.3 O Uso dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais e as substâncias que os constituem têm sido estudados há bastante tempo em relação a suas atividades biológicas. Nas plantas essas substâncias têm uma gama de função que varia desde capacidade atrativa de insetos que contribuem no processo de polinização a proteção de ataque químicos, físicos e especialmente biológicos devido suas propriedades fúngicas e antibacterianas. Devido sua vasta composição, as substâncias mais abundantes e estudadas são os terpenos e fenilpropanóides, os quais podem ser considerados uma alternativa de fonte de novos medicamentos por terem a capacidade de interagir com o organismo humano de forma benéfica e com baixa toxicidade (ARAÚJO *et al.*, 2020; REDDY *et al.*, 2020).

Apresentando um amplo espectro de propriedades medicinais, os óleos essenciais, de acordo com Raut e Karuppayil (2014), podem apresentar atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiprotozoária, possuindo propriedades capazes de prevenir o desenvolvimento de câncer e demais mutações genéticas, apresentam potencial antidiabético, podendo ainda exercer atividade anti-inflamatória. Sua ação antibacteriana e seus efeitos celulares podem estar relacionados a capacidade de alterar a estrutura e permeabilidade da membrana (Figura 1) que na maioria dos casos, é responsável pela liberação de diversos elementos celulares (SHARIFI-RAD *et al.*, 2017). Além disso, a atividade antibacteriana dos óleos essenciais também difere entre classes de micro-organismos devido a arquitetura bacteriana, como bactérias gram-positivas e gram-negativas, que se distinguem quanto a suas composições de membrana celular (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Figura 1: Localização e mecanismo em células bacterianas de ação para óleos essenciais.



Fonte: Adaptado de Arjin e Tapingkae (2014).

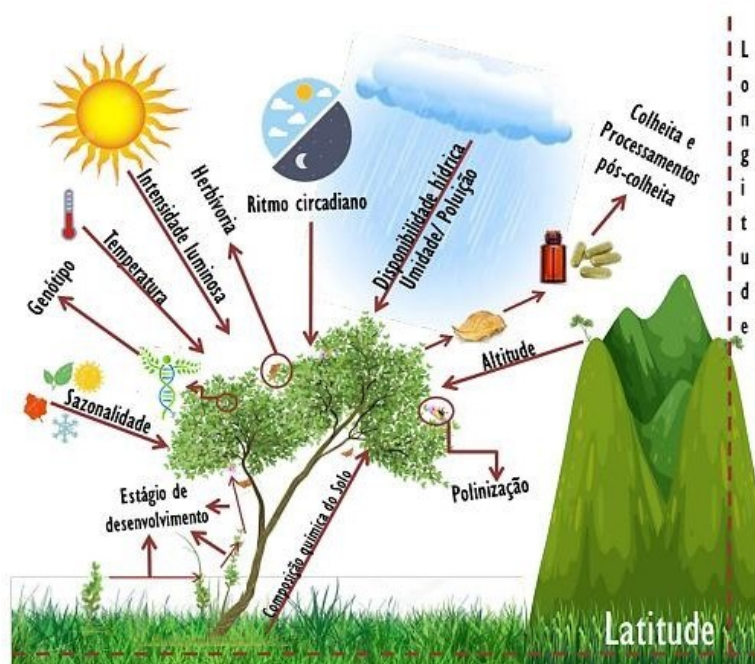
Óleos essenciais tendem a ser uma excelente alternativa ao combate de micro-organismos, pois apresentam uma fonte de diversidade molecular que podem demonstrar diferentes mecanismos antimicrobianos. Sendo assim, a procura por propriedades que contenham atividade contra esses patógenos em óleos essenciais de plantas tem se intensificado (YAP *et al.*, 2014). Tanto de forma individual como de forma combinada com antibióticos de uso clínico, os óleos essenciais vêm se mostrando muito promissores na eliminação de bactérias resistentes a múltiplos fármacos, tornando-se foco de importantes estudos voltados para melhorar a qualidade e expectativa de vida da população (MELO *et al.*, 2019).

Nos óleos essenciais existem componentes químicos que se apresentam em maior concentração que outros e esta quantificação podem variar entre as diferentes partes do material vegetal. Diversos fatores podem estar ligados à variação na composição química desses óleos essenciais, resultando na caracterização de compostos diferentes, mesmo em produtos naturais que venham a ser extraídos da mesma espécie. Fatores como: geografia de cultivo, época da coleta do vegetal, parte da planta, condições e tempo de acondicionamento (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017; MISHRA *et al* 2020).

3.4 Variações da Sazonalidade em Óleos Essenciais

A sazonalidade tem por definição um conjunto de variações ambientais regulares ou como as respostas biológicas condicionadas por estas variações. O crescimento e a forma de desenvolvimento vegetal estão atrelados aos ciclos sazonais, de forma que as estações atuam como fator natural de relação (BATTEY, 2000). No que cabe a produção de óleo essencial por espécies vegetais ocorrem influências de variáveis como: o fotoperíodo, temperatura, estresse hídrico, fase de desenvolvimento do vegetal, geografia dentre outros fatores climáticos, além de condições de secagem na pós-colheita e forma de destilação, os quais também afetam de forma direta ou indireta o conteúdo do óleo produzido (OZKAN; BAYDAR; ERBAS, 2010).

Figura 2: Fatores que podem afetar a composição química dos óleos essenciais em vegetais (RAMOS *et al.*, 2020).



Em decorrência das variações climáticas de acordo com a estação do ano, diferentes estímulos são recebidos pelos vegetais, podendo levar a alterações fisiológicas, dentre elas mudanças no metabolismo secundário vegetal (GATTI *et al.*, 2014), como a produção diferencial de compostos fenólicos em função da variação estacionária do ano (NCUBE; FINNIE; VAN STADEN, 2011).

A sazonalidade está correlacionada a alguns fatores como temperatura, umidade e precipitação, que ocorre durante todo o ano, dando origem às estações. Como um dos fatores que auxiliam neste processo se destaca a temperatura, pois influencia os processos metabólicos das plantas, contudo, não é um fator independente, sendo necessária a

participação correlativa entre umidade e precipitação. A precipitação se torna um dos fatores relevante na alteração do rendimento e da composição química dos Óleos essenciais, devido principalmente à alta umidade do ar (BRANT *et al.*, 2008; GOUVEA; GOBBO-NETO; LOPE, 2012).

A composição de um óleo essencial pode variar entre espécies ou até mesmo dentro da própria espécie. Sendo determinada pela relação de fatores bióticos e abióticos. Dentro dos fatores abióticos a quantidade dos metabólitos pode variar com as alterações sazonais, circadianas, intra e interplanta, devido às variações climáticas como, por exemplo: temperatura, radiação ultravioleta, altitude, pluviosidade entre outros e aos fatores agronômicos: práticas agrícolas, disponibilidade hídrica, nutrição. Já dentro dos fatores bióticos: herbívora e ataque de patógenos, idade e desenvolvimento da planta (OLIVEIRA, 2020).

3.5 O Gênero *Vitex*

Dentre as famílias botânicas presente nos cerrados, destaca-se Lamiaceae, esta família esta formada por ervas ou arbustos, não muito frequente árvores e comumente aromáticas, No Brasil estão representada por 46 gêneros e com um total de 524 espécies, sendo seis gêneros e 340 espécies endêmicos do país. A família é bem representada no Cerrado, somando 32 gêneros e 294 espécies (HARLEY, 2012).

O nome *Vitex* foi usado pela primeira vez pelo Tournefort (1719), quando descreveu cinco espécies. Linnaeus (1753) incluiu quatro espécies neste gênero. Quase cem anos depois, Schauer (1847) acabou publicando uma revisão global do gênero *Vitex*, no qual foi listado 59 espécies. Em sua contribuição para "Flora Brasiliensis", Schauer (1851) incluiu dez espécies de *Vitex*, e posteriormente, Moldenke (1959) reconheceu 36 espécies para o Brasil (FRANÇA, 2010).

Na literatura trabalhos com gênero *Vitex* foram descritos etnofarmacologicamente onde permitiu identificar o uso medicinal tradicional de espécies desse gênero, dentre elas: *Vitex mollis* Kunth, como analgésico e anti-inflamatório, além de ser usado para diminuir a dispesia, diarreia e disenteria (MEENA *et al.*, 2011) Outras espécies de *Vitex* também são recomendados pelo uso tradicional para diminuir a diarreia e desordens gastrointestinais, tais como, *V. pyramidata* B.L Rob.; *V. pubescens* Vahl.; *V. agnus-castus* Linn.; e *V. gaumeri*

Greenm. (AHMAD; HOLDSWORTH, 1995). Extrato hexânico das folhas e do caule de *V. mollis* apresentou atividade anti-inflamatória (MORALES-DEL-RIO *et al.*, 2015). As espécies de *Vitex* mais estudadas, destacam-se: *V. agnus-castus* Linn., *V. negundo* Linn., *V. rotundifolia* Linn., *V. trifolia* Vahl. e a *V. doniana* Linn. Por exemplo, a espécie *V. agnus-castus* cujo frutos têm sido utilizados em distúrbios menstruais, transtorno disfórico pré-menstrual, insuficiência do corpo lúteo, hiperprolactinemia, infertilidade, menopausa, interrupção da lactação, dor cíclica na mama, condições inflamatórias, mastalgia cíclica, diarreia e flatulência (CARMICHAEL, 2008; DUGOUA *et al* 2008; ONO *et al.*, 2008).

3.6 *Vitex gardneriana* Schauer

Vitex gardneriana Schauer, popularmente conhecida como “jaramataia”, é uma das únicas espécies do gênero *Vitex* do sertão Nordestino, podendo ser encontrada em leitos de rios situados nos estados da Paraíba, Recife e Ceará. Apresenta um hábito de crescimento em arbusto, alcançando 6 a 7 metros de altura. Possui folhas simples e inflorescências de cor roxa claro. Seu fruto é tipo drupa carnosa, de formato ovóide e coloração verde oliva (SÁ BARRETO, 2004).

Poucas informações sobre suas atividades biológicas são evidentes. Foi demonstrado que os extratos de folhas e cascas de caule de *V. gardneriana* apresentam atividade moluscicida em embriões de *Biomphalaria glabrata* (SÁ-BARRETO *et al.*, 2007). Em Monteiro *et al* (2015), foi relatada atividade larvicida do extrato etanólico de *V. gardneriana* sobre as larvas de *Aedes aegypti*. Já seu extrato metanólico não demonstrou atividade antifúngica contra *C. albicans* (SÁ-BARRETO *et al.*, 2008).

No que diz respeito a aspectos etnobiológicos, a espécie é descrita para fins patológicos, como por exemplo: verminose, gripe, estalicado, gases, dor de barriga, sinusite, inflamação na próstata (ROQUE, 2009) e ainda para dor nos ossos, problemas nos rins, problema na coluna, calmante, dentre outros (ANDRADE *et al.*, 2012)

No trabalho de Vale (2015) teve como resultados, a identificação de 12 compostos, em sua maioria sesquiterpenos. Os componentes majoritários foram: Cis-Calameneno (28,15%), Isoledeno (13,07%), α -copaeno (9,28%) e E-Cariofileno (6,45%). No mesmo estudo, foi comprovada atividade antibacteriana nas formas planctônicas e em biofilme, além apresentar atividade antioxidante. Há relato da presença de iridóides e ecdisteroides nas cascas do caule de *V. gardneriana* (SÁ-BARRETO *et al.*, 2005).

Quanto à toxicidade a utilização da solução aquosa do extrato bruto não apresentou toxicidade aguda em camundongos nem por administração oral, nem intraperitoneal, no entanto, houve um potente efeito anti-edematogênico, antinociceptivo e hipnótico (SÁ-BARRETO *et al.*, 2008).

Em mais um trabalho de Sá-Barreto *et al* (2005) o extrato metanólico das cascas do caule de *Vitex gardneriana* Schauer foi caracterizada por cromatografia em camada delgada e espectroscopia de massa e dois compostos isolados deste extrato, o ecdisteroide, (20-hidroxi-ecdisona) e o iridoide glicosilado, (aucubina). tiveram as suas estruturas moleculares determinadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Em Macedo *et al.* (2019) foi investigada a atividade antimicrobiana e modulatória de 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (VG). Ef. CLII) isolado das folhas *Vitex gardneriana* Schauer contra cepas bacterianas MDR *S. aureus* 358 e *E. coli* 27 mostrando-se promissor quando associado com os antibióticos norfloxacin e gentamicina.

Já em Moraes *et al.* (2020) O extrato etanólico das folhas foi submetido à caracterização fitoquímica, quantificação de fenóis e flavonoides, e determinação de atividade antiacetilcolinesterase. Apresentando fenóis, taninos, catequinas, saponinas e esteroides, acentuada ação antioxidante e o extrato revelou importante atividade antiacetilcolinesterase, sendo relevante contra a doença de Alzheimer.

3.7 Mecanismos de Resistência e Bactérias

A resistência microbiana tem como definição a capacidade de que um micro-organismo tem de sobreviver e multiplicar-se na presença de antibióticos ou até mesmo de substâncias tóxicas. Este fenômeno tem como resultado alterações funcionais e estruturais na célula bacteriana que permitira sua adaptação a condições adversas (TRONCOSO *et al.*, 2017).

Dessa forma, a resistência bacteriana vem sendo considerada como um processo natural na qual existiria mesmo sem intervenção humana, devido influencia em determinados genes causando uma diversidade genética. Entretanto, esse fenômeno tem sido de certa forma acelerado pelo uso empírico dos antibióticos em contextos variados como em humanos, animais e na agricultura. Então o uso desses medicamentos provoca uma pressão seletiva que

favorece a seleção de bactérias naturalmente resistentes (MOREHEAD; SCARBROUGH, 2018).

Cada mecanismo de resistência possui uma origem genética que pode estar relacionada desde mutações em genes cromossômicos à aquisição de genes de resistência de outros micro-organismos no meio ambiente (BELLO; DINGLE, 2018).

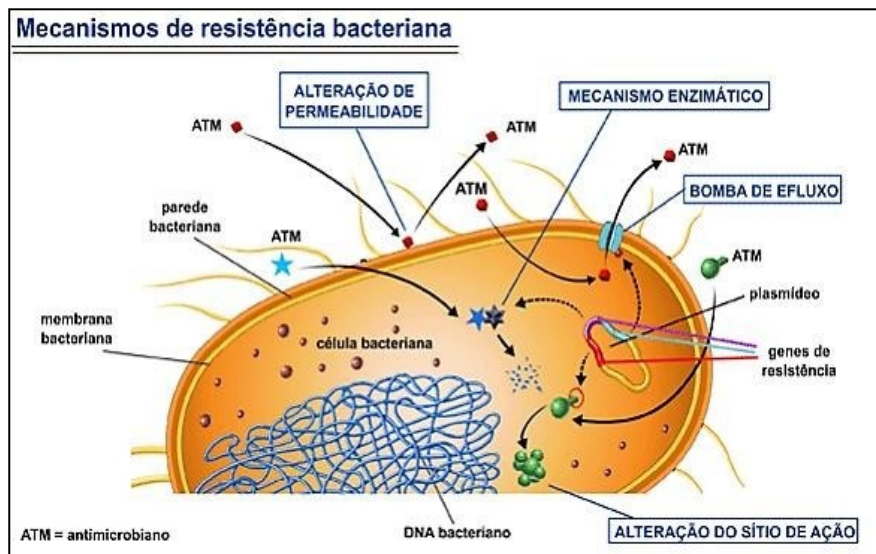
Quanto aos tipos de resistência bacteriana existe uma divisão básica entre elas à intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca acontece quando a bactéria é naturalmente resistente a um ou mais antimicrobianos. Como por exemplo, ocorre devido à grande parte dos antimicrobianos serem derivados de moléculas presentes no meio ambiente, fazendo com que as bactérias que entraram em contato com essas substâncias desenvolvessem mecanismos de combate a elas com a finalidade de sobreviverem. A resistência adquirida é resultado de mutações em genes cromossômicos ou da aquisição de elementos genéticos externos, obtidos de variadas maneiras, entre elas, das bactérias intrinsecamente resistentes presentes no meio ambiente (MUNITA; ARIAS, 2016).

Os quatro mecanismos bacterianos mais comuns que resultam em resistência antimicrobiana são: produção de inativadores enzimáticos, modificação do alvo do antibiótico, produção de bombas de efluxo, e diminuição da permeabilidade da membrana da célula. Cada um desses possui sua origem genética seja pela mutação de genes cromossômicos ou pela aquisição de genes de outros micro-organismos no ambiente (BELLO; DINGLE, 2018)

Segundo Blair *et al.* (2015) a resistência bacteriana a variedade de fármacos está diretamente relacionada à estrutura e características típicas de cada bactéria. As Gram-positivas possuem uma parede celular espessa e contínua constituída por peptidoglicano, enquanto que as bactérias Gram-negativas possuem uma camada menos espessa e não contínua recoberta por uma membrana externa (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

Um dos fatores que confere resistência bacteriana está associado à obtenção de genes, geralmente contidos em plasmídeos e transposons. Os transposons e integrons, devido à sua plasticidade genômica, contribuíram muito para o quociente de adaptabilidade e robustez das bactérias para sobreviver em ambientes variados. Os integrons, normalmente transportados por plasmídeos ou encerrados em transposons, tem como função a tarefa de disseminação do gene de resistência e desempenham um papel importante na revelação de bugs (SULTAN *et al.*, 2018)

Figura 3: Mecanismos bacterianos mais comuns que resultam em resistência antimicrobiana.



