



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA CENTRO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA – DQB PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA – PPQB**

EDUARDO LOURENÇO DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E POTENCIALIZADORA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) E O EFEITO DO SEU CONSTITUINTE
MAJORITÁRIO β -CARIOFILENO**

Crato – CE

2021

EDUARDO LOURENÇO DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo
Coutinho

Coorientador: Prof. Dr. Saulo Relison Tintino

Crato – CE

2021

EDUARDO LOURENÇO DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E POTENCIALIZADORA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) E O EFEITO DO
SEU CONSTITUINTE MAJORITÁRIO β -CARIOFILENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

Dissertação defendida e aprovado em __/__/__

Banca Examinadora

Prof^o Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Orientador
(Universidade Regional do Cariri)

Prof. Dr. Luiz Everson da Silva
Membro Externo
(Universidade Federal do Paraná)

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira
Membro Interno
(Universidade Regional do Cariri)

RESUMO

Aloysia gratíssima (Verbenaceae), popularmente conhecida como alfazema-do-Brasil, tem sido amplamente utilizada na medicina popular brasileira como analgésico e antimicrobiano. Estudos fitoquímicos identificaram o β -cariofileno como um dos principais componentes do óleo essencial desta planta. Este sesquiterpeno bioativo demonstrou ter atividades antiinflamatórias e antibacterianas. Assim, o estudo teve como objetivo realizar a caracterização química bem como avaliar a atividade antibacteriana e potencializadora de antibióticos do OE de *Aloysia gratíssima* (EOAG) e seu principal composto β -cariofileno. A análise fitoquímica foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). A atividade antibacteriana e ação potencializadora frente as cepas *Pseudomonas aeruginosa* 24, *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06 foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo avaliando a redução na concentração inibitória mínima (CIM). A análise de GC-MS do EOAG identificou 30 compostos, incluindo como o componente principal o β -cariofileno. Tanto EOAG quanto o β -cariofileno apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus*, além de potencializarem a ação da norfloxacin contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Essa ação antibacteriana e potencializadora pode ser inferida devido à presença de terpenos no OE. Em conclusão, tanto EOAG quanto o β -cariofileno têm um potencial notável para o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas. Porém, mais pesquisas são necessárias para caracterizar os mecanismos moleculares de ação dessas substâncias no modelo utilizado no presente estudo.

Palavras-chave: *Aloysia gratíssima*. β -cariofileno. Óleo essencial. Atividade antibacteriana. Microdiluição.

ABSTRACT

Aloysia gratissima (Verbenaceae), popularly known as lavender, has been widely used in Brazilian folk medicine as analgesic, expectorant and antimicrobial. Phytochemical studies have identified β -caryophyllene as one of the major components of the essential oil of this plant. This bioactive sesquiterpene has been shown to have anti-inflammatory and antibacterial activities. Thus, the present study aimed to characterize the chemical profile and evaluate the antibacterial and antibiotic-enhancing activities of the essential oil obtained from *Aloysia gratissima* (EOAG) and its major compound β -caryophyllene. The phytochemical analysis was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* 24, *Staphylococcus aureus* 10, and *Escherichia coli* 06 was assessed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using the broth microdilution method. A reduction in the MIC of the antibiotics against strains treated simultaneously with the essential oil or β -caryophyllene was interpreted as enhanced antibiotic activity. The GC-MS analysis of the EOAG identified 30 compounds, including β -caryophyllene as the major component. Both EOAG and β -caryophyllene presented antibacterial activity against *S. aureus*, in addition to potentiating the action of norfloxacin against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli*. These substances also reversed the degree of antibiotic resistance to gentamicin and erythromycin in cultures of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, respectively. In conclusion, both EOAG and β -caryophyllene have a notable potential for the development of new therapies against bacterial resistance. However, further research is needed to characterize the molecular mechanisms of action of these substances in the model used in the present study.

Keywords: *Aloysia gratissima*. β -caryophyllene. Essential oils. Antibacterial activity. Microdilution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do β -cariofileno	17
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

URCA – Universidade Regional do Cariri

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute

EHEC – *Escherichia coli* Enterohemorrágica

EAEC – *Escherichia coli* Enteroagregativa

EPEC – *Escherichia coli* Enteropatogênica

ETEC – *Escherichia coli* Enterotoxigênica

EIEC – *Escherichia coli* Enteroinvasora

EOAG – Óleo Essencia de *Aloysia gratissima*

CG/EM – Cromatografia Gasoso acoplada à Espectrometria de Massas

DIC – Detector de Ionização por Chama

DMSO – Dimetilsulfóxido

OE – Óleo Essencial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	8
1.1 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS	8
1.2 ESTRATÉGIAS DA PESQUISA	9
1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	10
2 CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1 TERAPIAS COM ANTIBIÓTICOS	12
2.2 BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO	13
2.2.1 <i>Eschechiria coli</i>	13
2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.2.3 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	14
2.3 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS E SEUS ÓLEOS ESSENCIAIS	15
2.4 TERPENOS	16
2.5 O SESQUITERPENENO β -CARIOFILENO	16
2.6 <i>Aloysia gratissima</i>	17
2.6.1 Metabólitos secundários	18
REFERÊNCIAS	20
3. CAPÍTULO II: MANUSCRITO	25
4. CAPÍTULO III: CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
4.1 CONCLUSÕES GERAIS	43
4.2 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS	43
5. ANEXOS	44
5.1 PRODUÇÃO CINÉTICA LIGADA AO MESTRADO	44
6. APÊNDICE	46
6.1 METODOLOGIA ESTENDIDA (METHODX)	46

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

A utilização de antibióticos de forma exacerbada cresce em nível mundial. Muitos utilizam esses fármacos sem prescrição médica e de forma irregular, fato que favorece a maximização à resistência bacteriana.