Fonte: Anvisa, 2015

Como exemplos importantes sobre resistência a antibióticos, destacam-se as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* que apresentam cepas resistentes a vários agentes antimicrobianos de importância para a saúde pública, podendo, serem utilizadas para observar a variação da resistência aos antibióticos utilizados comercialmente (BOSS; OVERESCH; BAUMGARTNER, 2016; PORMOHAMMAD; NASIRI; AZIMI, 2019).

3.7.1 *Staphylococcus aureus*

Infecções bacterianas provenientes de serviços de saúde estão entre as principais causas de morte e aumento da morbimortalidade entre pacientes que se encontram hospitalizados no mundo inteiro (UPRETI *et al.*, 2018). Quando se trata das origens etiológicas das infecções nosocomiais, entende-se que grande parte dos patógenos envolvidos nelas é de origem endógena, ou seja, são micro-organismos oriundos da própria microbiota do indivíduo (MENDES *et al.*, 2016).

Os cocos Gram-positivos são os mais frequentemente isolados nas infecções adquiridas em internações hospitalares (DANTAS, 2015). Desse grupo se destaca *Staphylococcus aureus* que é reconhecido como um grande problema em hospitais em todo o mundo, principalmente quando é encontrado associado à multirresistência ou na formação de biofilmes, no que resulta a redução da ação terapêutica dos medicamentos (ANVISA, 2015; POORABBAS *et al.*, 2015). *Staphylococcus aureus* foi reconhecido como uma importante

causa de patologia em todo o mundo e tornou-se um importante patógeno ligado a infecções adquiridas tanto em hospitais como na comunidade (PALAVECINO, 2020).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva que está geralmente associada a infecções de pele, feridas e tecidos moles, além de causar a endocardite e infecções ligadas a implantes de dispositivos e aparatos médicos, como válvulas e cateteres, intoxicação alimentar e causadora do choque tóxico (TONG *et al.*, 2015)

Quanto às características morfológicas desta cepa podem apresentar diversos tipos de arranjos celulares, que vão desde isolados ou pares, em cadeias curtas, ou agrupados de forma irregular, no que esta ligada à irregularidade dos planos de divisão celular, apresentando colônias esféricas que variam da coloração cinza à amarelada. *S. aureus* é a única espécie capaz de produzir a estafiloxantina, pigmento responsável pela coloração amarela de sua colônia. Este fato ajuda não só na identificação da bactéria, mas também proporciona para a mesma uma forma de mecanismo de inativação de espécies reativas de oxigênio de neutrófilos, aumentando na sua patogenicidade (ACOSTA *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2018; LEVINSON, 2016).

As cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) foram identificadas como patógenos com maior frequência no mundo, além de ter se tornado um dos problemas mais frequentes no ambiente hospitalar da atualidade. Bacteremias causadas por esse micro-organismo estão frequentemente associadas a um prognóstico não muito satisfatório, incluindo mortalidade em até 30 dias entre 20 a 40% dos casos (LEE *et al.*, 2018).

Os mecanismos de resistências presentes em *S. aureus* são vários, dentre eles incluindo: diminuição das concentrações de antibióticos dentro da bactéria, sendo que isso ocorre tanto pela fraca penetração como também pelo efluxo promovido por proteínas transmembrana, evitando sua chegada ao alvo; alteração ou modificação no alvo do antibiótico devido mutação genética ou por modificação pós-transducional do sitio alvo; e proteção do alvo do antibiótico por inativação do antibiótico por hidrólise ou modificações que o fazem perder sua funcionalidade (BLAIR *et al.*, 2015).

Torna-se importante mencionar que *S. aureus* detém uma capacidade de liberar sinais químicos no meio em qual se encontra; tais sinais são logo reconhecidos por outras células bacterianas, resultando em um fenômeno chamado de *quorum sensing* (KHAN *et al.*, 2015). Tal mecanismo tem como caracterização a transferência de informações intra ou

interespecíficas, fazendo com que as bactérias conciliem seu comportamento e sobrevivam em condições adversas.

As principais toxinas em *S. aureus* incluem α -toxina (α - hemolisina), enterotoxina (SEA e SEB) e a toxina da conhecida como a síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1), e desempenham papéis importantes na patogênese da infecção (GRUMANN; NUBEL; BROKER, 2014).

Para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina são utilizados antibióticos com clindamicina e vancomicina. A primeira opção sofre de uma resistência cruzada pela utilização da eritromicina. Esse macrolídeo tem atuação no ribossomo 50s, uma vez ligado a ele, impede a ligação da clindamicina. Esse mecanismo de resistência é denominado MLSB (Macrolídeo, Lincosamida e Estreptogramina B) (DE MORAES; VILLARROEL; PEREIRA, 2018).

3.7.2 *Escherichia coli*

Dentro do grupo de bactérias Gram-negativas a *Escherichia coli* é um micro-organismo classificado como comensal encontrado no trato gastrintestinal dos seres humanos, especialmente no intestino grosso, sendo exposta ao ambiente através das fezes. Além das cepas comensais estas bactérias podem causar uma variedade de doenças dentre elas: diarreias, colite hemorrágica e síndrome urêmica, condicionadas a manifestação de fatores de virulência e patogenicidade. Fatores como seu crescimento e sua sobrevivência dependem de condições ideais de temperatura, disponibilidade de água e nutrientes, competição com outros micro-organismos e formação de biofilmes (JANG *et al.*, 2017).

De acordo com a presença de fatores de patogenicidade, as cepas de *E. coli* causadoras de diarreia são classificadas em diferentes patotipos responsáveis por diferentes mecanismos de patogenicidade em seus hospedeiros. O potencial patogênico desta cepa obtida de diferentes hospedeiros, associado à alta ocorrência de colibacilose em animais e seres humanos em diversos países, apresenta-se como um dos micro-organismos mais importantes como agentes infecciosos causadores de diarreia no mundo. Assim, a verificação de diferentes fontes de transmissão, principalmente a dos seres humanos, torna-se extremamente importante para a prevenção da ocorrência de novos casos e as consequências associadas à doença (RAMOS, 2019).

Existem vários patótipos diferentes de *Escherichia coli* que podem causar manifestações clínicas nos portadores, dentre eles: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), e, *E. coli* difusão aderente (DAEC). Para a classificação desses Patótipos existem fatores de virulência específicos (SILVEIRA; MARQUES; MACHADO, 2013).

Escherichia coli no intestino é um patógeno comensal, mas no sistema urinário comumente causa infecções, por características anatômicas, a proximidade da uretra e anus, e características fisiológicas, a falta de um mecanismo antimicrobiano como o líquido prostático no homem, as mulheres são mais afetadas. *E. coli* é agente causador de mais de 80% dos casos de infecções urinárias e isto se deve além dos fatores anteriormente citados, aos fatores de virulência de cada cepa, antígenos que facilitam a disseminação e permanência da cepa no epitélio infectado (LOPES *et al.*, 2015).

Um mecanismo muito frequente transmitido por meio de plasmídeo pode ser encontrado em bactérias Gram-negativas. Fisiologicamente as bombas de efluxo presentes também nesse micro-organismo atuam retirando compostos que podem vir a ser tóxicos ao seu metabolismo, substâncias como: solventes, metais tóxicos e antibióticos (RAMOS *et al.*, 2002; TINTINO, 2018). Para que a bactéria consiga colocar de forma ativa para meio externo o antibiótico ou qualquer outra substância tóxica, é necessário que se gaste energia para a movimentação e ativação da bomba, dessa forma a droga não conseguirá atingir uma concentração efetiva dentro da bactéria (RIBEIRO; CORTINA, 2016)).

A pesquisa desenvolvida pelos pesquisadores atualmente por produtos de fonte natural com ação antimicrobiana contribui no processo de descoberta de novos antibióticos e fitoterápicos importantes, com a capacidade de atuar sobre a resistência bacteriana aos medicamentos presentes no mercado, assim como, bacteremias provocadas por estes patógenos Gram-negativos, que tem como principal agente etiológico a bactéria *E. coli*, micro-organismo este que coloca em risco um grande número de indivíduos (MARTINS; CASALI, 2019).

3.8 Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia em reflectância no infravermelho próximo (NIRS - near infrared reflectance spectroscopy) é uma tecnologia que tem como utilidade identificar, quantificar e caracterizar compostos orgânicos. Essa tecnologia é aplicada em algumas áreas do conhecimento como na agropecuária, indústria alimentícia e farmacêutica, e na pesquisa científica em várias áreas. A principal vantagem encontrada quanto a essa tecnologia é a rapidez e qualidade na análise das amostras (MENDES, 2014).

A espectroscopia na região do Infravermelho apresenta uma larga faixa de execuções que vai desde a análise de moléculas pequenas até o alto grau de sistemas complexos como os de células e tecidos (MENDES, 2014). Dentre um dos princípios da espectroscopia seria a interação das vibrações moleculares que se originam pela incidência da radiação eletromagnética na amostra de estudo (PASQUINI, 2003). Essa técnica vem sofrendo grandes avanços principalmente pelo fato de que os espectrômetros de infravermelho são encontrados com maior frequência em muitos laboratórios de pesquisa, pela possibilidade de usar a amostra em diversos estados dentre eles sólido amorfo ou cristalino, soluções aquosas, solventes orgânicos, filmes, pastilhas de KBr e membranas dentre outros (MENDES, 2014).

O estudo dos métodos como das técnicas da espectroscopia vibracional de óleos essenciais tem sido fundamental importância para fornecer dados detalhadas sobre suas propriedades estruturais e vibracionais (SCHULZ *et al.*, 2005; BARANSKA *et al.*, 2005). As técnicas de espectroscópicas da transformada de Fourier Raman (FT-Raman) e do infravermelho transformado de Fourier da refletância total atenuada (ATR-FTIR) se mostram como técnicas promissoras na identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais (TEIXEIRA *et al.*, 2018).

A análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem a capacidade de identificar ligações químicas usando um espectro infravermelho que é absorvido pelo material. A espectroscopia é uma técnica poderosa não destrutiva que utiliza um efeito de interação de radiação eletromagnética para determinar a estrutura atômica ou molecular e o nível de energia da substância (CUI *et al.*, 2017).

A região da espectroscopia infravermelho (IR) chega a ser dividida em três áreas, sendo elas: IR próximo correspondendo a números de onda de 14.000-400 cm^{-1} , IR médio com (4000-400 cm^{-1}) e IR distante com (400-10 cm^{-1}). Dentre essas três regiões, a região mais relatada e usada para as análises qualitativas e quantitativas é a do IR médio devido à grande quantidade de informações obtidas (ROHMAN, 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

As folhas de *V. gardneriana* (Jaramataia, Lamiaceae Martinov) foram coletadas de janeiro a dezembro de 2016 na Fazenda Experimental da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (03 ° 36 ' 44 " S; 40 ° 18 ' 37 " W), localizado a 11 km da cidade de Sobral, Ceará, Brasil. As espécies foram identificadas e depositadas no Herbário Francisco José de Abreu Matos Prisco Bezerra da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (Sobral-CE, Brasil), exsicata n° 17703.

4.2 Extração de Óleos Essenciais

As folhas de *Vitex gardneriana* foram hidrodestiladas em aparelho do tipo Clevenger por 2 h. O rendimento foi determinado pela relação entre a massa de óleo obtida e a massa de material vegetal fresco usado na extração. Após filtração e secagem em sulfato de sódio anidro, os óleos isolados foram armazenados em frascos de vidro lacrados, os quais foram mantidos sob refrigeração a 4 ° C até cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia gasosa com detecção de chama (GC – FID). A caracterização química dos óleos essenciais de *V. gardneriana* são descritos no manuscrito publicado por Silva *et al.*, (2019).

4.3 Medições ATR - FTIR e Cálculos DFT

Os espectros de absorvância no infravermelho foram obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier de refletância total atenuada (ATR-FTIR), usando um espectrômetro Bruker, modelo VERTEX 70V, e registrados em temperatura ambiente na faixa de número de onda de 600 a 4000 cm^{-1} em uma resolução de 4 cm^{-1} , acumulando 128 varreduras por espectro. Os cálculos teóricos da química quântica usando a teoria do funcional da densidade (DFT) foram realizados de acordo com o método descrito por Teixeira *et al.*, (2018), a fim de obter informações sobre os modos vibracionais dos componentes

químicos do óleo essencial de *Vitex gardneriana*, e correlacioná-los com as bandas de absorvância no infravermelho.

4.4 Micro-organismos

As cepas bacterianas padrão e multirresistentes utilizadas foram *Escherichia coli* (EC-ATCC 25922 e EC-06) e *Staphylococcus aureus* (SA-ATCC 25923 e SA-10), ambas cepas clínicas isoladas de feridas cirúrgicas. Todas as cepas foram mantidas em ágar de infusão de coração (HIA, Difco Laboratories Ltda., Detroit-MI, EUA). Antes da realização dos ensaios, as cepas foram cultivadas por 18 h a 37 ° C em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, Difco Laboratories Ltda., Detroit-MI, EUA).

4.5 Drogas e Reagentes

Para avaliação da atividade potencializadora de antibióticos foram utilizados os antibióticos: gentamicina, ampicilina e ofloxacina. Todos os fármacos foram dissolvidos em água destilada e estéril na concentração de 1024 µg / mL. O reagente resazurina sódica (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), um indicador bacteriano colorimétrico de crescimento por redução de óxido, foi utilizado para a leitura dos testes.

4.6 Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 poços e um meio de distribuição foi preparado em tubos Eppendorf® contendo uma solução de 1 mL composta por 900 µL de BHI 10% e 100 µL da suspensão bacteriana. A placa de microdiluição será preenchida no sentido numérico, adicionando-se 100 µL da solução de distribuição em cada cavidade, a seguir será realizada a microdiluição serial com 100 µL da solução teste, com concentrações finais variando de 512 a 8 µg / mL, até a penúltima cavidade, uma vez que esta se destinava ao controle do crescimento microbiano. As placas foram então incubadas por 24 h a 35 ° C (JAVADPOUR *et al.*, 1966). Para a leitura das placas com bactérias, foram adicionados 20 µL de resazurina e, após 1 h em temperatura ambiente, foi realizada a leitura.

4.7 Atividade Potencializadora de Antibióticos

A metodologia proposta por Coutinho *et al*, 2008 foi usado para avaliar o potencial da substância para modificar a resistência antibiótica. A solução foi diluída em uma concentração subinibitória. O meio foi preparado em tubos Eppendorf® contendo cada BHI 10% + 150 µL da suspensão bacteriana + substância, chegando a 1,5 mL de solução. Para o controle, a solução de 1,5 mL continha apenas 10% de BHI + 150 µL de suspensão microbiana. A placa de microdiluição foi preenchida em ordem alfabética, adicionando 100 µL da solução de distribuição em cada cavidade, em seguida, fazendo a microdiluição em série (proporção de 1:1) com 100 µL do fármaco (antibiótico), até a penúltima cavidade, então as placas foram incubadas em 37 ° C por 24 h. As concentrações dos antibióticos variaram gradativamente de 1.024 a 1 µg / mL. A leitura foi realizada da mesma forma que o teste MIC.

4.8 Análise Estatística

Os ensaios antibacterianos foram feitos em triplicata, e os resultados expressa em média geométrica para avaliação da atividade antibacteriana. A média geométrica foi obtida a partir do resultado da raiz cúbica da multiplicação dos três termos: (valor 1 × valor 2 × valor 3). Posteriormente, o desvio padrão desses três valores foi calculado e transformado em escala logarítmica e, em seguida, o desvio padrão logarítmico foi calculado e multiplicado por 10 para obter um número natural. Uma análise estatística ANOVA one-way foi aplicada para a análise da atividade antimicrobiana modulatória de óleos essenciais, tendo o teste de Tukey como um teste post hoc para ambas as análises, feito no software GraphPadPrism 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos em duas subseções (seção 1 e 2). A seção 1 apresenta o artigo contendo informações sobre a variação de acordo com a sazonalidade da: composição química, efeito sobre a espectroscopia no infravermelho, efeito antibacteriano dos óleos essenciais das folhas de *Vitex gardneriana* e efeito modificador da ação antibiótica, que foi submetido a Current Microbiology, Percentil Qualis referência 42%, B1 no novo qualis e B2 na área de Biodiversidade no antigo qualis com fator de impacto de 1.610 e foi publicado online dia 06 de Outubro de 2020 com DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02226-6> .

A segunda consta de um capítulo de livro, que foi aprovado e publicado no livro eletrônico "Ciências Biológicas: Considerações e Novos Segmentos", sob ISBN 978-65-5706-413-9 e DOI 10.22533/at.ed.1392021096, publicado pela Editora Atena que tem como título: "Análise do espectro infravermelho, investigação de atividade antibacteriana e potencialização da atividade antibacteriana de óleo essencial das folhas de *Vitex gardneriana* Schauer" que aborda à análise do espectro infravermelho, atividade antibacteriana e potencialização da atividade antibiótica de um dos óleos usados no manuscrito desta dissertação da planta em estudo.

SEÇÃO 1: ARTIGO ORIGINAL DA DISSERTAÇÃO



Seasonality Effects on Antibacterial and Antibiotic Potentiating Activity against Multidrug-Resistant Strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and ATR-FTIR Spectra of Essential Oils from *Vitex gardneriana* Leaves

Raimundo Luiz Silva Pereira¹ · Thiago Sampaio de Freitas¹ · Priscilla Ramos Freitas¹ · Ana Carolina Justino de Araújo¹ · Fábila Ferreira Campina¹ · Kleber Ribeiro Fidelis¹ · Jean Parcelli Costa do Vale² · Antônio César Honorato Barreto³ · Henrique Douglas Melo Coutinho¹ · Paulo Nogueira Bandeira² · Alexandre Magno Rodrigues Teixeira¹ · Hécio Silva dos Santos^{1,2}

Received: 17 April 2020 / Accepted: 23 September 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Plants are natural sources of several bioactive substances, which have been found in extracts, secondary metabolites, and essential oils. Several biological activities have been attributed to essential oils as antiviral, insecticidal, antiparasitic, antioxidant, and antimicrobial. The indiscriminate use of antibiotics has increased the development of resistance mechanisms of microorganisms. Thus, search for efficient natural compounds with antimicrobial activity and low toxicity has increased, so essential oils have been a promising alternative for combating microbial infections. This study was carried out to investigate the seasonality effects on the infrared absorbance spectra, antibacterial activity, and antibiotic potentiating activity of essential oils from *Vitex gardneriana* leaves. Essential oils were extracted from *V. gardneriana* Schauer leaves the seasonal period from January to December 2016 and characterized by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. The antibacterial effect of these oils and antibiotic potentiating activity, both determined by the minimum inhibitory concentration, were assessed using microtiter plates. For the first time, we present the use of infrared absorbance spectra of these essential oils and show the influence of seasonality on them. Synergistic effects were observed for the essential oils associated with the antibiotics tested (gentamicin, ampicillin, and ofloxacin). The main influence of seasonality on the infrared absorbance spectra of the essential oils of the *V. gardneriana* occurred in the June month (last month of the rainy season). In regard to antibacterial activity test, the essential oils of the *V. gardneriana* leaves did not show a direct effect on the strains tested. However, the essential oils when associated with the antibiotics showed variations in the minimum inhibitory concentration with the months of the seasonal period, indicating synergistic effects against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial resistance

1 Introduction

Plants are natural sources of several bioactive substances, which have been found in extracts, secondary metabolites, and essential oils [1]. Essential oils are defined as products from the secondary metabolism of plants. Regarding the composition, are complex mixtures of volatile substances, lipophilic, usually odoriferous, and liquid state [2]. Several biological activities have been attributed to essential oils as

antiviral [3]; insecticidal [4]; antiparasitic [5]; antimicrobial and antioxidant [6–8].

Antimicrobial resistance has become the main problem in public health in the world, which affects all countries. A rapid increase in the incidence and prevalence of opportunistic bacterial infections has been observed over the past few years. In addition, the indiscriminate use of antibiotics has increased the development of resistance mechanisms of microorganisms. Thus, the search for efficient natural compounds with antimicrobial activity and low toxicity [9] has increased, so that essential oils have been a promising alternative for combating microbial infections [10].

✉ Hécio Silva dos Santos
helciiodossantos@gmail.com

Extended author information available on the last page of the article

Vitex genus possesses 36 species, among which 16 have known pharmacological activity and are used in popular medicine as an alternative or complementary treatment for various diseases. Phytochemical studies have revealed the presence of important classes of secondary metabolites such as flavonoids, iridoids, monoterpenoids, sesquiterpenoids, triterpenoids, diterpenoids, steroids, saponins, phenylpropanoglycosides [11].

Vitex gardneriana (Lamiaceae), popularly known as “jaramataia”, is a shrub commonly found in caatinga biome located in northeast Brazil. In folk medicine, its leaves have been used as an analgesic and anti-inflammatory agents [10, 12]. In addition, the essential oil from *V. gardneriana* exhibited antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, and *Candida tropicalis* [13]. In previous study was showed that the essential oil from leaves of *V. gardneriana* possesses larvicidal activity against *Aedes aegypti* especially in the essential oils extracted in January, March, May, July and December [12]. In this work, we carried out a study to investigate the seasonality effects on the infrared absorbance spectra and the antibiotic potentiating activity of essential oils from *V. gardneriana* leaves.

2 Materials and Methods

2.1 Plant Material

The leaves of *V. gardneriana* (Jaramataia, Lamiaceae Martinov) were collected from January to December 2016 at the Experimental Farm of the State University Vale do Acarau (03° 36' 44" S; 40° 18' 37" W), located 11 km from the City of Sobral, Ceara, Brazil. The species were identified and deposited in the Francisco Jose de Abreu Matos Prisco Bezerra Herbarium of the State University Vale do Acarau (Sobral-CE, Brazil), exsiccate #17703.

2.2 Extraction of Essential Oils

The leaves of *V. gardneriana* were hydro-distilled in the Clevenger-type apparatus for 2 h. The yield was determined by the ratio of the mass of oil obtained and the mass of fresh plant material used in extraction. After filtering and drying on anhydrous sodium sulfate, the isolated oils were stored in sealed glass flasks, which were kept under refrigeration at 4 °C until gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and gas chromatography with flame detection analysis (GC–FID). The chemical characterization of *V. gardneriana* essential oils is described in the manuscript published by Silva et al. [12].

2.3 ATR- FTIR Measurements and DFT Calculations

The infrared absorbance spectra were obtained by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy, using a Bruker spectrometer, model VERTEX 70V, and recorded at room temperature in the wavenumber range from 600 to 4000 cm^{-1} at a resolution of 4 cm^{-1} , accumulating 128 scans per spectrum.

Quantum chemistry theoretical calculations using density functional theory (DFT) were performed according the method described by Teixeira et al. [14], in order to obtain information on the vibrational modes of the chemical components of the essential oil from *V. gardneriana*, and to correlate them with the infrared absorbance bands.

2.4 Microorganisms

The standard and multiresistant bacterial strains used were *Escherichia coli* (EC-ATCC 25922 and EC-06) and *S. aureus* (SA-ATCC 25923 and SA-10) both clinical strains isolated from surgical wounds. All strains were maintained in *heart infusion agar* (HIA, Difco Laboratories Ltda., Detroit-MI, USA). Before performing the assays, the strains were cultivated for 18 h at 37 °C in *brain heart infusion* broth (BHI, Difco Laboratories Ltda., Detroit-MI, USA).

2.5 Drugs and Reagents

For the evaluation of the antibiotic potentiating activity of essential oils from *V. gardneriana* Schauer leaves were used the antibiotics: gentamicin, ampicillin, and ofloxacin. All the drugs were dissolved in distilled and sterile water in a concentration of 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The resazurin sodium reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), a bacterial colorimetric indicator of oxide-reduction growth was used to read the tests.

2.6 Minimum Inhibitory Concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution broth method. A 96-well sterile microdilution plate was used to make it, and a distribution medium was prepared in *Eppendorf*® tubes containing a 1 mL solution composed of 900 μL of 10% BHI and 100 μL of the bacterial suspension. The microdilution plate will be filled in the numerical direction, adding 100 μL of the distribution solution in each cavity, then the serial microdilution was performed with 100 μL of the test solution, with final concentrations ranging from 512 to 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, up to the penultimate cavity, since the latter was intended for microbial growth control. The plates were then incubated for

24 h at 35 °C [15]. To read the plates with bacteria, 20 µL of resazurin was added, and after 1 h at room temperature, the reading was performed.

2.7 Antibiotic Potentiating Activity

The methodology proposed by Silva et al. [16] was used to evaluate the potential of the substance to modify antibiotic resistance. The solution was diluted in a subinhibitory concentration. The medium was prepared in Eppendorf® tubes containing each BHI 10% + 150 µL of the bacterial suspension + substance, reaching 1.5 mL of solution. For the control, the solution of 1.5 mL had only 10% BHI + 150 µL of microbial suspension. The microdilution plate was filled alphabetically, adding 100 µL of the distribution solution into each cavity, then making serial microdilution (1:1 ratio) with 100 µL of the drug (antibiotic), up to the penultimate cavity, then the plates were incubated at 37 °C for 24 h. The concentrations of the antibiotics were gradually varied from 1024 to 1 µg/mL. The reading was performed in the same way as the MIC test.

2.8 Statistical Analysis

The antibacterial assays were made in triplicates, and the results expressed as a geometric mean for the evaluation of the antibacterial activity. The geometric mean was obtained from the result of the cubic root of the multiplication of the three terms: (value 1 × value 2 × value 3). Subsequently, the standard deviation of these three values was calculated and transformed into a logarithmic scale, and then the logarithmic standard deviation was calculated and multiplied by 10 to obtain a natural number. A one-way ANOVA statistical analysis was applied for the analysis of the modulatory antimicrobial activity of essential oils, having Tukey's test as a post hoc test for both analyses, made in the GraphPadPrism 5.0 software.

3 Results and Discussion

The essential oil extracted from the leaves of *V. gardneriana* was analyzed by GC/MS and GC/FID. The chemical composition of the leaf essential oils showed three monoterpenes, two non-oxygenated and one oxygenated and 24 sesquiterpenes, 21 non-oxygenated, and 3 oxygenates. The main components identified were 6,9-guaiadiene, *cis*-calamenene, and caryophyllene oxide (Fig. 1). The 6,9-guaiadiene compound presents the highest concentrations in October (30.15%), January (28.86%) and February (22.73%), whereas the *cis*-calamenene has the highest concentrations in months December (35.62%), April (34.92%), November (34.63%) and March (33.57%), and caryophyllene oxide possesses

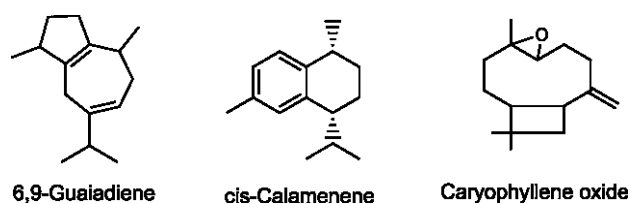


Fig. 1 The main chemical constituents of the essential oil from the leaves of *V. gardneriana*

Table 1 Percentual of the three higher concentrations of the three main components of essential oil from the *V. gardneriana* leaves

Compounds of the compounds in the month	Percentual of concentrations
6,9-Guaiadiene	28.86% in January
	22.73% in February
	30.15% in October
<i>Cis</i> -calamenene	34.92% in April
	34.63% in November
	35.62% in December
Caryophyllene oxide	15.06% in January
	14.39% in August
	16.68% in September

the highest concentrations in September (16.68%), January (15.06%) and August (14.39%) (Table 1).

The chemical composition of essential oils from *V. gardneriana* showed high content of sesquiterpenes. This result is in accordance with the literature since essential oils of *Vitex* species showed mainly sesquiterpenes with gem-dimethylcyclopropyl subunits on seven-member ring compounds like sesquiterpene 6,9-guaiadiene. The variations observed in the concentration of the chemical constituents essential oils can be attributed to the chemical interrelationship between plants and environmental and, influenced by the edaphoclimatic conditions [13].

The infrared spectra of the essential oils from *V. gardneriana* Schauer leaves in the seasonal period from January to December 2016 are shown in Fig. 2. In Table 2 is presented the wavenumbers and normalized absorbance intensity and the assignment for the vibrational modes for these essential oils. The infrared spectrum of an essential oil presents bands with profile characteristic from each individual volatile fraction, which are identified by the vibrational modes which are characteristics of the functional groups of their chemical constituents [14]. All the spectral bands of the essential oils from *V. gardneriana* are present throughout the seasonal period. However, we can observe that the infrared absorbance spectra which are characteristics of these oils undergo modifications in their intensities and wavenumbers, as can

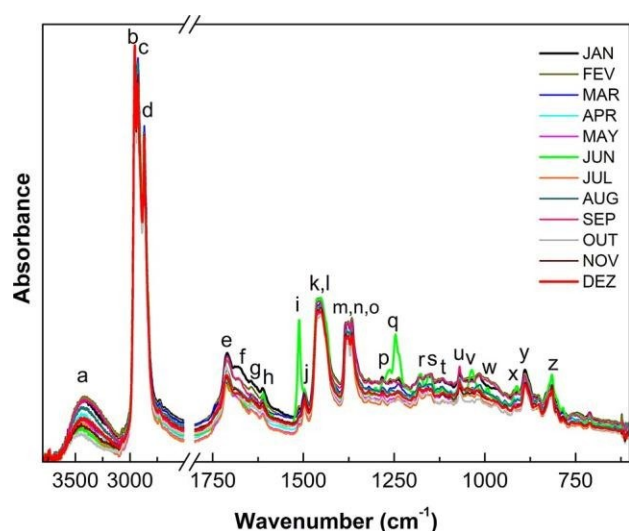


Fig. 2 Infrared absorbance spectra of essential oils from the of *V. Gardneriana* leaves

be seen in Fig. 2 and Table 2. The most significant difference in infrared spectra occurs in the month of June (last month of the rainy season), and affects mainly the intensities of the absorbance bands marked by “a”, “i” and “q”, which correspond, respectively, to the hydroxyl stretching mode ($\nu[\text{OH}]$), the bending vibrations of the CCC and HCC groups ($\delta[\text{HCC}] + \delta[\text{CCC}]$), and the bending vibrations of the of the COC and HCC groups ($\delta[\text{COC}] + \delta[\text{HCC}]$). The hydroxyl stretching bands are owing to the 1-*epi*-cubenol, cubenol, and α -cadinol compounds, which are not major components of essential oil from the *V. Gardneriana* leaves but have your signature on the infrared absorbance spectra. The infrared intensity of the hydroxyl stretching band (I_a) of the essential oils from *V. Gardneriana* vary significantly month to month, showing an increase in the ratio between the intensities in the months of January and June, with value $I_a(\text{January})/I_a(\text{June}) = 1.875$. Already the infrared bands intensities designed by “i” and “q” present a greater difference with values $I_i(\text{June})/I_i(\text{July}) = 3.78$, and $I_q(\text{June})/I_q(\text{October}) = 2.07$, respectively. Analyzing the chemical composition of the 1-*epi*-cubenol, cubenol, and α -cadinol compounds of essential oil from leaves of *V. Gardneriana*, which are those that contain hydroxyl group, it is possible note that the percentage composition of these compounds increased of June to July [17]. The intensity of the OH stretching band can increase when hydroxyl group is forming a hydrogen bond [16, 18]. However, infrared absorbance spectra of the essential oils from *V. Gardneriana* leaves presented modifications in the other infrared bands, as can be seen in Fig. 2 and Table 2. For instance, the ratio between the infrared band intensities designed by “f” in the months of January and June has value $I_f(\text{January})/I_f(\text{June}) = 1.35$. This infrared band corresponds to stretching vibration of the CC groups of

all molecules that comprise these essential oils, and therefore, their spectral features are the result of a synergism of all molecules [14]. However, in the fingerprint region (1800 to 600 cm^{-1}), the spectral bands are mainly due to their major components [14], which are the 6,9-guaiadiene, *cis*-calamenene and caryophyllene oxide [17]. It is observed that the ratio of the percentage compositions between these months of the main component of the essential oils of *V. Gardneriana*, which is 6,9-guaiadiene has value equal to 2.26 [17]. Therefore, the variations observed on the infrared spectra are attributed to changes in the percentage composition of the oil during the twelve months of the year.

The oils extracted from *V. Gardneriana* during each month of the year 2016 present MICs of 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *S. aureus* 10, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 06. For *S.A.* ATCC 25923, the oils presented variations in the inhibitory concentrations in which observed by the colorimetric reading of the microdilution plates (Table 3). Table 3 does not represent any change in MIC value for strains SA-10 and EC-06, except for the month of April. However, for the standard strain SA-ATCC 25923 occurred variations in the MIC values in the most months of the year. The evidence of susceptibility of the strain SA-ATCC 25923 to essential oils is also corroborated by studies of Freire et al. [19] and Teixeira et al. [20].

Figures 3 and 4 show the MICs in the absence and presence of the essential oils from *V. Gardneriana* against multidrug-resistant (MDR) strains of *S. aureus* (SA-10) and *E. coli* (EC-06) to the ofloxacin, gentamicin, and ampicillin antibiotics. The modifying effect of the antibiotic action by these essential oils on MDR strains of SA-10 occurs in almost all months of the year for all the tested antibiotics. Synergistic effects were observed in all months in the association of the essential oils from *V. Gardneriana* with gentamicin antibiotic against MDR strains of SA-10. When the associations of these essential oils were with ofloxacin and ampicillin antibiotics, the synergistic effects more pronounced occurred, respectively, in the months of March and August. Whereas the effects of the antibiotic action on MDR strains of EC-06 were observed only when the essential oils from *V. Gardneriana* are associated with the ofloxacin and gentamicin antibiotics. The MIC minor value for the association of the essential oils from *V. Gardneriana* with ofloxacin antibiotic against MDR strains of EC-06 occurred in the month of June. The best synergic interaction of the essential oil from *V. Gardneriana* with the gentamicin antibiotic on MDR strains of EC-06 occurred in the month March.