Essa resistência é uma realidade global e cresceu sensivelmente nos últimos anos. Como exemplos houve resistência de cepas muito perigosas como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Klebsiella pneumoniae*, e *Pseudomonas aeruginosa* (ALARCO, 2014; PIEROZAN et al., 2009). A bactéria *Escherichia coli* possui reservatórios que contém genes de resistência aos antimicrobianos (KORB et al., 2013). Os procaríotos do tipo *Staphylococcus aureus* possuem mecanismos de defesas que conseguem atuar contra alguns fármacos (LIMA et al., 2015). Com a problemática, diversos estudos são realizados empregando produtos naturais e seus constituintes para mitigar a situação.

Diversas plantas e/ou seus constituintes possuem atividade antibacteriana comprovada bem como outros efeitos benéficos ao nosso organismo como atividade: antitumoral, antioxidante, antidepressiva, antifúngica, dentre outras. No entanto, deve-se ter cautela no uso desses produtos, pois podem apresentar toxicidade quando não utilizados em doses e formas adequadas.

Dentre essas plantas com atividade antibacteriana, podemos citar a *Aloysia gratissima*, uma planta bastante conhecida no sul da América, sendo característica por seu aroma agradável e pertencer a família Verbenaceae (SOUZA; WIEST, 2007). É conhecida no Brasil popularmente como alfazema-do-brasil (SANTOS et al., 2009), mimo-do-brasil (TROVATI et al., 2009), e sua composição pode variar de acordo com as condições climáticas e geográficas, e seu potencial de uso pode ser alterado devido a essa variação. Possui propriedade inseticida, acaricida e antimicrobiana (BOTTA, 1979).

Os óleos essenciais de diversos produtos naturais possuem uma concentração considerável de fitoconstituintes com propriedades biológicas ativas (FREIRE et al., 2014). Esses, constituintes bioativos são promissores na terapêutica de doenças infecciosas podendo ser aplicados na clínica médica (ALVES; FREIRE; CASTRO, 2010).

Dentre os compostos existentes na planta em estudo, pode-se citar o β -cariofileno (SOLER; DELLACASSA; MOYNA, 1986). Essa substância é um sesquiterpeno encontrado em vários óleos essenciais, sendo portador de diversas atividades biológicas, como por

exemplo: anti-inflamatória, antialérgica, antifúngica, anticarcinogênica (ALCÂNTARA et al., 2010).

Diante da atividade antibacteriana desse e de outros bioconstituintes, a Universidade Regional do Cariri – URCA vem trabalhando em diversos projetos e grupos de pesquisas que buscam relatar e comprovar essa atividade. Já foi relatada uma bioatividade de constituintes como: safrol (ALMEIDA et al., 2020) e limoneno (ARAÚJO et al., 2019). Essas substâncias atuam como inibidoras de bomba de efluxo, sendo bons indicadores para uso frente à resistência bacteriana.

Atualmente o laboratório de microbiologia e biologia molecular da URCA vem trabalhando em parceria com outros laboratórios da instituição na busca por bioconstituintes de produtos naturais com atividade antibacteriana, como é o caso do óleo essencial da *Aloysia gratissima* e seu composto majoritário β -cariofileno. Neste sentido, nossa pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e o potencial do óleo das folhas da planta e do seu constituinte majoritário.

Podemos destacar que o óleo essencial da *Aloysia gratissima* que tem sido empregado na medicina popular possui como constituinte majoritário, cerca de 17% de β -cariofileno que apresenta propriedade anti-inflamatória, antioxidante, analgésica e antifúngica, tornando este estudo relevante, podendo mostrar a eficácia em estudos de viabilidade da atividade antibacteriana.

1.2 ESTRATÉGIAS DA PESQUISA

Estudos são desenvolvidos constantemente a respeito da atividade antibacteriana de produtos naturais. Verifica-se que possuem muitos métodos para avaliar essa atividade, dentre eles pode-se citar difusão em ágar e método de microdiluição (OSTROSKY et al., 2008).

O método utilizado na pesquisa foi o de microdiluição em caldo, essa metodologia utiliza os agentes antimicrobianos que são testados em diluições consecutivas, verificando a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo sendo chamada de Concentração Inibitória Mínima (CIM) (ALVES et al., 2008). A CIM é uma ferramenta efetiva, determinando a susceptibilidade dos agentes infecciosos aos antimicrobianos (ANDREWS, 2001).

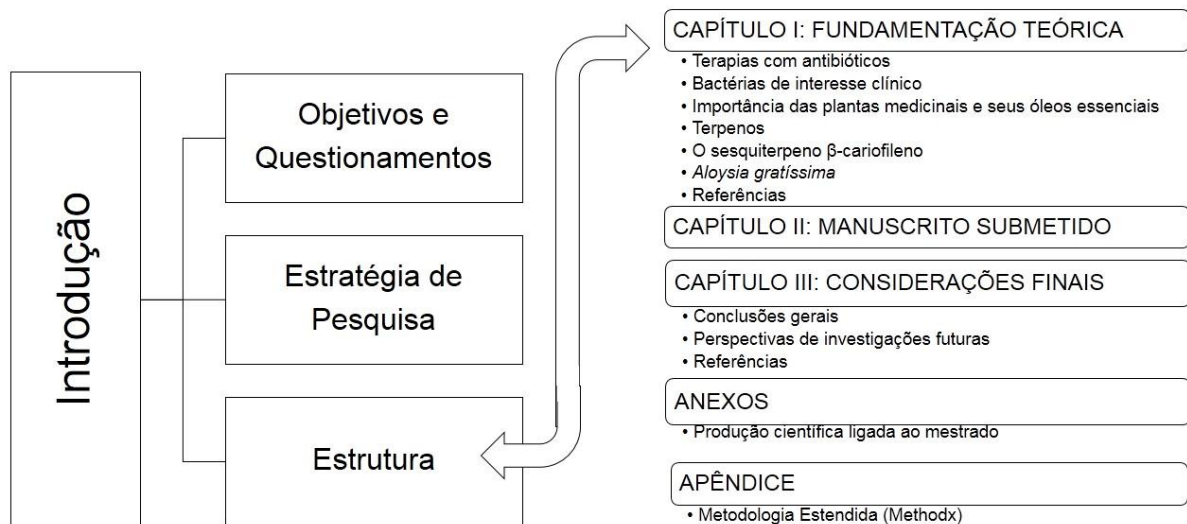
A determinação da CIM foi analisada conforme a metodologia de microdiluição em caldo em placa de 96 poços proposta pela CLSI, (2015) com ajustes. Este método é bastante

utilizado, pois trata-se de uma técnica não onerosa e demanda pouco tempo, fornecendo dados quantitativos confiáveis (NUH et al., 2020).

Estudo realizados por Alves e colaboradores, (2008) mostraram que o método de diluição em caldo pode ser uma ótima opção para se determinar a atividade antimicrobiana, comparado a outros métodos.

1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação foi dividida em 3 (três) capítulos: Fundamentação teórica, Artigos submetidos e Considerações finais. Subsequente a esses capítulos apresentam-se os Anexos e Apêndice (Methodx) expostos no fluxograma a seguir:



Referências

ALARCO, J. J. Resistencia bacteriana: una pandemia silente. **Revista Médica Panacea**, v. 4, n. 1, p. 1-2, 2014.

ALCÂNTARA, J. M. et al. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae), **Revista Acta Amazonica**, v. 40, n. 3, p. 567-572, 2010.

ALMEIDA, R. S. et al. GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil of *Ocotea odorifera* and Safrole: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pumps. **Antibiotics**, v. 9, p. 247, 2020.

- ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ALVES, L. A.; FREIRES, I. A.; CASTRO, R. D. Efeito antibacteriano de óleos essenciais sobre bactérias formadoras do biofilme dentário. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 57-62, 2010.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 48, n.1, p. 5-16, 2001.
- ARAÚJO, A. C. J. et al. GC-MS-FID characterization and antibacterial activity of the *Mikania cordifolia* essential oil and limonene against MDR strains. **Food and Chemical Toxicology**, v. 136, 2020.
- BOTTA S.M., Las espécies argentinas del género *Aloysia* (Verbenaceae). **Darwiniana: Revista Instituto de Botánica Darwinion**, v. 22, n. 1, p. 67-108, 1979.
- FREIRE, I. C. M. et al. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** v. 16, n. 2, p. 372-377, 2014.
- KORB, A. et al. Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 13, n. 1, p. 72-79, 2013.
- LIMA, M. F. P. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – Revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, p. 32-39, 2015.
- NUH, A. et al. Comparative Evaluation of MIRONAUT-AM and CLSI broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species against four commonly used antifungals. **Medical Mycology**, v. 58, n. 8, p.1085-1090, 2020.
- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
- PIEROZAN, M. et al. Caracterização química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies de *Sálvia* L. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 29, n 4, p. 764-770, 2009.
- SANTOS, F. M. et al. Produção de mudas de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. por meio da propagação sexuada e assexuada. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 2, p. 130-136, 2009.
- SOLER, E.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Composition of *Aloysia gratissima* leaf essential oil. **Phytochemistry**, v. 25, n. 6, p. 1343-1345, 1986.
- SOUZA, A. A.; WIEST, J. M. Atividade anti-bacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, ervasanta), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. 23-29, 2007.

TROVATI, G. et al. Essential oil composition of *Aloysia gratissima* from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 4, p. 325-326, 2009.

ZENI, A. L. B. et al. *Aloysia gratissima* prevents cellular damage induced by glutamatergic excitotoxicity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 9 p. 1294-1302, 2014.

2 CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 TERAPIAS COM ANTIBIÓTICOS

Com a produção de antibióticos e sua distribuição em grande escala, o índice de mortalidade por infecções causadas por *Staphylococcus aureus* aumentava consideravelmente. Para resolver essa grande problemática foi criada a penicilina para combater significativamente infecções causadas por essa bactéria. Porém, no ano seguinte já pode ser observado cepas resistentes a esse antimicrobiano (KANE; CAROTHERS; LEE, 2018).

No intuito de minimizar essa ação, foi desenvolvido em 1959 uma β -lactama melhorada, o antibiótico metilina. No entanto, posteriormente, foi observado uma nova resistência bacteriana (JEVONS, 1961). Estudos relatam que as bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* possuíam sensibilidade a cefalotina e oxacilina, mas ainda se torna necessário mais estudos e testes que minimizem essa resistência a antibióticos (SILVA et al., 2012).

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) são bactérias de difícil tratamento pois possuem resistência elevada a diversos antibióticos e sofrem mutações constantes durante a sua terapia (PEÑA et al., 2012). Um estudo empírico realizado por Cardial et al., (2015), mostrou que pacientes que apresentavam infecções sanguíneas por *P. aeruginosa* tratados com cefepima e amicacina foram à óbito em 100% dos casos. Enquanto que em pacientes tratados com ciprofloxacino o índice de mortalidade foi nulo, sugerindo assim que o ciprofloxacino foi mais eficiente. No entanto, o autor supra citado relata que se torna necessário desenvolvimento de novos estudos para averiguação.