It is also noted that the variations in the MICs are greater than those which are observed in the infrared spectra. However, these changes, in the infrared spectra, and in the antibiotic potentiating activities are due to influence of seasonality on the chemical composition of the essential oil from *V. Gardneriana*. A recent work evidenced the existence of a

Table 2 Experimental wavenumbers (cm^{-1}) and normalized absorbance intensity (in arbitrary units) of the infrared spectra of essential oils from *Vitex gardneriana* Schauer leaves in the sea-seasonal period from January to December 2016, and assignment of their vibrational modes

Infrared bands	Vibrational modes	For each infrared band the position of the wavenumber (in unit of cm^{-1}) and normalized absorbance intensity (in arbitrary unit) are given in the above and below lines, respectively											
		January	February	March	April	May	June	July	August	September	October	November	December
a	$\nu[\text{OH}]$	3430	3427	3427	3427	3427	3427	3432	3431	3431	3432	3433	3431
		0.15	0.15	0.10	0.11	0.10	0.08	0.09	0.13	0.15	0.07	0.09	0.10
b	$\nu_{\text{as}}[\text{CH}_3] + \nu_{\text{as}}[\text{CH}_2] + \nu[\text{CH}]$	2956	2956	2956	2956	2956	2956	2956	2956	2956	2956	2956	2956
		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
c	$\nu_{\text{s}}[\text{CH}_3] + \nu_{\text{as}}[\text{CH}_2] + \nu[\text{CH}]$	2929	2929	2928	2930	2929	2928	2929	2929	2930	2930	2929	2929
		0.96	0.94	0.97	0.94	0.92	0.93	0.91	0.96	0.92	0.86	0.93	0.91
d	$\nu_{\text{as}}[\text{CH}_2]$	2869	2870	2869	2870	2869	2869	2870	2869	2870	2869	2870	2870
		0.79	0.78	0.81	0.77	0.77	0.78	0.77	0.79	0.76	0.77	0.79	0.78
e	$\nu[\text{CO}] + \nu[\text{CC}]$	1711	1711	1711	1711	1711	1711	1711	1711	1710	1713	1711	1713
		0.27	0.24	0.19	0.21	0.20	0.20	0.18	0.22	0.25	0.23	0.20	0.21
f	$\nu[\text{CC}]$	1687	1685	1685	1685	1690	1687	1690	1690	1684	1685	1685	1685
		0.23	0.20	0.18	0.16	0.16	0.17	0.17	0.18	0.20	0.16	0.18	0.17
g	$\nu[\text{CC}]$	1645	1644	1642	1645	1644	1639	1642	1643	1645	1642	1643	1645
		0.19	0.18	0.16	0.13	0.13	0.16	0.12	0.15	0.16	0.14	0.15	0.15
h	$\nu[\text{CC}]$	1612	1613	1613	1613	1612	1612	1613	1613	1613	1613	1612	1614
		0.19	0.16	0.15	0.13	0.12	0.16	0.11	0.14	0.15	0.12	0.14	0.13
i	$\delta[\text{HCC}] + \delta[\text{CCC}]$	1512	1512	1513	1512	1512	1511	1511	1512	1512	1512	1512	1512
		0.13	0.13	0.12	0.10	0.10	0.34	0.09	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
j	$\delta_{\text{as}}[\text{CH}_3]$	1496	1497	1497	1497	1497	1497	1497	1497	1497	1497	1497	1497
		0.17	0.17	0.18	0.15	0.13	0.18	0.13	0.15	0.15	0.13	0.16	0.15
k	$\text{sc}[\text{CH}_2]$	1461	1460	1461	1461	1461	1463	1462	1461	1461	1462	1461	1461
		0.39	0.39	0.38	0.37	0.36	0.39	0.35	0.37	0.38	0.35	0.36	0.36
l	$\delta_{\text{as}}[\text{CH}_3]$	1452	1455	1453	1453	1453	1452	1453	1453	1453	1452	1452	1452
		0.39	0.39	0.38	0.37	0.36	0.39	0.35	0.38	0.38	0.35	0.37	0.36
m	$\text{wag}[\text{CH}_2] + \tau[\text{CCCH}] + \delta[\text{HCC}]$	1383	1383	1383	1383	1383	1383	1383	1383	1383	1383	1383	1383
		0.33	0.33	0.33	0.31	0.30	0.30	0.29	0.32	0.33	0.28	0.31	0.30
n	$\text{wag}[\text{CH}_2] + \delta[\text{HCC}]$	1376	1376	1376	1376	1377	1376	1377	1376	1377	1377	1376	1376
		0.34	0.34	0.31	0.31	0.30	0.30	0.29	0.31	0.33	0.29	0.30	0.30

o	wag[CH ₂] + τ [CCCH] + δ [HCC]	1366	1366	1366	1366	1366	1366	1366	1366	1366	1366	1366	1366
		0.34	0.35	0.34	0.33	0.31	0.31	0.29	0.33	0.34	0.27	0.31	0.30
p	δ (COH) + δ [HCC]	1261	1260	1260	1260	1260	1264	1260	1260	1260	1260	1261	1259
		0.19	0.20	0.18	0.17	0.15	0.22	0.14	0.17	0.19	0.14	0.16	0.16
q	δ (COH) + δ [HCC]	1241	1237	1238	1241	1239	1246	1240	1241	1242	1241	1241	1241

Table 2 (continued)

Infrared bands	Vibrational modes (in arbitrary unit)	For each infrared band the position of the wavenumber (in unit of cm ⁻¹) and normalized absorbance intensity are given in the above and below lines, respectively											
		January	February	March	April	May	June	July	August	September	October	November	December
r	δ [COC]	0.20	0.20	0.19	0.16	0.16	0.31	0.16	0.17	0.19	0.15	0.17	0.17
		1180	1179	1180	1179	1180	1177	1180	1180	1178	1180	1179	1180
s	δ [HOC] + ν (CC) + τ [HCCC]	0.21	0.21	0.19	0.18	0.17	0.20	0.16	0.19	0.21	0.17	0.18	0.18
		1151	1153	1159	1157	1155	1153	1155	1152	1155	1155	1154	1154
t	ν (CO) + δ (HCCC) + δ [HCCC]	0.21	0.21	0.18	0.19	0.17	0.21	0.16	0.19	0.21	0.17	0.17	0.18
		1118	1117	1120	1116	1116	1116	1118	1117	1117	1117	1117	1116
u	τ [HCCC] + τ (CCCC)	0.20	0.20	0.18	0.18	0.16	0.18	0.15	0.18	0.20	0.15	0.16	0.17
		1070	1069	1070	1069	1070	1070	1069	1069	1069	1070	1070	1070
v	τ [HCCC] + ν (CC) + ν (OC)	0.22	0.22	0.19	0.20	0.19	0.19	0.18	0.20	0.23	0.18	0.18	0.19
		1034	1034	1036	1035	1036	1036	1037	1034	1036	1036	1036	1038
w	ν (CC) + τ [HCCC]	0.20	0.20	0.18	0.18	0.17	0.22	0.16	0.17	0.19	0.15	0.17	0.17
		992	996	999	998	999	992	999	998	1000	1000	998	999
x	ν (CC) + τ [HCCC]	0.18	0.20	0.16	0.17	0.16	0.18	0.14	0.17	0.20	0.14	0.15	0.16
		913	909	909	909	909	911	909	910	909	909	910	910
y	ν (CC) + γ [HCCC]	0.17	0.17	0.15	0.15	0.14	0.18	0.12	0.15	0.16	0.12	0.14	0.13
		889	890	889	890	890	889	889	889	890	890	887	890
z	Wag(CH) + δ (HCCC)	0.20	0.21	0.20	0.20	0.19	0.20	0.18	0.20	0.21	0.17	0.19	0.19
		815	816	815	815	815	814	815	816	816	816	815	815
		0.20	0.19	0.19	0.19	0.18	0.21	0.17	0.18	0.18	0.15	0.19	0.17

The letters of the alphabet in the first column correspond to infrared bands of the essential oils from *Vitex gardneriana*, which are shown in Fig. 2. Nomenclature for the atoms: C carbon, O oxygen, H hydrogen. Nomenclature for the vibrational modes: τ torsion, γ deformation out of plane, *sc* scissoring, *wag* wagging, δ bending, δ_{as} anti-symmetric bending; ν stretching, ν_{as} anti-symmetric stretching, ν_s symmetric stretching

Table 3 Seasonal variation of the minimum inhibitory concentration against the standard and multidrug-resistant bacterial strains

Months (μg/mL)	SA-ATCC 25923	EC-ATCC 25922 (μg/mL)	SA-10 (μg/mL)	EC-06 (μg/mL)
January	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
February	40	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
March	161	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
April	32	≥ 1024	161	≥ 1024
May	50	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
June	128	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
July	64	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
August	64	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
September	64	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
October	101	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
November	256	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
December	64	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024

SA *Staphylococcus aureus*, EC *Escherichia coli*

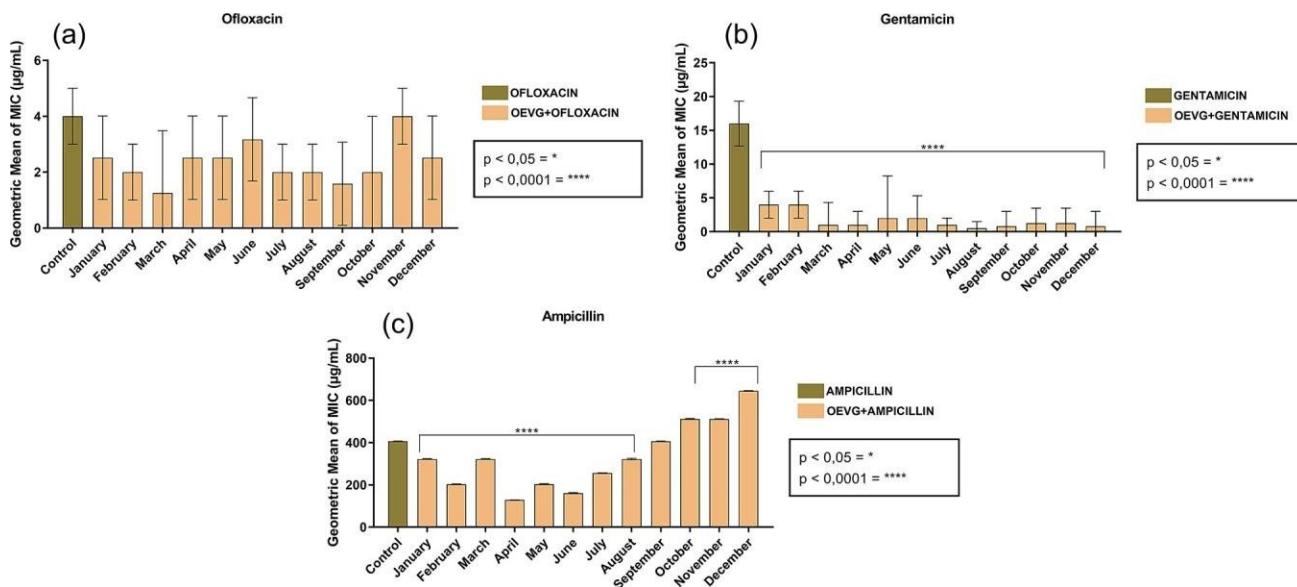


Fig. 3 Modifying effect of the antibiotic action of the essential oils from *V. gardneriana* from January to December against multidrug-resistant strains of *S. aureus* 10 in association with the antibiotic **a**

ofloxacin, **b** gentamicin and **c** ampicillin. $P < 0.05 =$ significant; $****P < 0.0001$ when compared to the control

relationship between larvicidal activity with the concentration of the chemical constituents of the essential oils from *V. gardneriana* [12].

4 Conclusion

The seasonal characterization by ATR-FTIR spectroscopy allowed us to obtain the absorbance spectra of essential oils from *V. gardneriana* leaves from January to December 2016. All the spectral bands of this essential oil are present throughout the seasonal period. However, we can

observe in the infrared absorbance spectra which some characteristics bands of these oils undergo modifications in their intensities. The main influence of seasonality on the infrared absorbance spectra of the essential oils of the *V. gardneriana* occurred in the June month (last month of the rainy season). The antibacterial effect of these oils and antibiotic potentiating activity, both determined by the minimum inhibitory concentration were assessed using microtiter plates. In regard to the antibacterial activity test, the essential oils of the *V. gardneriana* leaves did not show a direct effect on the strains tested. However, the essential oils, when associated with the antibiotics showed

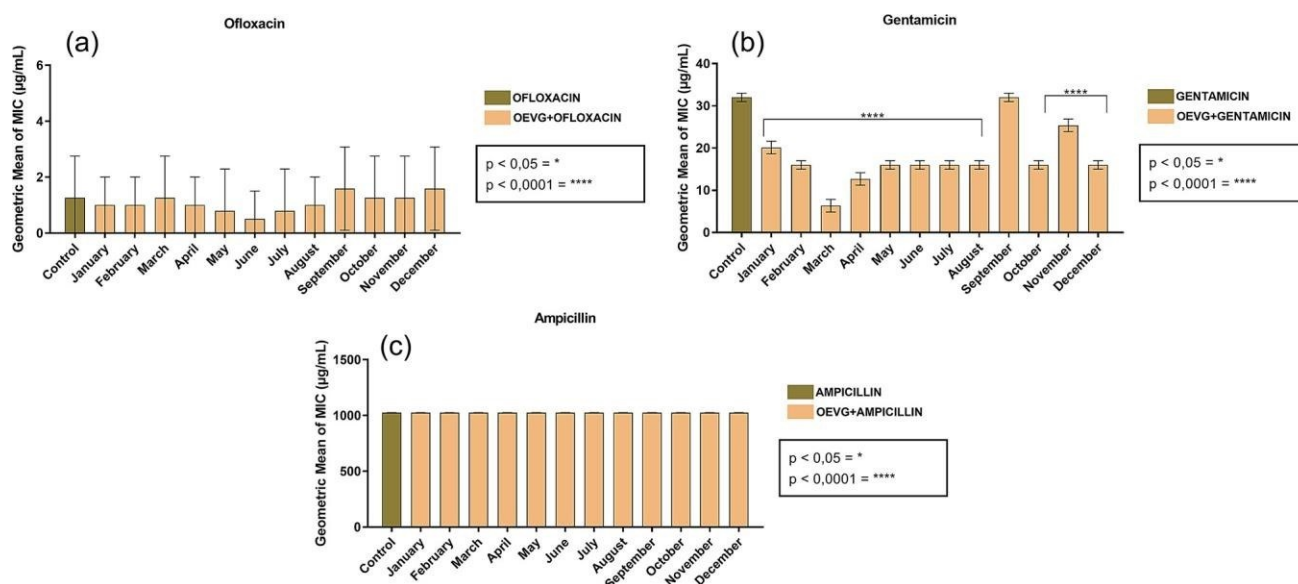


Fig. 4 Modifying effect of the antibiotic action of the essential oils from *V. gardneriana* from January to December against multidrug-resistant strains of *E. coli* 06 in association with the antibiotic **a**

ofloxacin, b gentamicin and c ampicillin. $P < 0.05 =$ significant; $****P < 0.0001$ when compared to the control

variations in the minimum inhibitory concentration with the months of the seasonal period, indicating synergistic effects against *E. coli* and *S. aureus* bacterial resistance.

Acknowledgements The authors thank FUNCAP, CAPES, and CNPq for financial support and scholarship. A.M.R. Teixeira acknowledges the financial support from the CNPq (Grant#: 305719/2018-1).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

5 References

1. Brusotti G, Cesari I, Dentamaro A, Caccialanza G, Massolini G (2014) Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. *J Pharm Biomed Anal* 87:218–228
2. Sarto MPM, Zanusso Junior G (2014) Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais. *UNINGÁ Rev* 20(1):98–102
3. Gavanji S, Sayedipour SS, Larki B, Bakhtari A (2015) Antiviral activity of some plant oils against herpes simplex virus type 1 in Vero cell culture. *J Acute Med* 5(3):62–68
4. Jalaei Z, Fattahi M, Aramideh S (2015) Allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. from Iran: a new chemotype with highest limonene-10-al and limonene. *Ind Crop Prod* 73:109–117
5. Gaínza YA, Domingues LF, Perez OP, Rabelo MD, López ER, de Souza Chagas AC (2015) Anthelmintic activity in vitro of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. *Ind Crop Prod* 76:647–652
6. Martucci JF, Gende LB, Neira LM, Ruseckaite RA (2015) Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Ind Crop Prod* 71:205–213
7. Zantar S, Haouzi R, Chabbi M, Laglaoui A, Mouhib M, Boujnah M, Bakkali M, Zerrouk MH (2015) Effect of gamma irradiation on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* essential oils. *Radiat Phys Chem* 115:6–11
8. Muriel-Galet V, Cran MJ, Bigger SW, Hernández-Muñoz P, Gavara R (2015) Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. *J Food Eng* 149:9–16
9. Cruz BG, dos Santos HS, Bandeira PN, Rodrigues THS, Matos MGC, Nascimento MF, de Carvalho GGC, Braz-Filho R, Teixeira AMR, Tintino SR, Coutinho HDM (2020) Evaluation of antibacterial and enhancement of antibiotic action by the flavonoid kaempferol 7-*O*-β-D-(6'-*O*-cumaroyl)-glucopyranoside isolated from *Croton piuhensis* Müll. *Microb Pathog* 143:104144
10. Pereira EJP, do Vale JPC, da Silva PT, Lima JD, Alves DR, Costa PS, Rodrigues THS, de Menezes J, de Moraes SM, Bandeira PN, Fontenelle ROS, Santos HS (2018) Circadian rhythm, and antimicrobial and anticholinesterase activities of essential oils from *Vitex gardneriana*. *Nat Prod Commun* 13(5):635–638
11. Macedo I, da Silva JH, da Silva PT, Cruz BG, do Vale JPC, dos Santos HS, Bandeira PN, de Souza EB, Xavier MR, Coutinho HDM, Braz-Filho R, Teixeira AMR (2019) Structural and microbiological characterization of 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone: a flavonoid isolated from *Vitex gardneriana* Schauer Leaves. *Microb Drug Resist* 25(3):434–438
12. Silva PT, Santos HS, Teixeira AMR, Bandeira PN, Holanda CL, Vale JPC, Pereira EJP, Menezes J, Rodrigues THS, Souza EB, Silva HC, Santiago GMP (2019) Seasonal variation in the chemical composition and larvicidal activity against *Aedes*

aegypti of essential oils from *Vitex gardneriana* Schauer. S Afr J Bot 124:329–332

13. do Vale JPC, dos Ribeiro LHF, de Vasconcelos MA, Sá-Firmino NC, Pereira AL, do Nascimento MF, Rodrigues THS, da Silva PT, de Sousa KC, da Silva RB, do Nascimento Neto LG, Saker-Sampaio S, Bandeira PN, Santos HS, de Souza EB, Teixeira EH (2019) Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activities of *Vitex gardneriana* Schauer leaves' essential oil. Microb Pathog 135:103608
14. Teixeira AMR, Lima IKC, Xavier MR, Pereira RLS, Gonçalves BG, de Sena DM, da Costa JM, Freire PTC, Saraiva GD, Bento RRF, de Faria JLB, Toledo TA (2018) Vibrational spectroscopy study of essential oils from *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng and *Vanillosmopsis arborea* Baker. Vib Spectrosc 98:22–29
15. Javadpour MM, Juban MM, Lo WCJ, Bispo SM, Alberty JB, Cowell SM, McLaughlin ML (1966) Peptídeos antimicrobianos de novo com baixa toxicidade celular em mamíferos. J Quim Med 36(19):3107–3113
16. Silva PT, Freitas TS, Sena DM Jr, Bandeira PN, Julião MSS, Marinho ES, Alcanfor AAC, Marinho EM, Lima-Neto P, Nogueira CES, Coutinho HDM, Leal ALAB, Barreto HM, Martins N, Rodrigues Teixeira MA, Santos HS (2020) Structural, vibrational and electrochemical analysis and antibacterial potential of isomeric chalcones derived from natural acetophenone. Appl Sci 10(14):4713
17. Pereira EJP, Silva HC, Holanda CLA, Costa SMO, Rodrigues THS, Fontenelle ROS, Vale JPC, Silva PT, Santiago GMP, Santos HS (2018) Chemical composition cytotoxicity and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Vitex gardneriana* Schauer. Bol latinoam Caribe plantas med aromát 17:302–309
18. Mayo DW, Miller FA, Hannah RW (2003) Course Notes on the interpretation of infrared and Raman spectra. Wiley, Hoboken
19. Freire ICM, Pérez ALAL, Cardoso AMR, Mariz BALA, Almeida LFD, Cavalcanti YW, Padilha WWN (2014) Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Plantas Med 16:372–377
20. Teixeira JJM, de Beserra SJO, da Silva ÍCL, Lima CG (2020) Antimicrobial analysis of the essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martini* (Roxb.) J.F. Watson) and pink pepper (*Schinus terebenthifolius* Raddi) in front of *Staphylococcus aureus* multi-resistant. Braz J Dev 6(6):34935–34953

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Affiliations

Raimundo Luiz Silva Pereira¹ · Thiago Sampaio de Freitas¹ · Priscilla Ramos Freitas¹ · Ana Carolina Justino de Araújo¹ · Fábíia Ferreira Campina¹ · Kleber Ribeiro Fidelis¹ · Jean Parcelli Costa do Vale² · Antônio César Honorato Barreto³ · Henrique Douglas Melo Coutinho¹ · Paulo Nogueira Bandeira² · Alexandre Magno Rodrigues Teixeira¹ · Hécio Silva dos Santos^{1,2}

Raimundo Luiz Silva Pereira raimundoluizbio@gmail.com

Thiago Sampaio de Freitas thiagocrato@hotmail.com

Priscilla Ramos Freitas priscilla.r.freitas@hotmail.com

Ana Carolina Justino de Araújo caroljustino@outlook.com

Fábíia Ferreira Campina fabiacampina@gmail.com

Kleber Ribeiro Fidelis kleberfidelis0@gmail.com

Jean Parcelli Costa do Vale jeanvale@hotmail.com

Antônio César Honorato Barreto cesar.barreto@fisica.ufc.br

Henrique Douglas Melo Coutinho hdmcoutinho@gmail.com

Alexandre Magno Rodrigues Teixeira alexandre.teixeira@urca.br

¹ Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil

² Science and Technology Centre, Chemistry Course, State University Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brazil

³ Department of Physics, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

SEÇÃO 2:CAPITULO DE LIVRO ORININAL DA DISSERTAÇÃO

ANÁLISE DO ESPECTRO INFRAVERMELHO, INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E POTENCIALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *VITEX GARDNERIANA* SCHAUER

Data de aceite: 01/09/2020

Data de

submissão: 01/06/2020

Fortaleza, CE, Brasil

<https://orcid.org/0000-0001-5527-164X>

Raimundo Luiz Silva Pereira

Universidade Regional de Cariri
Crato, CE,
Brasil <https://orcid.org/0000-0001-8205-7120>

Ana Carolina Justino de Araújo

Universidade Regional de Cariri
Crato, CE,
Brasil <https://orcid.org/0000-0001-9261-3901>

Paulo Nogueira Bandeira

Universidade Estadual Vale do Acaraú
Sobral, CE,
Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7212288309449337>

Henrique Douglas Melo Coutinho

Universidade Regional de Cariri
Crato, CE,
Brasil <https://orcid.org/0000-0002-6634-4207>

Jean Parcelli Costa do Vale

Universidade Estadual Vale do Acaraú
Sobral, CE,
Brasil <https://orcid.org/0000-0001-5598-8886>

Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

Universidade Regional de Cariri
Crato, CE,
Brasil <https://orcid.org/0000-0001-6786-2076>

Hélcio Silva dos Santos

Universidade Estadual do Ceará

RESUMO: As plantas são fontes naturais de várias substâncias bioativas, encontradas em extratos, metabólitos secundários e óleos essenciais. Várias atividades biológicas foram atribuídas aos óleos essenciais como antivirais, inseticidas, antiparasitários, antioxidantes e antimicrobianos. O uso indiscriminado de antibióticos aumentou o desenvolvimento de mecanismos de resistência de micro-organismos. Assim, a busca por compostos naturais eficientes com atividade antimicrobiana e baixa toxicidade aumentou, portanto os óleos essenciais têm sido uma alternativa promissora no combate às infecções microbianas. Este estudo foi realizado para investigar a composição química e espectros de absorvância no infravermelho, atividade antibacteriana e atividade potencializadora de antibióticos de óleos essenciais de folhas de *V. gardneriana*. Os óleos essenciais foram extraídos das folhas de *V. gardneriana* e caracterizados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier por refletância total atenuada (ATR- FTIR). O efeito antibacteriano desses óleos e a atividade potenciadora de antibióticos, ambos determinados pela concentração inibitória mínima, foram avaliados usando placas de microtitulação. Pela primeira vez, apresentamos o uso de espectros de absorvância infravermelha desses óleos essenciais e mostramos a influência da sazonalidade sobre eles. Efeitos sinérgicos foram observados para os óleos essenciais associados aos antibióticos testados (gentamicina, ampicilina e ofloxacina). Em relação ao teste de atividade antibacteriana, os óleos essenciais das folhas de *V. gardneriana* não apresentaram efeito direto testadas. Entretanto, os óleos essenciais, quando associados aos antibióticos, apresentaram variações na concentração inibitória mínima com os meses do período sazonal, indicando efeitos sinérgicos contra a resistência bacteriana nas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

PALAVRAS-CHAVE: *Vitex gardneriana*, ATR FT-IR, Atividade antimicrobiana, Atividade potenciadora de antibióticos.

ANALYSIS OF THE INFRARED SPECTRUM, INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND POTENTIALIZATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL ON THE LEAVES OF *VITEX GARDNERIANA* SCHAUER

ABSTRACT: Plants are natural sources of several bioactive substances, which have been found in extracts, secondary metabolites, and essential oils. Several biological activities have been attributed to essential oils as antiviral, insecticidal, antiparasitic, antioxidant, and antimicrobial. The indiscriminate use of antibiotics has increased the development of resistance mechanisms of microorganisms. Thus, search for efficient natural compounds with antimicrobial activity and low toxicity has increased, so essential oils have been a promising alternative for combating microbial infections. This study was carried out to investigate the chemical composition and infrared absorbance spectra, antibacterial activity, and antibiotic potentiating activity of essential oils from *V. gardneriana* leaves. Essential oils were extracted from *V. gardneriana* leaves and characterized by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. The antibacterial effect of these oils and antibiotic potentiating activity, both determined by the minimum inhibitory concentration, were assessed using microtiter plates. For the first time, we present the use of infrared absorbance spectra of these essential oils and show the influence of seasonality on them. Synergistic effects were observed for the essential oils associated with the antibiotics tested (gentamicin, ampicillin, and ofloxacin). In regard to antibacterial activity test, the essential oils of the *V. gardneriana* leaves did not show a direct effect on the strains tested. However, the essential oils when associated with the antibiotics showed variations in the minimum inhibitory concentration with the months of the seasonal period, indicating synergistic effects against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial resistance.

KEYWORDS: *Vitex gardneriana*, ATR FT-IR, Antimicrobial activity, Antibiotic potentiating activity.

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são misturas que apresentam uma certa complexidade dentre os compostos químicos presentes em diversas espécies vegetais, dentre estes os metabólitos secundários. Eles constituem um dos mais importantes grupos de matéria prima para a indústria alimentícia, farmacêutica, perfumaria e afins. Estes óleos podem ser extraídos de diferentes partes da planta como: folhas, galhos, raízes, frutos, sementes, flores, dentre outros. Algumas das estruturas vegetais são anatomicamente especializadas em acumular e secretar componentes dos óleos essenciais, como os idioblastos secretores, ductos e tricomas glandulares. No organismo vegetal, os óleos essenciais apresentam determinadas funções ecológicas, agindo como

mensageiros internos, defesa contra predadores e como atrativo de agentes polinizadores (BASER e BUCHBAUER, 2010). Os óleos essenciais encontram sua maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos. Esta capacidade, presente na grande maioria destes compostos, de certa maneira representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos.

Na literatura trabalhos com gênero *Vitex* foram descritos etnofarmacologicamente onde permitiu identificar o uso medicinal tradicional de espécies desse gênero, dentre elas: *V. mollis*, como analgésico e anti-inflamatório, além de ser usado para diminuir a dispepsia, diarreia e disenteria (MEENA *et al.* 2011) e a espécie *V. agnus-castus* cujo frutos têm sido utilizados em distúrbios menstruais, transtorno disfórico pré-menstrual, insuficiência do corpo lúteo, hiperprolactinemia, infertilidade, menopausa, interrupção da lactação, dor cíclica na mama, condições inflamatórias, mastalgia cíclica, diarreia e flatulência (CARMICHAEL, 2008; (DUGOUA *et al.*, 2008); ONO *et al.* 2008).

V. gardneriana, popularmente conhecida como “jaramataia” (Figura 1), é uma das únicas espécies do gênero *Vitex* do sertão Nordestino, podendo ser encontrada em leitos de rios situados nos estados da Paraíba, Recife e Ceará. Apresenta um hábito de crescimento em arbusto, alcançando 6 a 7 metros de altura. Possui folhas simples e inflorescências de cor roxa claro. Seu fruto é tipo drupa carnosa, de formato ovóide e coloração verde oliva (SÁ BARRETO, 2004). Há poucas informações sobre as atividades biológicas desta espécie. Foi demonstrado que os extratos de folhas e cascas de caule de *V. gardneriana* apresentou atividade moluscicida em embriões de *Biomphalaria glabrata* (Sá Barreto *et al.*, 2007). Também foi relatada atividade larvicida do extrato etanólico de *V. gardneriana* sobre as larvas de *Aedes aegypti* (MONTEIRO *et al.* 2015). Já seu extrato metanólico não demonstrou atividade antifúngica contra *C. albicans* (SÁ BARRETO *et al.* 2008). . A utilização da solução aquosa do extrato bruto não apresentou toxicidade aguda em camundongos nem por administração oral, nem intraperitoneal, no entanto, houve um potente efeito anti-edematogênico, antinociceptivo e hipnótico (SÁ BARRETO *et al.* 2008).



Figura 1 – *V. gardneriana*

Há relato da presença de iridóides e ecdisteroides nas cascas do caule de *V. gardneriana* (SÁ BARRETO *et al.* 2005). A composição química do óleo essencial de *V. gardneriana* foi determinada num período sazonal por Silva e colaboradores (SILVA *et al.* 2019).

Eles identificaram 27 compostos entre monoterpenos e em sua maioria sesquiterpenos. Os componentes químicos majoritários foram 6,9-guaiadieno, cis-calameneno e óxido de cariofileno. No mesmo estudo, foi comprovada atividade larvicida contra o *A. aegypti*.

Dada a importância de conhecer o espectro característico e as propriedades antibacteriana do óleo essencial da *V. gardneriana* é feito neste trabalho um estudo de espectroscopia vibracional usando Infravermelho com transformada de Fourier por reflexão total atenuada (ATR-FTIR) e uma detalhada investigação atividade antibacteriana e potencialização da atividade antibacteriana de óleo essencial das folhas de *V. gardneriana*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As folhas de *V. gardneriana* foram coletadas em 2016 em um experimento fazenda da Universidade Estadual do Vale do Acaraú, localizado a 11 km da cidade de Sobral, estado do Ceará, nordeste do Brasil. A autenticação da planta foi realizada pela Elnatan Bezerra de Souza (taxonomista de plantas) e uma amostra de voucher (No17703) foi depositado no Herbário Francisco José de Abreu Matos, Sobral, Ceará, Brasil.

2.2 Obtenção dos óleos essenciais

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger durante 2h. Em seguida, o óleo essencial foi coletado, armazenado frascos de vidro e estocados em freezer a -18°C

2.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM)

A análise por CG-EM foi realizado em um instrumento Agilent modelo GC- 7890B /MSD-5977A (quadrupolo), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna HP-5MS metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent), gás carreador hélio com fluxo 1,00 mL.min⁻¹, temperatura do injetor 250 °C, detector a 150 °C e linha de transferência a 280 °C. Utilizou-se a seguinte programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70 °C, com rampa de aquecimento de 4 °C.min⁻¹ até 180 °C e acréscimo de 10 °C/min até 250 °C ao término da corrida (34,5 min). A identificação dos compostos foi realizada pela análise dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massas com aqueles presentes na base de dados fornecidos pelo equipamento (NIST versão 2.0 de 2012-243.893 compostos).

2.4 Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas (CG-DIC)

A análise por CG-DIC foi realizada em um instrumento Shimadzu modelo CG- 2010 Plus, coluna RTX-5 metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), modo de injeção com divisão de fluxo 1:30, gás carreador nitrogênio com fluxo 1,00 mL.min⁻¹, temperatura do injetor 250°C e temperatura do detector a 280°C. Utilizou-se a mesma programação do forno cromatográfico das análises realizadas em GC-EM. A identificação dos compostos foi realizada através da

comparação dos seus índices de retenção com os de compostos conhecidos, obtidos por injeção de uma mistura de padrões contendo uma série homóloga de alcanos C7-C30.