Já Martis; Leroy; Blanc, (2014) nos seus estudo empíricos identificaram que o uso de polimixinas (colistina) podem ser eficientes no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, assim como alguns β -lactâmicos como: penicilina, cefalosporina e/ou carbapenêmicos e também fluoquinolonas (ciprofloxacino e levofloxacina) (KALIL et al., 2016).

Em relação a *E. coli*, em um estudo realizado por Soysal et al., (2016), feito em algumas linhagens desse patógeno, observou-se que a ciprofloxacina induziu significativamente o

aumento de secreções patológicas de diversas linhagens. Por outro lado, quando a ceftriaxona foi usada não obteve-se qualquer alteração na produção de aumento de efeitos patológicos da *E.coli*, com exceção de uma única cepa.

O estudo ainda demonstra que a combinação de azitromicina com a ciprofloxacina reduz significativamente em algumas cepas a produção de secreções por essas estirpes, em relação a esse último isolado.

O impacto das bactérias resistentes e o uso inadequado de fármacos, responde a uma ameaça para a humanidade e torna-se um grande problema para a saúde pública (SANTOS; 2011).

Uma das principais causas de resistência é a automedicação. A utilização de fármacos sobre orientações de conhecimentos populares sem prescrições médicas pode acarretar no prolongamento ou interrupção precoce da dosagem e período de tempo indicado nas receitas (MORAES; ARAÚJO; BRAGA, 2016).

Com o intuito de diminuir esses efeitos da resistência microbiana, estudos mostram que a utilização de compostos bioativos de plantas naturais podem tornar-se estratégia alternativa nessas ações (TAYLOR, 2013).

2.2 BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO

2.2.1 *Eschechiria coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, encontrada em forma de bacilo, pertencente à família Enterobacteriaceae (KORB et al., 2013). Presente no trato intestinal dos vertebrados, especificamente no colón. A mesma é anaeróbica facultativa e a temperatura ideal para o seu crescimento é de 37°C (MAMONA; AMORIM, 2017).

Normalmente não é considerada patogênica, logo, para que se tenha o desenvolvimento de infecções, os estipes da *E. coli* precisam adquirir fatores de virulência. Classificadas em patotipos intestinais, as bactérias patogênicas são, enterohemorrágicas (EHEC), enteroagregativas (EAEC), enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC) e enteroinvasivas (EIEC), as quais, causam dores abdominais e diarreia, podendo em alguns casos motivar o vômito e a febre (SILVEIRA; MARQUES; MACHADO, 2013).

2.2.2 *Staphylococcus aureus*

A espécie *S. aureus* são cocos Gram-positivas, não esporulada, catalase positiva e imóvel. (LIMA et al., 2015). Pertence à família Micrococcae e está presente na microbiota normal dos seres humanos (SANTOS et al., 2007). A partir da enzima de coagulase, dividimos o gênero *Staphylococcus* em dois grandes grupos, sendo coagulase-positiva a espécie *S. aureus* e, coagulase-negativa as espécies *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugnensis*, entre outras (PEREIRA; CUNHA; 2009).

É considerada a mais virulenta do seu gênero, possuindo mecanismos de defesa e estratégia contra o sistema imunológico. Esses mecanismos podem acarretar a enfermidades, que vão das mais simples, como espinhas e furúnculos, ou infecções mais graves, como pericardite e meningite (LIMA et al., 2015).

Por produzirem enterotoxinas, a intoxicação alimentar é uma patologia muito comum vindo dessa bactéria. Acredita-se que, 45% das intoxicações alimentares através de bactérias são acometidas pela mesma (BRESOLIN; DALL' STELA; SILVA, 2006).

2.2.3 *Pseudomona aeruginosa*

A *P. aeruginosa* é uma bactéria bacilo Gram-negativa, pode contaminar diversos locais e possui um teor infectante elevado. É responsável por causar comumente infecções hospitalares e atingir principalmente pacientes com fibrose cística. Possui resistência microbiana a diversos antibióticos e por isso trata-se de um problema de saúde (LIU et al., 2018; POOLE et al., 2016).

Responsável por causar infecção em imunodeprimidos, pneumonia e infecções do trato respiratório, doenças essas que têm tratamento complicado e que muitas vezes possui índice de mortalidade alta (WANG et al., 2017).

Esse microrganismo possui muitas moléculas de sinal favorecendo o seu fator de virulência e biossíntese, além de possui facilidade de formação de biofilme (ZHAO, et al., 2016). Devido a sua resistência a diversos antibióticos, o seu tratamento é complicado, sendo necessário administração de fármacos com amplo espectro e que muitas vezes causa efeitos adversos nos pacientes (OLIVARES et al., 2013).

2.3 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS E SEUS ÓLEOS ESSENCIAIS

O uso de plantas medicinais tornou-se bastante comum na medicina popular e o seu conhecimento referente ao uso é repassado de forma empírica de geração para geração

(BRASILEIRO et al., 2008; NÓBREGA et al., 2017). No Brasil, a prática do uso de fitoterápicos pela população sempre foi muito comum, devido sua extensa e diversificada flora (DAVID; PASA, 2015).

O uso do conhecimento popular pode gerar informações significativas que podem ajudar para descobertas de novas entidades terapêuticas (SCARDELATO; LEGRAMANDI; SACRAMENTO, 2013). As plantas são capazes de produzir metabólitos secundários, que são importantes para a adaptação e propagação das espécies vegetais (OLIVEIRA et al., 2011).

Entende-se por um medicamento fitoterápico, princípio ativo que se obtém através de matéria-prima, a qual sua eficiência e segurança estejam baseadas em comprovações clínicas (BRASIL, 2014).

Devido alguns fármacos atingirem valores significativos e em alguns casos causarem alguns efeitos colaterais, a utilização dos fitoterápicos tem cada vez mais se expandido (SANTOS et al., 2007). As utilizações das mesmas auxiliam na prevenção de algumas doenças, manutenção e recuperação da saúde (ALCANTARA; JOAQUIM; SAMPAIO, 2015).

Das plantas pode-se extrair o seu óleo essencial que confere aroma e sabor das plantas e são responsáveis por atrair polinizadores, além de garantir proteção contra insetos e diversas funções necessárias à sobrevivência da planta (ZAGO et al., 2009).

São consideradas substâncias complexas possuindo como constituinte químico principal os terpenos, produtos que se encontram na maioria das plantas (SANTOS et al. 2004; SHARIFIRAD et al., 2017).

Podem ser considerados os produtos mais importante com características antimicrobiana e inclusive seu uso é disseminado da dermatologia no tratamento de infecções fúngicas (ORCHARD; VUUREN, 2017).

Já foram descritos mais de 3000 mil tipos de óleos essenciais, e aproximadamente 0,1 são relevantes para produtos farmacêuticos, nutricionais ou cosméticos industriais. Vários estudos buscam comprovar os potenciais efeitos e seus benefícios contra diversas doenças, principalmente as relacionadas com proliferação e resistência microbiana bem como auxiliar no tratamento do câncer (FREIRE et al., 2014; RUSSO et al., 2016).

No entanto é necessário maior cuidado no uso de óleo essencial uma vez que, o mesmo pode causar efeitos citotóxicos incluindo a indução de morte celular pelo processo de apoptose e/ou necrose, podendo causar também perda de função de organelas essenciais ao organismo. Esse fato se explica devido ao baixo peso molecular dos principais constituintes presentes pois, esses componentes podem atravessar as membranas celulares e causar alteração na composição

da membrana aumentado a fluidez da membrana, causando vazamento de íons e moléculas citoplasmáticas (SHARIFI-RAD et al., 2017).

2.4 TERPENOS

Nas plantas podem existir diversos compostos bioativos, dentre os quais pode-se citar os terpenos, considerada uma das maiores classes de substâncias, formadas pela junção de cinco átomos de carbono (isoprenos). Eles são denominados de acordo com o seu número de átomos de carbono presentes como: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos dentre outros (GHANI; SILVA; COLOMBO 2019).

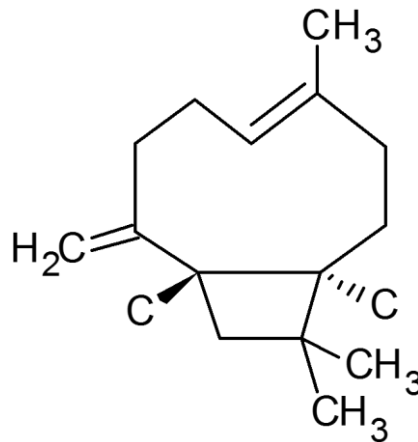
Via de regra sua estrutura possui uma dupla ligação carbono-carbono (alcenos naturais), caracterizando-se como um hidrocarboneto insaturado. Salienta-se que se possuir uma molécula de oxigênio, é denominado de terpenóide, variando assim as suas funções químicas podendo citar: aldeídos, cetonas, ácidos, álcoois, éteres, epóxidos terpênicos ou fenóis (FELIPE; BICAS, 2017).

Esse composto pode ser encontrado em vários locais das plantas, desde as raízes até nas suas sementes, podendo também ser encontrado em 90% dos óleos essenciais das plantas (SOUZA et al., 2015). Podem possuir bioatividade variadas, como atividade antimicrobiana (DE MARTINO et al., 2015; LUTFI; ROQUE, 2014).

2.5 O SESQUITERPENO β -CARIOFILENO

Os sesquiterpenos são substâncias que possuem em sua estrutura 15 carbonos constituindo-se de 3 unidades de isopreno (AMBROZ et al., 2017) sendo considerado a maior classe de metabólitos secundários das plantas (PALMER-YOUNG et al., 2015).

O β -cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico que pode ser encontrado em óleos essenciais de diversas espécies vegetais (FERREIRA, 2014). É um terpeno que foi encontrado como componente majoritário na *A. gratissima*. Possui um aroma amadeirado e com tons picantes característicos, sendo usado na produção de cosméticos e produtos de limpeza (OPDYKE, 1973). A literatura relata que esse composto possui grande importância clínica pois existem diversas atividades biológicas, dentre elas atividade antibacteriana (SHAFAGHAT, 2011).

Figura 1: Estrutura química do β -cariofileno

Fonte: Elaborado pelo autor

2.6 *Aloysia gratissima*

Aloysia é um gênero de planta da família Verbenaceae. É encontrado em forma de arbusto que cresce preferencialmente em regiões tropicais e subtropicais (SOLER; DELLACASSA; MOYNA, 1986). Há relatos que seu surgimento se deu na região sul da América do Sul com um centro de evolução da Argentina. Dentro desse gênero encontra-se a espécie *A. gratissima*, sendo utilizada na medicina popular do continente americano dos EUA, México, Brasil e Argentina (SILVA et al., 2006).

Aloysia gratissima é também conhecida como alfazema-do-Brasil, que crescem em forma de arbusto aproximadamente 3 metros de altura, com muitas ramificações e flores de cheiro agradável (PINTO et al., 2007; VANDRESEN et al, 2010).

Sua reprodução pode ser do tipo sexuada e assexuada, e muitos fatores extrínsecos são determinantes para sua reprodução como por exemplo: temperatura e água. Já os nutrientes e absorção de luz é um fator intrínseco da espécie, determinando a sua propagação (BASKIN; BASKIN, 2001; SILVA, 2005).

Suas sementes possuem cerca de 0,2mm de comprimento e $0,29 \text{ mg sem}^{-1}$, com formato arredondado e é envolvida por casca pilosa, com embrião protegido por uma casca dura (SANTOS et al., 2009).