2.5 Caracterização Espectroscópica por ATR-FTIR

O óleo essencial das folhas de *V. gardneriana* foi caracterizada pela técnica de Reflexão Total Atenuada com Transformada de Fourier (ATR-FTIR) à temperatura ambiente usando o espectrofotômetro da marca Bruker, modelo Equinox-55. O espectro de absorvância foi registrado, na região de 130 à 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

2.6 Testes Microbiológicos e Análises Estatísticas

2.6.1 Concentração inibitória mínima (MIC)

A CIM foi realizada em microplacas estéreis com 96 poços e serão diluídas em serie 1:1. A cultura em ágar mantido em estoque serão repicadas e repassadas para caldo BHI e incubadas a 37° C por 24 horas. Após esse período, foi preparado o meio de distribuição em serie 1:10, será adicionado em frascos de 100 μL de meio BHI em 900 μL de inóculo, e este meio de distribuição foi transferido para cada cavidade 100 μL . Após esse processo, foi realizado a microdiluição do óleo essencial das folhas de *V. gardneriana*, com concentração de 1024 $\mu\text{g/dL}$, sendo feita a diluição de 100 μL até penúltima cavidade. Controles positivos (meio + inóculo) foram incluídos nos ensaios, na última cavidade. A placas preenchidas foram incubadas a 35 \pm 2°C por 24 horas (NCCLS, 2003). Para evidenciar a CIM da amostra de óleo essencial das folhas de *V. gardneriana* foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 μL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas passarão por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa devido à redução da resazurina indica o crescimento bacteriano auxiliando a visualização da CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada.

2.6.2 Potencialização da atividade antimicrobiana

Para avaliar o óleo essencial das folhas de *V. gardneriana* como possível moduladora da ação antibiótica e antifúngica, a CIM de antibióticos orfloxacina, gentamicina e ampicilina foram avaliadas na presença e na ausência do óleo essencial das folhas de *V. gardneriana* em microplacas estéreis. Os antibióticos foram avaliados nas concentrações variando de 1024 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2003). A metodologia proposta por Coutinho e colaboradores (Coutinho *et al.*, 2008) foi utilizada para avaliar o potencial do óleo essencial das folhas de *V. gardneriana* para modificar a resistência aos antibióticos.

2.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média aritmética \pm desvio padrão, avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo pos-test *Bonferroni* utilizando o software *GraphPad Prism.*, as diferenças serão consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Composição Química

A Tabela 1 resume o resultado obtido por Análise por CG / EM e CG / DIC. Na composição identificada, três monoterpenos, dois não oxigenados (α -pineno e β -pineno) e um oxigenado (eucaliptol) e 24 sesquiterpenos, 21 não oxigenados e 3 oxigenados. Esse resultado concorda com a literatura para a composição química de óleos essenciais do gênero *Vitex*, caracterizados por predominância de sesquiterpenos (SILVA *et al.* 2019). Os principais componentes identificados foram 6,9-guaiadeno (1), cis-calameneno (2) e óxido de cariofileno (3) (Figura 1).

Tabela 1- Composição química do óleo essencial das folhas de *V. gardneriana* ^aíndice de retenção na coluna DB-5, ^bÍndice de retenção na literatura

Compostos	RI ^a	RI ^b	%
α - Pineno	941	939	0,41
β -Pineno	984	979	0,55
α -Cubebeno	1354	1348	1,66
α -Copaeno	1380	1376	5,14
(-)- β -Bourboneno	1388	1388	0,11
β -Cubebeno	1393	1387	0,46
β -Elemeno	1395	1390	1,23
β -Cariofileno	1423	1419	3,03
6,9-guaiadieno	1448	1444	12,23
α -Cariofileno	1458	1457	0,63
<i>Trans</i> -Cadina-1(6),4-dieno	1477	1476	0,31
γ -Muuroleno	1484	1479	0,21
<i>Trans</i> -Muurola-4(14),5-dieno	1494	1493	2,73
α -Muuroleno	1502	1500	1,16
α -Bulneseno	1508	1509	0,24
γ -Cadineno	1520	1513	1,51
Calameneno<cis>	1527	1529	34,92
<i>Trans</i> -Cadina-1,4-dieno	1536	1534	1,44
α -Calacoreno	1547	1547	3,98
β -Calacoreno	1568	1565	1,22
Oxido de Cariofileno	1586	1583	13,77
1- <i>epi</i> -Cubenol	1632	1628	3,41
Cubenol	1646	1646	3,02
α -Cadinol	1659	1654	0,87
Calamenen-10-ol<cis>	1664	1661	1,05
Cadalenol	1679	1676	1,74
Monoterpenos			0,96
Sesquiterpenos			96,28
Total			97,24

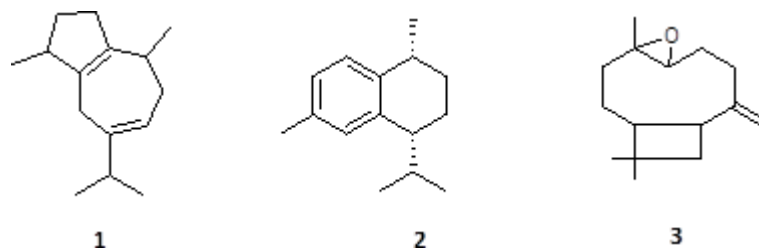


Figura 2 - Constituintes majoritários do óleo essencial das folhas de *V. gardneriana*

3.2 Análise do espectro infravermelho

A figura 3 mostra o espectro experimental de absorvância no infravermelho do óleo essencial das folhas da *V. gardneriana*. Foram identificadas doze bandas no espectro infravermelho que estão destacadas na Tabela 1. Os modos vibracionais associados as bandas espectrais no infravermelho que são características deste óleo essencial foram atribuídos com a ajuda de dados da literatura que fornecem as vibrações características esperadas para os números de onda observados no espectro infravermelho (STUART, 2004).

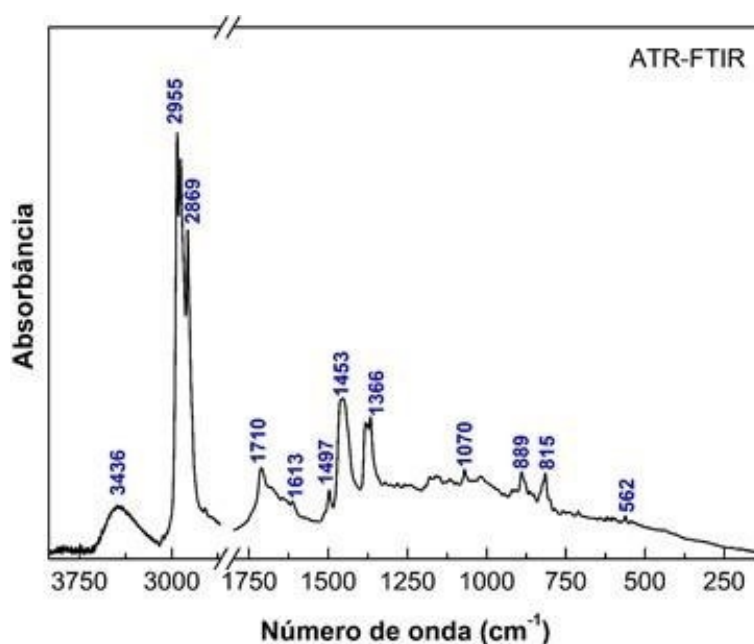


Figura 3 - Espectro experimental de absorvância no infravermelho do óleo essencial das folhas da *V. gardneriana*.

Tabela 2 - Algumas bandas do espectro infravermelho do óleo essencial de *V. gardneriana* Schauer com a respectiva atribuição dos modos vibracionais.

Número de onda das bandas ATR-FTIR de <i>V. gardneriana</i> ω_{exp} (cm ⁻¹)	*Intensidade das bandas ATR-FTIR de <i>V. gardneriana</i>	Atribuição dos modos vibracionaisof essencial oil of <i>V. gardneriana</i>
3436	0.11	n (OH)
2955	1.00	n (CH ₃)+n _{as} (CH ₂) + v (CH)
2869	0.77	v _{as} (CH ₂)
1710	0.21	v (CC)
1613	0.13	n(CC) + n (CO)
1497	0.15	wag (CH ₃) + wag (CH ₂)
1453	0.37	sc (CH ₃) + sc (CH ₂)
1366	0.33	d (HCC)
1070	0.20	d (HCCC) + t (CCCC)
889	0.20	d (CCC)
815	0.19	d (HCCC)
562	0.10	t (HCCC) + g (CCCC) + d (HCCC)

Nomenclature τ = torsion; \blacksquare deformation out of plane; sc= scissoring; wag = wagging; δ = bending; ν = stretching. *As intensidades das bandas do espectro ATR-FTIR que estão em unidade arbitrária foram normalizadas de 0 à 1. *As intensidades das bandas do espectro ATR-FTIR que estão em unidade arbitrária foram normalizadas de 0 à 1.

A banda de absorção no infravermelho do espectro ATR-FTIR localizada em 3436 cm⁻¹ corresponde ao estiramento das hidroxilas presentes nos constituintes químicos dos óleos, entre eles o 1-epi-Cubenol, α -cardinol, Cubenol e *cis*-Calameneno que não são componentes majoritários do óleo essencial da *V. gardneriana*, mas que têm a sua assinatura no espectro de absorção no infravermelho. Como é conhecido, os óleos essenciais são misturas complexas de moléculas, e as suas características espectrais são o resultado de sinergismo entre elas, e mesmo compostos químicos que participam na composição do óleo essencial em percentagem relativamente baixa podem ter uma contribuição importante no espectro vibracional de um óleo essencial (TEIXEIRA *et al.* 2018).

Na região espectral de número de onda superior a 2900 cm⁻¹ do espectro de infravermelho são esperados o aparecimento dos modos de estiramento dos grupos CH, CH₂ e CH₃ presentes nos constituintes químicos do óleo essencial das folhas da *V. gardneriana*. Podemos observar que a banda de absorbância mais intensa no espectro ATR-FTIR localizado em 2955 cm⁻¹ tem origem nas misturas de modos de estiramentos dos grupos metílicos, etílicos e CH das moléculas constituintes do óleo essencial de *V. gardneriana*, principalmente de seus constituintes majoritários. Na região de número de onda entre 1710 e 1100 cm⁻¹ do espectro

infravermelho do óleo essencial de *V. gardneriana* há predominância dos modos de estiramento dos carbono-carbono, e dos átomos de oxigênio-carbono. No entanto, nesta região também é possível observar modos de deformação angular dos grupos CH₂ e CH₃. O espectro ATR-FTIR mostrou uma fraca banda de absorbância em 1710 que corresponde ao estiramento do grupo carbono-carbono. Modo de deformação *scissoring* dos grupos etílicos foi observado com intensidade média no espectro infravermelho em 1453 cm⁻¹.

Na região de número de onda abaixo de 1100 cm⁻¹ do espectro infravermelho do óleo essencial de *V. gardneriana* há predominância dos modos de torção e deformações dos anéis aromáticos. A fraca banda de infravermelho observada em 1070 cm⁻¹ corresponde a mistura de modos de deformação dos átomos HCCC e torção dos átomos CCCC. Observa-se também uma banda de infravermelho muito fraca em 562 cm⁻¹ que corresponde a mistura de modos de deformação e torção dos átomos HCCC e deformação fora do plano dos CCCC dos anéis aromáticos.

3.3 Concentração inibitória mínima

O óleo extraído das folhas de *V. gardneriana* apresentou MICs de 1024µg/ mL para, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 06. Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 o óleo apresentou uma concentração inibitória de 32 µg/mL e *S. aureus* 10 de 161 µg/mL sendo percebido na leitura colorimétrica das placas de microdiluição. Resultado demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultado das concentrações inibitórias mínimas (CIM).

OEFVG	SA-ATCC 25923	EC-ATCC 25922	SA-10	EC- 06
		32 µg/mL	≥1024 µg/mL	161 µg/mL

3.4 Efeito da modificação antibiótica

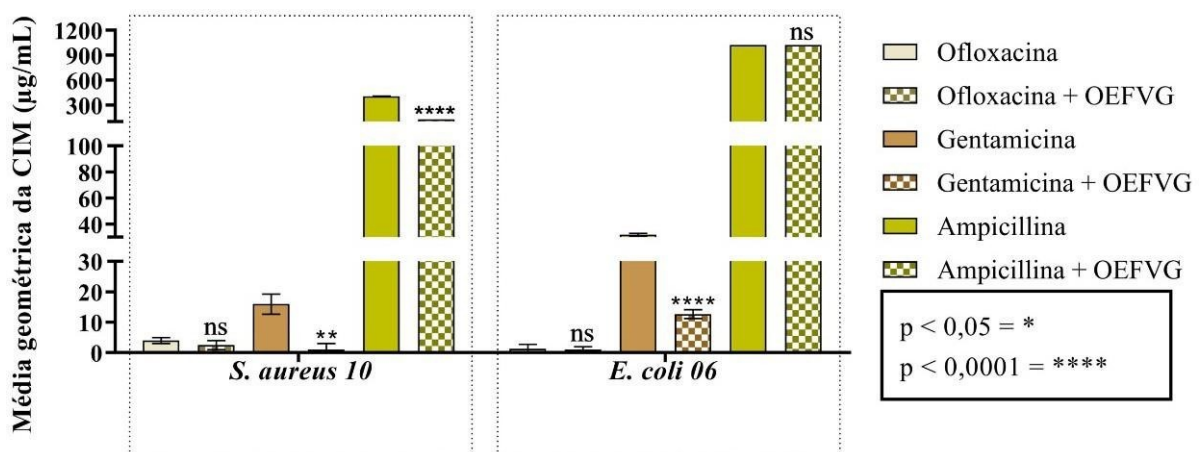


Figura 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos ofloxacina, gentamicina, e ampicilina na presença e na ausência do óleo essencial de *V. gardneriana*, em uma concentração CIM (128 µg/mL), frente a bactéria *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06.

O óleo essencial de *V. gardneriana* apresentou um o efeito modificador da ação antibiótica para as duas cepas testadas *S. aureus* 10 e *E.coli* 06 em relação ao antibiótico gentamicina da classe dos aminoglicosídeos, sinergismo esse que não foi observado nos demais antibiótico usados. Para o ofloxacino em associação com o óleo para a cepa *S. aureus* 10 revelaram valores indiferentes em relação ao seu controle, resultado parecido foi encontrado também para o antibiótico ampicilina paraa cepa *E.coli* 06.

A sensibilidade de um microrganismo a um óleo essencial varia dependentemente das propriedades do óleo e das características do microrganismo em si. O efeito do óleo de *V. gardneriana* pode ser atribuído à sua interação com peptídeos anfifílicos na membrana celular desordenando-os e resultando numa lise celular, danos esses observados em estudos usando óleos essenciais (AZEVEDO *et al.* 2016; MOLLICA *et al.* 2018). A quantidade de cada composto no óleo exibindo atividade antibacteriana também pode desempenhar um papel importante na sua eficácia (DEVI *et al.* 2012).

Os aminoglicosídeos são antibióticos inibidores da síntese proteica que têm como local de ação a subunidade 30S do ribossoma bacteriano sua síntese tem a produção de proteínas *non sense*, que ao serem integradas na membrana citoplasmática da bactéria, altera a sua permeabilidade seletiva. Deste modo, os aminoglicosídeos são considerados bactericidas. E ainda classificados como antibióticos de largo espectro, ativos contra bactérias aeróbias de Gram positivo e Gram negativo (SOUSA, 2006). Tendo em vista que essa associação desses compostos contribuiu de forma benéfica em ação antibiótica frente as cepas testas com o antibiótico gentamicina.

O efeito modulador contra *E. coli* foi observado de forma inesperada pois os micro-organismos Gram-positivos possuem mais suscetibilidade a antibióticos do que os micro-organismos gram-negativos como *E. coli* devido à sua composição da parede celular, o que dificulta a passagem de antibióticos (AZZOPARDI *et al.* 2013; GUIMARAES *et al.* 2010). *P. aeruginosa* apresenta vários mecanismos de resistência, por exemplo, a produção de beta-lactamase e o aumento da expressão de bombas de efluxo sendo que *S. aureus* apresenta alguns componentes que também lhe conferem capacidade de resistir as drogas (LIVERMORE, 2002) e, portanto, possui resistênciia uma ampla classes de antibióticos (FUENTEFRÍA *et al.* 2008).

Os resultados encontrados de atividade antibacteriana para esse óleo de *V. gardneriana* com as cepas testadas são inéditos. Acrescenta-se ainda que o experimento do efeito de combinação dos antibióticos testados com este produto natural é um achado relevante, pois mostrou efeito modulatório com antibióticos de uso clínico.

4 CONCLUSÃO

A análise espectroscópica do espectro ATR FT-IR do óleo essencial das folhas da *V. gardneriana* forneceu informação sobre os modos vibracionais das principais bandas de infravermelho. O óleo essencial de *V. gardneriana* apresentou uma atividade antibacteriana para as duas cepas de *S. aureus* testadas o que não foi observado para *E. coli*. Para o efeito modificador da ação antibiótica, as duas cepas testadas *S. aureus* 10 e *E.coli* 06 em relação ao antibiótico gentamicina apresentaram valores significantes.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio financeiro do CNPq e da FUNCAP. A.M.R. Teixeira, Ph.D., reconhece também o apoio financeiro do CNPq (subvenção nº: 305719/2018- 1), e FUNCAP/Edital Nº 03/2019 (processo DEP-0164-00234.01.00/19). H.S. Santos reconhece o apoio financeiro do FUNCAP (Subvenção nº: BP2-0107- 00026.01.00/15).