Diversas plantas brasileiras são usadas para tratar infecções tropicais mais comuns no Brasil, como leishmaniose, malária, infecções fúngicas e bacterianas. O mecanismo de ação das plantas ainda não está bem elucidado, mas a maioria dos autores apontam que compostos fenólicos como mentol e timol se acumulam nas membranas dos microrganismos inibindo o

metabolismo celular (AHMAD; BEG, 2001; ALVES et al., 2000; DUARTE et al., 2005; HELFAND; COWEN, 1990; SARTORATTO et al., 2004).

Estudos demonstram que a *Aloysia gratissima* possui atividade antileishmanicida nas fases amastigotas e promastigota da espécie *Leishmania amazonenses*, com inibição de crescimento do parasita em 44%, 31% e 85% , respectivamente (GARCIA et al., 2018).

Outras pesquisas mostram que a planta possui atividade antibacteriana com os seus extratos brutos e óleo essenciais das folhas da espécie (VANDRESEN et al., 2010) sendo também utilizada como controle biológico de ácaros, insetos e outros microrganismos (BOTTA, 1979). Como mostra o estudo de Galvez et al. (2018), que estudando a atividade antifúngica do OE de *A. gratissima*, observaram que a planta possui uma atividade moderada contra *Fusarium* sp. com CIM \pm 0,6-1,2 mg / ml.

A planta possui ação associada ao alívio dos sintomas relacionados à dor de cabeça, bronquite e distúrbios do sistema nervoso, bem como possuir atividade antidepressiva e auxilia nos efeitos neuroprotetores (ARIAS, 2009; ZENI et al., 2014).

Estudos relatam que o óleo essencial da planta em estudo também possui efeitos anestésicos. Benovit et al. (2015), realizaram um estudo em peixes bagre prateados utilizando o óleo essencial da *A. gratissima* com intuito de avaliar efeitos anestésicos, sendo observado que os peixes demonstraram anestesia nas concentrações variando de 300 (aproximadamente 18 min) a 900 mg/L⁻¹ (em aproximadamente 12 min).

2.6.1 Metabólitos secundários

A composição química de *A. gratissima* é influenciada por condições climáticas e geográficas, podendo alterar seu potencial de uso como produto natural (BOTTA, 1979). Com isso, os seus constituintes inclusive o majoritário, podem sofrer diferenças em quantidade e potencialidade dependendo da região e época de colheita (SANTOS et al., 2013).

Os óleos essenciais conferem aroma e sabor das plantas e são responsáveis por atrair polinizadores, além de garantir proteção contra insetos e diversas funções necessárias à sobrevivência da planta (ZAGO et al., 2009). São considerados substâncias complexas possuindo como constituinte químico principal os terpenos, produto que se encontra na maioria das plantas (SANTOS et al. 2004; SHARIFI-RAD et al., 2017). Considerados um dos produtos mais populares com características antimicrobiana e inclusive seu uso é disseminado da dermatologia no tratamento de infecções fúngicas (ORCHARD; van VUUREN 2017).

Atualmente já foram descritos mais de 3000 mil tipos de óleos essenciais, e aproximadamente um décimo são relevantes para produtos farmacêuticos, nutricionais ou cosméticos industriais. Vários estudos buscam comprovar os potenciais efeitos e seus benefícios contra diversas doenças, principalmente as relacionadas com proliferação e resistência microbiana bem como auxiliar no tratamento do câncer (RUSSO et al., 2016).

No entanto é necessário maior cuidado no uso de óleo essencial uma vez que, o mesmo pode causar efeitos citotóxicos incluindo a indução de morte celular pelo processo de apoptose e/ou necrose, podendo causar também perda de função de organelas essenciais ao organismo. Esse fato se explica devido ao baixo peso molecular dos principais constituintes presentes pois, esses componentes podem atravessar as membranas celulares e causar alteração na composição da membrana aumentando a fluidez da membrana, causando vazamento de íons e moléculas citoplasmáticas (SHARIFI-RAD et al., 2017).

Soler Dellacassa e Moyna (1986), descreveram constituintes presentes no óleo essencial da *A. gratíssima*, dentre eles: alfa-pineno, beta-pineno, mirtenol, β -nergamoteno, β -cariofileno, α -humuleno, γ -muuroleno, biciclogermacreno, (E)- nerolidol, óxido de cariofileno, sandaracompimaral.

Trovati et al. (2009) realizaram a identificação de metabólitos do óleo essencial da planta e constataram a presença de 14 constituintes, dentre estes, terpenos como exemplo o β -cariofileno. Foi encontrado isopinocamfona (trans- 3-pinanona) (25,4%), limoneno (15,1%) e guaiol (12,7%) como os principais constituintes. No entanto, salienta-se que essa porcentagem varia de acordo com as características geomorfológicas.

Referências

- AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 113-123, 2001.
- ALCANTARA, R. G. L.; JOAQUIM, R. H. V. T; SAMPAIO, S. F. Plantas medicinais: o conhecimento e o uso popular. **Revista de APS**, v. 18, n. 4, p. 470-482, 2015.
- ALVES, T. M. A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cru**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- AMBROZ, M. et al. The Effects of Selected Sesquiterpenes from *Myrica rubra* Essential Oil on the Efficacy of Doxorubicin in Sensitive and Resistant Cancer Cell Lines. **Molecules**, v.22, 2017.

ARIAS TB. Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. **BLACPMA**, v.8, n. 5, p. 389-401, 2009.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. 666p London: Academic Press, 2001.

BENOVIT, S. C. et al. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 3, p. 1675-1689, 2015.

BOTTA S.M., Las espécies argentinas del gênero *Aloysia* (Verbenaceae). **Darwiniana: Revista Instituto de Botânica Darwinion**, v. 22, n. 1, p. 67-108, 1979.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada – RDC n° 26, de 13 de maio de 2014. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf> Acessado em: 02 de out de 2019.

BRASILEIRO, B. G. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 629-636, 2008.

BRESOLIN, B. M. Z; DALL’ STELA, J. K; SILVA, S. E. F. Pesquisa sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e mãos de manipuladores de alimentos em Curitiba, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia**, v. 27, n. 59, p. 27-32, 2005.

CARDIAL, L. S. M. et al. Análise da terapia antimicrobiana empírica em infecção de corrente sanguínea por *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital universitário. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 13, n. 4, p. 257-261, 2015.

DAVID, M; PASA, M. C. As plantas medicinais e a etnobotânica em Várzea Grande, MT, Brasil. **INTERAÇÕES**, v. 16, n. 1, p. 97-108, 2015.

DE MARTINO, L.; NAZZARO, F.; MANCINI, E.; DE FEO, V. In: PREEDY, V. R.; WATSON, R. R. *Essencial oils from Mediterranean Aromatic Plants. The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach*. Londres: Elsevier, 2014. p. 649-661.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-Candida activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v 97, n. 1, p 305-311, 2005.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p.120-130, 2017.

FERREIRA, D. A. S. *The Sesquiterpenes(E)-β-Farnesene and (E)-α Bergamotene Quench Ozone but Fail to Protect the Wild Tobacco *Nicotiana attenuata* from Ozone, UVB, and Drought Stresses*. Tese (Doutorado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, p.70. 2014.

FREIRE, I. C. M. et al. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 372-377, 2014.

GALVEZ, C. E. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Senecio nutans*, *Senecio viridis*, *Tagetes terniflora* and *Aloysia gratissima* against toxigenic *Aspergillus* and *Fusarium* species. **Natural Product Research**, v. 31, n. 5, p 1-4, 2018.

GARCIA, M C. F. et al. The in vitro antileishmanial activity of essential oil from *Aloysia gratissima* and guaiol, its major sesquiterpene against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, v. 145 n. 9, p. 1219-1227, 2018.

GHANI, Y. A.; SILVA, M. A.; COLOMBO, R. Identificação de terpenos e fitoesteróis provenientes da vinhaça. In: DULEBA W.; GONÇALVES-DIAS, S.L. F.; PAULINO, S. R. Sustentabilidade e interdisciplinaridade. São Paulo: Blucher, 2019. p. 63-83.

HELFAND, W. H.; COWEN, D. L. **Pharmacy – an illustrated history**, Harry N. 1. ed. Abrams, New York, 1990.

JEVONS, P. “Celbenin”-resistant Staphylococci. **British Medical Journal**, v.1, n. 5219, p.124–125 1961.

KALIL, A. C. et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 5, p. e61–e111, 2016.

KANE, T. L.; CAROTHERS, K. E.; LEE, S. W. Virulence Factor Targeting of the Bacterial Pathogen *Staphylococcus aureus* for Vaccine and Therapeutics. **Curr Drug Targets**, v. 19, n. 2, p. 111-127, 2018.

KORB, A. et al. Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 13, n. 1, p. 72-79, 2013.

LIMA, M. F. P. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – Revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, p. 32-39, 2015.

LIU, L. et al. Structural and functional studies on *Pseudomonas aeruginosa* DspI: implications for its role in DSF biosynthesis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 3928, p. 1-11, 2018.

LUTFI, M.; ROQUE, N. F. Histórias de Eugênicas. **Química Nova na Escola**. v. 36, n. 4, p. 252-260, 2014.

MAMONA, B. J; AMORIM, C. R. N. Detecção e identificação de adesinas das amostras *Escherichia coli* isolados de bezerros com diarreia em Cruz das almas, Bahia. In seminário de iniciação científica da UEFS, 21., 2017, Feira de Santana. **Anais Seminário de iniciação científica**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2017.

MARTIS, N.; LEROY, S.; BLANC, V. Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections: a narrative review for the clinician. **Journal of Infection**, v. 69, n. 1, p. 1-12, 2014.

MORAES, A. L; ARAÚJO, N. G. P; BRAGA, T. L. Automedicação: Revisando a literatura sobre a resistência bacteriana aos antibióticos. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 5, n. 1, p. 122-132, 2016.

NOBREGA, J. S. et al. Avaliação do conhecimento etnobotânico e popular sobre o uso de plantas medicinais junto a alunos de graduação. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 7-13, 2017.

OLIVARES J, et al. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. 2013.. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 103, p. 1-15, 2013.

OLIVEIRA, L. S. et al. Plantas medicinais como recurso terapêutico em comunidades do entorno da reserva biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabolitos secundários e aspectos farmacológicos. **Revista Científica Internacional**, v. 1, n. 17, p. 54-74, 2011.

OPDYKE, D. L. Monographs on fragrance raw materials. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 13, n. 4, p. 449-457, 1975.

ORCHARD, A.; van VUUREN, S. V. Commercial Essential Oils as Potential Antimicrobials to Treat Skin Diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, n. 1, p. 1-92, 2017.

ORCHARD, A.; van VUUREN, S. V. Commercial Essential Oils as Potential Antimicrobials to Treat Skin Diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, n. 1, p. 1-92, 2017.

PALMER-YOUNG, E. C. et al. The Sesquiterpenes(E)- β -Farnesene and (E)- α - Bergamotene Quench Ozone but Fail to Protect the Wild Tobacco *Nicotiana attenuata* from Ozone, UVB, and Drought Stresses. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, 2015.

PEÑA, C. et al. Prospective Multicenter Study of the Impact of Carbapenem Resistance on Mortality in *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p.1265-1272, 2012.