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, IZABELA *et al.* **Eficácia in vitro do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* Steud. Wats.) frente a bactérias entéricas de origem avícola.** Acta Veterinaria Brasilica v. 10, p. 25-31, 2016. <https://doi.org/10.21708/avb.2016.10.1.5467>

AZZOPARDI , A.; ELAINE, L. FERGUSON; DAVID, W. THOMAS. **The enhanced permeability retention effect: a new paradigm for drug targeting in infection.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy v. 68, p. 257-274, 2013. <https://doi.org/10.1093/jac/dks379>

BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications Chemistry of Essential Oils.** CRC Press, 2010. p. 39-82., New York, USA. <https://doi.org/10.1201/b19393>

CARMICHAEL, A.R. **Can Vitex Agnus Castus be Used for the Treatment of Mastalgia? What is the Current Evidence?** Evidence-based Complementary and Alternative Medicine v.5, p. 247-250, 2008. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem074>

CLSI, **Clinical and Laboratory Standards Institute - Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**, Sixth ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, pp. 14 - 18, 2003.

COUTINHO, H.D.M. *et al.* **In vitro anti-staphylococcal activity of Hyptis martiusii Benth against methicillin-resistant Staphylococcus aureus: MRSA strains.** Revista Brasileira de Farmacognosia v. 18, p. 670-675, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500005>

DEVI, L.R. *et al.* **Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Curcuma leucorrhiza Roxb.** Journal of Essential Oil Research v. 24, p. 533-538, 2012 <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.728089>

DUGOUA, J.J. *et al.* **Safety and efficacy of chastetree (Vitex agnus-castus) during pregnancy and lactation.** Journal canadien de pharmacologie clinique v. 15, e74-79, 2008.

FUENTEFRIA, D.B. *et al.* **Pseudomonas aeruginosa: spread of antimicrobial resistance in hospital effluent and surface water.** Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical v. 41, p. 470-473, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000500007>

GUIMARAES, D.O.; MOMESSO, L.D.; PUPO, M.T. **Antibiotics: Therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents.** Quimica Nova v. 33, p.667-679, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>.

LIVERMORE, D.M. **Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Pseudomonasaeruginosa: Our Worst Nightmare?** Clinical Infectious Diseases v. 34, p. 634-640, 2002. <https://doi.org/10.1086/338782>

MEENA, A.K. *et al.* **A review of the important chemical constituents and medicinal uses of Vitex genus.** Asian Journal of Traditional Medicines v. 6, p. 54-60, 2011.

MOLLICA, A. *et al.* **Arginine- and Lysine-rich Peptides: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity.** Letters in Drug Design & Discovery v. 15, p. 220-226, 2018. <https://doi.org/10.2174/1570180814666170213161341>

MONTEIRO, L.C.C.F. *et al.* **Atividade antioxidante, teor de fenóis e atividade larvicida frente ao Aedes aegypti de Vitex gardneriana Schauer.** 5º Encontro Regional de Química & 4º Encontro Nacional de Química 3, 2015.

ONO, M. *et al.*, **Five New Diterpenoids, Viteagnusins A-E, from the Fruit of Vitex agnus- castus.** Chemical & Pharmaceutical Bulletin v. 56, p. 1621-1624, 2008. <https://doi.org/10.1248/cpb.56.1621>

SÁ BARRETO, L.C.L. *et al.* **Avaliação Preliminar da Atividade Biológica e Toxicidade Aguda de Vitex gardneriana Schauer (Verbenaceae).** Latin American Journal of Pharmacy v.27, p. 909-913, 2008.

SÁ BARRETO, L.C.L. **Estudo farmacognóstico e determinação da atividade biológica de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae)**, Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife -PE, p. 114, 2004.

SÁ BARRETO, L.C.L. et al. **Atividade moluscicida de extratos e de aucubina de *Vitexgardneriana* Schauer (Verbenaceae) em embriões da *Biomphalaria glabrata***. Latin American Journal of Pharmacy v. 26, p. 339-343, 2007

SÁ BARRETO, L.C.L. et al. **Ecdisteróide e iridóide glicosilado de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae)**. Revista Brasileira de Farmacognosia v. 15, p. 51-54, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2005000100011>.

SILVA, P.T. et al. **Seasonal variation in the chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Vitex gardneriana* Schauer**. South African Journal of Botany v. 124, p. 329-332, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.036>

SOUSA, J.C.D. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**, 2ª ed. Universidade FernandoPessoa, 2006.

STUART, B.H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**, 1ª ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2004.

TEIXEIRA, A.M.R. et al. **Vibrational spectroscopy study of essential oils from *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng and *Vanillosmopsis arborea* Baker**. Vibrational Spectroscopy v. 98, p. 22-29, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.05.008>.

6. DISCUSSÃO GERAL

A biodiversidade brasileira é considerada uma das maiores e mais variadas do mundo com ampla utilização, desde a explosão comercial extrativista ou uso na medicina popular por busca de produtos com ações terapêuticas. Desta forma o conhecimento e manejos de conservação são necessários para garantia e manutenção desta biodiversidade. Dentre esses produtos os mais utilizados estão os óleos essenciais, pois apresenta uma complexidade de compostos químicos que expressam diversos usos na cadeia produtiva alimentícia, perfumes e por suas atividades biológicas e farmacológicas.

Estudos envolvendo sazonalidade de óleos essenciais demonstram sua importância por permitir conhecer e estabelecer as condições necessárias para melhor utilização e rendimento. Desta forma, efeitos de sazonalidade podem ser essenciais para entender sua influência na composição química dos óleos essenciais como mostrado neste trabalho. Esta composição pode mudar de acordo com as condições a eles submetidas, pois em determinados períodos existem maiores disponibilidades de fatores que possam interferir na sua produção. Como observado a importância deste trabalho com relação as variações sazonais, mostra como a sua interferência pode modificar a variação e quantidade dos compostos de um período para outro afetando assim à atividade direta dos óleos essenciais.

Segundo Lee e Ding (2016) os metabolitos secundários e sua produção estão ligadas diretamente a fatores climáticos. Entre esses fatores tem destaque a sazonalidade e o ritmo circadiano, pois está ligado de certa forma com a quantidade e qualidade dos compostos químicos que compõem os óleos essenciais, sendo que não são constantes durante o ciclo anual e muito menos durante o ciclo diário (RAMOS *et al.*, 2020).

Estudos tem mostrado o efeito dos óleos essenciais frente a micro-organismos patogênicos de interesse clínico está intimamente ligada à sua composição química. Correlacionando esses efeitos, estes produtos naturais apresentam-se promissores como novos agentes a serem utilizados na farmacêutica, como a importância deste presente estudo na inibição de micro-organismos patogênicos através da análise e do uso da espécie vegetal em questão. Sabendo-se que estas informações neste trabalho descritas

mostram como determinados fatores, no caso variações sazonais implicam na atividade direta contra esses agentes.

Trabalhos como o de Freitas *et al.*, (2020), que mostra atividade do óleo essencial de *Baccharis coridifolia* frente à cepas multirresistentes, mostram como apresentou uma atividade clinicamente relevante na utilização destes produtos provenientes de plantas e de sua associação com antibióticos, contribuindo de forma sinérgica na melhora da ação antibiótica. Em pesquisa de Silva *et al.*, (2019) que usou os óleos essenciais de *Eugenia brasiliensis* e *Piper mosenii* contra cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* também encontraram resultados relevantes quando associado a antibióticos da classe dos aminoglicosídeos especialmente contra cepas gram-negativas, tornando assim importante os estudos de óleos essenciais e de como a biodiversidade tem ligação direta quanto a essa variabilidade de compostos químicos que expressam tais atividades. Estes estudos acima mencionados corroboram com o apresentado nos resultados desta pesquisa publicada no artigo já publicado na seção 1.

Como no trabalho de Schindler, Silva e Heinzmann (2018) com o óleo essencial de folhas de *Piper gaudichaudianum* não apresentou variação sazonal do rendimento para a planta estudada. Portanto, a coleta de folhas para a obtenção desse extrativo pode ser realizada em qualquer época do ano, caso como esse que a sazonalidade não interfere na produção. Entretanto, o trabalho de Lourenço *et al.* (2020) mostrou que o óleo essencial das folhas de *Dimorphandra mollis* Benth houve variação sazonal, sendo possível identificar que no inverno foi determinada a estação mais indicada para obtenção de um teor maior do óleo essencial, e a primavera para maior concentração do componente majoritário do óleo (Z.Z)-farnesol que pertence ao grupo dos sesquiterpenos oxigenados. Mostrando assim que a sazonalidade pode ou não afetar a produção e variabilidade dos compostos químicos presentes nos os óleos essenciais.

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Compreender como a variabilidade a partir de fatores como a sazonalidade pode interferir na composição química e até mesmo nas características qualitativas e quantitativas dos compostos foi o foco de estudo. Os efeitos da sazonalidade na composição química, caracterização espectroscópica e na atividade antibacteriana do óleo essencial de *vitex gardneriana* contra cepas multirresistentes contribuiu com informações relevantes, para uma espécie vegetal que apresenta poucas informações na literatura, o que torna relevante o presente estudo de forma a fornecer os resultados obtidos, a importância de seu uso e mostrar que a biodiversidade pode ser uma ferramenta biotecnológica poderosa para a saúde humana propiciando uma alternativa de tratamento de diversas doenças.

8. CONCLUSÃO

Este estudo permitiu a caracterização sazonalidade dos óleos essenciais das folhas de *V. gardneriana* usando a espectroscopia (ATR-FTIR) cruzando os espectros de absorbância das bandas espectrais com o período sazonal. A principal influência da sazonalidade sobre a composição química foi no mês de junho (último mês da estação chuvosa). Em relação ação antibacteriana foi observado que uma grande variabilidade frente a cepa de *S.aureus* ATCC, havendo baixa influência sobre *E. Coli* e *S. aureus* isolada clínica. Quando associados aos antibióticos, observou que a sazonalidade contribui para variações na concentração inibitória mínima promovendo efeitos sinérgicos ou antagonicos. A diferença química observada entre as estações pode explicar a diferença na atividade antimicrobiana e modificador da resistência bacteriana. Por fim, os resultados servem como guia de referência para a escolha período adequado de obtenção deste óleo essencial visando seu potencial antibacteriano e sua capacidade de reduzir o perfil de resistência bacteriana.

9. ANEXO A: COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DE ARTIGO ORIGINAL DA DISSERTAÇÃO

Current Microbiology
https://doi.org/10.1007/s00284-020-02226-6



Seasonality Effects on Antibacterial and Antibiotic Potentiating Activity against Multidrug-Resistant Strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and ATR-FTIR Spectra of Essential Oils from *Vitex gardneriana* Leaves

Raimundo Luiz Silva Pereira¹ · Thiago Sampaio de Freitas¹ · Priscilla Ramos Freitas¹ · Ana Carolina Justino de Araújo¹ · Fábria Ferreira Campina¹ · Kleber Ribeiro Fidelis¹ · Jean Parcelli Costa do Vale² · Antônio César Honorato Barreto³ · Henrique Douglas Melo Coutinho¹ · Paulo Nogueira Bandeira² · Alexandre Magno Rodrigues Teixeira¹ · Hécio Silva dos Santos^{1,2}

Received: 17 April 2020 / Accepted: 23 September 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Plants are natural sources of several bioactive substances, which have been found in extracts, secondary metabolites, and essential oils. Several biological activities have been attributed to essential oils as antiviral, insecticidal, antiparasitic, antioxidant, and antimicrobial. The indiscriminate use of antibiotics has increased the development of resistance mechanisms of microorganisms. Thus, search for efficient natural compounds with antimicrobial activity and low toxicity has increased, so essential oils have been a promising alternative for combating microbial infections. This study was carried out to investigate the seasonality effects on the infrared absorbance spectra, antibacterial activity, and antibiotic potentiating activity of essential oils from *Vitex gardneriana* leaves. Essential oils were extracted from *V. gardneriana* Schauer leaves the seasonal period from January to December 2016 and characterized by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. The antibacterial effect of these oils and antibiotic potentiating activity, both determined by the minimum inhibitory concentration, were assessed using microtiter plates. For the first time, we present the use of infrared absorbance spectra of these essential oils and show the influence of seasonality on them. Synergistic effects were observed for the essential oils associated with the antibiotics tested (gentamicin, ampicillin, and ofloxacin). The main influence of seasonality on the infrared absorbance spectra of the essential oils of the *V. gardneriana* occurred in the June month (last month of the rainy season). In regard to antibacterial activity test, the essential oils of the *V. gardneriana* leaves did not show a direct effect on the strains tested. However, the essential oils when associated with the antibiotics showed variations in the minimum inhibitory concentration with the months of the seasonal period, indicating synergistic effects against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial resistance

Introduction

Plants are natural sources of several bioactive substances, which have been found in extracts, secondary metabolites, and essential oils [1]. Essential oils are defined as products from the secondary metabolism of plants. Regarding the composition, are complex mixtures of volatile substances, lipophilic, usually odoriferous, and liquid state [2]. Several biological activities have been attributed to essential oils as

antiviral [3]; insecticidal [4]; antiparasitic [5]; antimicrobial and antioxidant [6–8].

Antimicrobial resistance has become the main problem in public health in the world, which affects all countries. A rapid increase in the incidence and prevalence of opportunistic bacterial infections has been observed over the past few years. In addition, the indiscriminate use of antibiotics has increased the development of resistance mechanisms of microorganisms. Thus, the search for efficient natural compounds with antimicrobial activity and low toxicity [9] has increased, so that essential oils have been a promising alternative for combating microbial infections [10].

✉ Hécio Silva dos Santos
helciodossantos@gmail.com

Extended author information available on the last page of the article

10. ANEXO B: COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DE CAPÍTULO DE LIVRO ORIGINAL DA DISSERTAÇÃO

CAPÍTULO 6

ANÁLISE DO ESPECTRO INFRAVERMELHO, INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E POTENCIALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *VITEX* *GARDNERIANA* SCHAUER

Data de aceite: 01/09/2020

Data de submissão: 01/06/2020

Raimundo Luiz Silva Pereira

Universidade Regional de Cariri
Crato, CE, Brasil
<https://orcid.org/0000-0001-8205-7120>

Ana Carolina Justino de Araújo

Universidade Regional de Cariri
Crato, CE, Brasil
<https://orcid.org/0000-0001-9261-3901>

Paulo Nogueira Bandeira

Universidade Estadual Vale do Acaraú
Sobral, CE, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7212288309449337>

Henrique Douglas Melo Coutinho

Universidade Regional de Cariri
Crato, CE, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-6634-4207>

Jean Parcelli Costa do Vale

Universidade Estadual Vale do Acaraú
Sobral, CE, Brasil
<https://orcid.org/0000-0001-5598-8886>

Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

Universidade Regional de Cariri
Crato, CE, Brasil
<https://orcid.org/0000-0001-6786-2076>

Hélcio Silva dos Santos

Universidade Estadual do Ceará
Fortaleza, CE, Brasil
<https://orcid.org/0000-0001-5527-164X>

RESUMO: As plantas são fontes naturais de várias substâncias bioativas, encontradas em extratos, metabólitos secundários e óleos essenciais. Várias atividades biológicas foram atribuídas aos óleos essenciais como antivirais, inseticidas, antiparasitários, antioxidantes e antimicrobianos. O uso indiscriminado de antibióticos aumentou o desenvolvimento de mecanismos de resistência de microrganismos. Assim, a busca por compostos naturais eficientes com atividade antimicrobiana e baixa toxicidade aumentou, portanto os óleos essenciais têm sido uma alternativa promissora no combate às infecções microbianas. Este estudo foi realizado para investigar a composição química e espectros de absorvância no infravermelho, atividade antibacteriana e atividade potencializadora de antibióticos de óleos essenciais de folhas de *V. gardneriana*. Os óleos essenciais foram extraídos das folhas de *V. gardneriana* e caracterizados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier por refletância total atenuada (ATR-FTIR). O efeito antibacteriano desses óleos e a atividade potenciadora de antibióticos, ambos determinados pela concentração inibitória mínima, foram avaliados usando placas de microtitulação. Pela primeira vez, apresentamos o uso de espectros de absorvância infravermelha desses óleos essenciais e mostramos a influência da sazonalidade sobre eles. Efeitos sinérgicos foram observados para os óleos essenciais associados aos antibióticos testados (gentamicina, ampicilina e ofloxacina). Em relação ao teste de atividade antibacteriana, os óleos essenciais das folhas de *V. gardneriana* não apresentaram efeito direto nas cepas

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C. *et al.* Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 11, n. 4, p. 252, 2018.
- ANVISA, 2015. Relatório da resistência microbiana em infecções primárias de corrente sanguínea confirmadas laboratorialmente associadas a cateter venoso central em unidades de terapia intensiva (2014). **Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde**, v. 12, n. 2014, p. 57, 2015.
- AHMAD, F. B.; HOLDSWORTH, D. K. Traditional medicinal plants of sabah, Malaysia part III. The rungus people of kudat. **Pharmaceutical Biology**, v. 33, n. 3, p. 262–264, 1995.
- ALI, J.; RAFIQ, Q. A.; RATCLIFFE, E. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. **Future Science OA**, v. 4, n. 4, 2018.
- ALMEIDA, C. A. Biodiversidade e as estratégias de manejo para conservação de espécies ameaçadas de extinção na Amazônia. *In*: MARTINS, M.B *et al.* **Reflexões em biologia da conservação**. 2.ed. Belém, Pará: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2020. cap.16, p. 254- 260.
- ANDRADE, S. E. O. DE *et al.* Estudo etnoveterinário de plantas medicinais na comunidade Várzea. **Revista Verde (Mossoró – RN)**, v. v. 7, p. 193–198, 2012.
- ARAÚJO, A.C.J. *et al.* Essential oil of *Croton ceanothifolius* Baill. potentiates the effect of antibiotics against multiresistant bacteria. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 27, 2020.
- ARJIN, C.; TAPINGKAE, W. Use of Phytogetic Compounds as Antibiotics Substitute in Monogastric Animal Diets. **Thai-Journal-of-Animal-Science**. 1. 11-20, 2014.
- BARANSKA, M. *et al.* Chemotaxonomy of aromatic plants of the genus *Origanum* via vibrational spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 6, p. 1241–1247, 2005.
- BARBIERI, R. *et al.* Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiological Research**, v. 196, p. 44–68, 2017.
- BATTEY, N. H. Aspects of seasonality. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 352, p. 1769–1780, 2000.
- BELLO, A.; DINGLE, T. C. What's That Resistance Mechanism? Understanding Genetic Determinants of Gram-Negative Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 40, n. 20, p. 165–174, 2018.
- BERNARDINO, A. C. S. S. *et al.* Spectroscopic and microbiological characterization of labdane diterpene 15,16-epoxy-4-hydroxy-labda-13(16),14-dien-3,12-dione isolated

from the stems of *Croton jacobinensis*. **Journal of Molecular Structure**, v. 1147, p. 335–344, 2017.

BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.

BOSS, R.; OVERESCH, G.; BAUMGARTNER, A. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, enterococci, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* from raw fish and seafood imported into Switzerland. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 7, p. 1240–1246, 2016.

BRASIL. Plano nacional para a prevenção e o controle da resistência microbiana nos serviços de saúde. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA**, 2017.

BRANT, R. S. *et al.* Teor do óleo essencial de cidrão [*Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton] em função da variação sazonal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 2, p. 83-88, 2008.

CAVALCANTI, C. A; DE ANDRADE, Y. V. S; LIMA, C. G. Estudo Etnobotânico sobre a contribuição do uso de plantas medicinais utilizadas no Sítio Frexeira Velha, pertencente ao Município de Pesqueira–PE. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 94929-94940, 2020.

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

CAMPELO, M. J. M. *et al.* Synthesis, crystal structure, vibrational spectra and theoretical calculations of quantum chemistry of a potential antimicrobial Meldrum's acid derivative. **Journal of Molecular Structure**, v. 1146, p. 828–836, 2017.

CARDOSO, J. C.; DE OLIVEIRA, M. E. B. S.; CARDOSO, F. DE C. I. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124–132, 2019.

CARMICHAEL, A. R. Can *Vitex Agnus castus* be used for the treatment of mastalgia? What is the current evidence? **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 247–250, 2008.

CUI, H. *et al.* **CORRELATION BETWEEN DISSOLVED GASES AND OIL SPECTRAL RESPONSE**. 1st International Conference on Electrical Materials and Power Equipment (ICEMPE). **Anais...2017** Disponível em: <https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1094129051?and_facet_journal=jour.1138233>

DANTAS, R. C. C. **Estudo epidemiológico molecular da resistência aos carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue: produção de β -lactamases, perda de porina OprD e hiperexpressão de bombas de efluxo**. 2015. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicada) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

- DE MORAES, I. C.; VILLARROEL, S. L.; PEREIRA, V. C. Detecção de resistência à meticilina e aos macrolídeos em *staphylococcus aureus* isolados de jaleco. *In: Colloquium Vitae. ISSN: 1984-6436*. 2018. p. 34-41.
- DA SILVA, R. O. M. *et al.* Photoinduced antibacterial activity of the essential oils from *Eugenia brasiliensis* Lam and *Piper mosenii* C. DC. by Blue Led Light. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, 2019.
- DIAS, D. *et al.* Repatriation data: More than two million species occurrence records added to the Brazilian biodiversity information facility repository (SIBBR). **Biodiversity Data Journal**, v. 5, n. 1, 2017.
- DJILANI, A.; DICKO, A. The therapeutic benefits of essential oils. **Nutrition, Well-Being and Health**, 2012.
- DUGOUA, J.-J. *et al.* Safety and efficacy of chastetree (*Vitex agnus-castus*) during pregnancy and lactation. **Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology**, v. 15, n. 1, 2008.
- EFFERTH, T. *et al.* Medicinal plants and phytochemicals against multidrug-resistant tumor cells expressing ABCB1, ABCG2, or ABCB5: a synopsis of 2 decades. **Phytochemistry Reviews**, v. 20, n. 1, p. 7-53, 2021.
- FRANÇA, F. Lectotypification of Brazilian species of *Vitex* Tour . ex L . (Lamiaceae) Lectotipificação de espécies brasileiras de *Vitex* Tour . ex L . (Lamiaceae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 5, n. 3, p. 357–359, 2010.
- FREITAS, P. *et al.* Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against multiresistant strains. **Microbial pathogenesis**, v. 145, p. 104223, 2020.
- GATTI, A. *et al.* Seasonality effect on the allelopathy of cerrado species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3 suppl 1, p. S064–S069, 2014.
- GOMES, E. M. C. *et al.* Efeito inibitório in vitro de extratos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume no controle de *Cylindrocladium candelabrum*. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 4, p. 1559-1567, 2018.
- GOUVEA, D. R.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. The influence of biotic and abiotic factors on the production of secondary metabolites in medicinal plants. **Plant bioactives and drug discovery: principles, practice, and perspectives**, v. 17, p. 419, 2012.
- GRUMANN, D.; NÜBEL, U.; BRÖKER, B. M. *Staphylococcus aureus* toxins - Their functions and genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 583–592, 2014.
- REFLORA,2020: Projeto Flora Brasil 2020 - Projeto Flora do Brasil 2020. v393.274. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Conjunto de dados / lista de verificação. doi: 10.15468 / 1mtkaw

- HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguesia**, v. 63, n. 1, p. 129–144, 2012.
- JANG, J. *et al.* Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 570–581, 2017.
- JAVADPOUR, M. M. *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.
- KHAMENEH, B. *et al.* Review on plant antimicrobials: A mechanistic viewpoint. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 1, 2019.
- KHAN, B. A. *et al.* Investigational therapies targeting quorum-sensing for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 24, n. 5, p. 689–704, 2015.
- LEE, A. S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. May, p. 1–23, 2018.
- LEE, Y. L.; DING, P. Production of essential oil in plants: ontogeny, secretory structures and seasonal variations. **Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews**, v. 2, n. 1, 2016.
- LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. 13. Ed. Artmed Editora. San Diego, Californial, 2016.
- LOPES, P.*et al.* Análise da frequência e do perfil de sensibilidade da escherichia coli como agente causador de infecções do trato urinário na microrregião de viçosa, mg. **Anais Simpac**, v. 2, n. 1, 2015.
- LOURENÇO, H. A. O. *et al.* Influência da sazonalidade e do ritmo circadiano no teor e composição química do óleo essencial de faveira (*Dimorphandra mollis* Benth.). 2020.
- MACEDO, I. *et al.* Structural and microbiological characterization of 5-hydroxy-3, 7, 4'-trimethoxyflavone: a flavonoid isolated from *Vitex gardneriana* Schauer leaves. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 3, p. 434-438, 2019.
- MARQUES, A. N. L. *et al.* Vibrational spectroscopy and DFT calculations of flavonoid derriobtusone A. **Journal of Molecular Structure**, v. 1130, p. 231–237, 2017.
- MARTINS, F. W. P.; CASALI, A. K. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos etanólicos de Romã (*Punica granatum*,L.) sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 22970–22980, 2019.
- MEENA, A. *et al.* A review of the important chemical constituents and medicinal uses of *Vitex* genus. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 6, n. 2, p. 54–60, 2011.

- MELO, R. S. *et al.* Chemical composition and antimicrobial effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. essential oil against multidrug-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Molecules**, v. 24, n. 21, 2019.
- MISHRA, A. P. *et al.* Combination of essential oils in dairy products: A review of their functions and potential benefits. **Lwt**, v. 133, p. 110116, 2020.
- MORAIS, S. M. *et al.* Atividades antioxidantes e anticolinesterásicas do extrato das folhas de Jaramataia (*Vitex gardneriana* Schauer). **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, v. 6, n. 5, p. 28802-28810, 2020.
- MENDES, R. A. G. **Utilização da espectroscopia em reflectância no infravermelho próximo para discriminação de espécies da família Myrtaceae**. 2014. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2014.
- MENDES, R. R. *et al.* Perfil bacteriológico das mãos de profissionais de saúde no centro cirúrgico e no pós-operatório do hospital geral de Palmas, Tocantins. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 3, n. 1, p. 44–60, 2016.
- MONTEIRO, L. C. C. F. *et al.* Atividade antioxidante, teor de fenóis e atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* de *Vitex gardneriana* Schauer. **Blucher Chemistry Proceedings**, v. 3, n. 1, p. 292–300, 2015.
- MORAIS, S. M. DE *et al.* Plantas medicinais usadas pelos índios Tabépas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 169–177, 2005.
- MORALES-DEL-RIO, J. A. *et al.* Anti-inflammatory activity and changes in antioxidant properties of leaf and stem extracts from *Vitex mollis* Kunth during in vitro digestion. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- MOREHEAD, M. S.; SCARBROUGH, C. Emergence of global antibiotic resistance. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 45, n. 3, p. 467–484, 2018.
- MUNITA, JOSE M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens**, p. 481–511, 2016.
- NCUBE, B.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 2, p. 387–396, 2011.
- OLIVEIRA, 2020. **Caracterização, sazonalidade e atividade inseticida de acessos de varronia curassavica jacq.** 2019. Doutorado (Doutorado em Agricultura e Biodiversidade), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2019.
- OLIVEIRA, D. L. *et al.* Integrando conhecimentos: uma abordagem etnobotânica para o ensino de ciências. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 64202-64219, 2020.
- ONO, M. *et al.* Five new diterpenoids, viteagnusins A-E, from the fruit of *Vitex agnus-*

castus. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 11, p. 1621–1624, 2008.

OZKAN, G.; BAYDAR, H.; ERBAS, S. The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of *Turkish oregano* (*Origanum onites* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 2, p. 205–209, 2010.

PALAVECINO E. L. Clinical, Epidemiologic, and Laboratory Aspects of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. In: Ji Y. (eds) **Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols. Methods in Molecular Biology**, vol 2069, Humana, New York, NY, 2020. p. 1-28.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

PEDROLLO, C. T. *et al.* Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 111–124, 20 jun. 2016.

PIEROZAN, M. K. *et al.* Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of salvia L. species. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 764–770, 2009.

POORABBAS, B. *et al.* Nosocomial infections: Multicenter surveillance of antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* and Gram negative rods isolated from blood and other sterile body fluids in Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 127–135, 2015.

PORMOHAMMAD, A.; NASIRI, M. J.; AZIMI, T. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: A systematic review and meta-analysis. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 1181–1197, 2019.

RAMOS, C. P. **Patotipos diarreogênicos e filogrupos de *Escherichia coli* isolada em fezes de cães e reptéis não diarreicos** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

RAMOS, J. L. *et al.* Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 743–768, 2002.

RAMOS, Y.J. *et al.* Produção e variações químicas de óleos essenciais: uma breve revisão sobre os fatores que afetam a qualidade e a quantidade. In: DA COSTA-OLIVEIRA, C. *et al.* **Avanços científicos, tecnológicos e de inovação na botânica. Ponta grossa**, Paraná, Atena, 2020. Cap.7, p.79-104

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

- REDDY, P. R. *et al.* Plant secondary metabolites as feed additives in calves for antimicrobial stewardship. **Animal Feed Science and Technology**, v. 264, p. 114469, 2020.
- REMPEL C. *et al.* Efeito antimicrobiano de plantas medicinais: uma revisão de estudos científicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 4, p. 57-82, 2019.
- RIBEIRO, M; CORTINA, M. As principais bactérias de importância clínica e os mecanismos de resistência no contexto das infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS). **Revista Científica UMC**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2016.
- RIBEIRO *et al.*, 2019. Impactos do Programa Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade (Sisbiota Brasil). p. 119–132.
- ROHMAN, A. **The use of infrared spectroscopy in combination with chemometrics for quality control and authentication of edible fats and oils: A review.** p. 1–44, 2016.
- ROSA, L. M. T; SABONARO, D. Z. A importância da diversidade biológica na política de patentes atrelada aos processos biotecnológicos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 17, n. 2, 2020.
- ROQUE, A. D. A. **Potencial de uso dos recursos vegetais em uma comunidade rural do semi-árido do rio potencial de uso dos recursos vegetais em uma comunidade rural do semi-árido do rio grande.** 2009. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.
- SÁ-BARRETO, L. C. L. DE *et al.* Ecdisteróide e iridóide glicosilado de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 51–54, 2005.
- SÁ-BARRETO, L. C. L. DE *et al.* Atividade moluscicida de extratos e de aucubina de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae) em embriões da *Biomphalaria glabrata*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 339–343, 2007.
- SÁ-BARRETO, L. C. L. *et al.* Avaliação preliminar da atividade biológica e toxicidade aguda de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 909–913, 2008.
- SÁ BARRETO, L. C. L. **Estudo farmacognóstico e determinação da atividade biológica de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae).** Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife -PE, p. 114, 2004.
- SCHULZ, H. *et al.* Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 39, n. 2, p. 249–256, 2005.

- SHARIFI-RAD, J. *et al.* **Biological activities of essential oils: From plant chemocology to traditional healing systems.** [s.l: s.n.]. v. 22
- SCHINDLER, B.; SILVA, D. T.; HEINZMANN, B. M. Efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 263-273, 2018.
- SILVA, T. F.; OLIVEIRA, A. B. Plantas leishmanicidas da Amazônia Brasileira: uma revisão. **Revista Fitos**, v. 10, n. 3, p. 339–363, 23 fev. 2017.
- SILVA, L. S.; DA SILVA J. M.; TAKETANI, N. F. DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA POR MOLÉCULAS NÃO ANTIBIÓTICAS. **Revista Ensaio Pioneiros**, v. 3, n. 2, p. 37-47, 2019.
- SILVEIRA, L.; MARQUES, A.; MACHADO, J. Patotipos de *Escherichia coli* associados a infecções entéricas entre 2002 e 2012. **Boletim Epidemiológico do Instituto Nacional de Saúde**, v. 1, n. 8, p. 1–4, 2013.
- SULTAN, I. *et al.* Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, 2018.
- TEIXEIRA, A. M. R. *et al.* Vibrational spectroscopy study of essential oils from *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng and *Vanillosmopsis arborea* Baker. **Vibrational Spectroscopy**, v. 98, p. 22–29, 2018.
- TINTINO, S. R. **Avaliação da inibição de bombas de efluxo em linhagens de *Staphylococcus aureus* por substâncias sintéticas de origem natural.** 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2018.
- TIWARI, ; RANA, C. S. Plant secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research and General Science**, v. 3, n. October, p. 153–159, 2015.
- TONG, S. Y. C. *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.
- TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12. Ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.
- TRONCOSO, C. *et al.* Structural and physiological implications of bacterial cell in antibiotic resistance mechanisms/implicancias estructurales y fisiologicas de la celula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiotica. **International Journal of Morphology**, v. 35, n. 4, p. 1214-1224, 2017.
- UPRETI, N. *et al.* Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, multidrug resistant and extended spectrum β -lactamase producing gram negative bacilli causing wound infections at a tertiary care hospital of Nepal 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sci. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2018.

VALE, J. P. C. **Potencial biotecnológico de plantas da Caatinga: atividade antibacteriana e antioxidante de constituintes fixos e voláteis de *Vitex gardneriana* e *Croton piauhiensis***. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Federal do Ceará/Renorbio, Fortaleza, 2015.

WANI A. R. *et al.* An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. **Microbial Pathogenesis**, p. 104620, 2020.

YAP, P. S. X. *et al.* Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal**, v. 8, n. 1, p. 6–14, 2014.

ZARDO, A., *et al.* Levantamento de informações etnobotânicas, etnofarmacológicas e farmacológicas registradas na literatura sobre, *Tropaeolum majus*L. (Chaguinha). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, 20 (3), 195–198, 2016.