PEREIRA, E. P. L; CUNHA, M. L. R. S. Avaliação da colonização nasal por *Staphylococcus* spp. resistente à oxacilina em alunos de enfermagem. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 5, p 361-369, 2009.

PINTO, J. E. B. P. et al. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazemado- brasil em função de níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Horticultura**, v.25, n.2, p. 210-214, 2007.

POOLE, K. et al. Potentiation of Aminoglycoside Activity in *Pseudomonas aeruginosa* by Targeting the AmgRS Envelope Stress-Responsive Two-Component System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3509-3518, 2016.

- RUSSO A, CONCIA E, CRISTINI F, et al. Current and future trends in antibiotic therapy of acute bacterial skin and skin-structure infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 27-36, 2016.
- SANTOS, F. M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the leaves and flowers of *Aloysia gratissima*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 583-588, 2013.
- SANTOS, F. M. et al. Produção de mudas de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. por meio da propagação sexuada e assexuada. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 2, p. 130-136, 2009.
- SANTOS, L. G. M. et al. Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry (Cravo-da-índia). **TECNO-LÓGICA**, v. 11, n. 1, p. 11-14 2007.
- SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 13, n. 1, p. 64-70 2011.
- SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Brazil. **Journal Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 273- 280, 2004.
- SCARDELATO, J. A; LEGRAMANDI, V. H. P; SACRAMENTO, L. V. S. Ocorrência de cristais em plantas medicinais utilizadas no tratamento de nefrolitíase. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 2, p. 161-168, 2013.
- SHAFAGHAT, A. Antibacterial Activity and GC/MS Analysis of the Essential Oils from Flower, Leaf and Stem of *Origanum vulgare* ssp. *viride* Growing Wild in North-west Iran. **Natural Product Communications**, v. 6 n. 9, 2011.
- SHARIFI-RAD, J. et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1-55, 2017.
- SILVA, C. C. et al. Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. (Verbenaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 7, p. 593-595, 2006.
- SILVA, E. R. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p 701-711, 2012.
- SILVEIRA, L; MARQUES, A; MACHADO, J. Patotipos de *Escherichia coli* associados a infecções entéricas entre 2002-2012. **Boletim epidemiológico**, v. 1, n. 1, p. 20-22 2013.
- SOLER, E.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Composition of *Aloysia gratissima* leaf essential oil. **Phytochemistry**, v. 25, n. 6, p. 1343-1345, 1986.
- SOUZA, V. A; LIMA, D. C. S; VALE, C. R. Avaliação do conhecimento etnobotânico de plantas medicinais pelos alunos do ensino médio da cidade de Inhumas, Goiás. **RENEFARA**, v. 8, n. 8, p. 13-30, 2015.

SOYSAL, N. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hybrid pathotype O80:H2 as a new therapeutic challenge. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 9, p 1604-1612, 2016.

TAYLOR, P.W. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 42, n. 3, p. 195-201, 2013.

VANDRESEN, F. et al. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. E *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 317-321, 2010.

WANG, K. et al. The rapid in vivo evolution of *Pseudomonas aeruginosa* in ventilator-associated pneumonia patients leads to attenuated virulence. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 1-13, 2017.

ZAGO, J. A. A. et al. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 828-833, 2009.

ZENI, A. L. B. et al. *Aloysia gratissima* prevents cellular damage induced by glutamatergic excitotoxicity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n, 9 p. 1294-1302, 2014.

ZHAO, J. et al. Structural and molecular mechanism of CdpR involved in quorum sensing and bacterial virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Plos Biology**, v. 14, n 4, p. 1-25, 2016.

3. CAPÍTULO II: MANUSCRITO

Submetido em 31/04/2021 na South African Journal of Botany

Phytochemical characterization and enhanced antibacterial effect of antibiotics by the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) and its major constituent beta-caryophyllene

Eduardo L. Santos^a, Priscilla R. Freitas^a, Ana Carolina J. Araújo^a, Ray S. Almeida^a, Saulo R. Tintino^a, Cicera Laura R. Paulo^a, Ana Cristina A. Silva^b, Luiz E. Silva^c, Wanderlei do Amaral^c, Cícero Deschamps^d, José Pinto Siqueira Junior^e, José Maria Barbosa Filho^f, Gabriela Ribeiro de Sousa^f, Jaime Ribeiro-Filho^g, Raffaele Capasso^{h*} and Henrique D. M. Coutinho^{a*}

^a Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri - URCA, Crato, Brazil; eduardo.l.santos@kroton.com.br (E.L.S); priscilla.r.freitas@hotmail.com (P.R.F); caroljustino@outlook.com (A.C.J.A); rayalmeidasilva2306@gmail.com (R.S.A); saulo.tintino@urca.br (S.R.T); lauraroquealencar@gmail.com (C.L.R.P); hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C)

^b Maurício de Nassau College -UNINASSAU, Petrolina, PE, Brazil; 011800513@prof.uninassau.edu.br (A.C.A.S)

^c Post graduate Program in Sustainable Territorial Development, Federal University of Paraná – UFPR, Matinhos, Brazil; luizeverson@ufpr.br (L.E.S); wdoamaral@ufpr.br (W.d.A)

^d Post graduate Program in Agronomy, Federal University of Paraná - UFPR, Curitiba, Brazil; cicero@ufpr.br (C.D)

^e Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba-UFPB, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; siqueira@dbm.ufpb.br (J.P.S.Jr.)

^f Department of Pharmacy, Federal University of Paraíba-UFPB, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; jbarbosa@lft.ufpb.br (J.M.B.F.); grsousafarm@gmail.com (G.R.d.S.)

^g Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA), Salvador, BA, Brazil; jaime.ribeiro@fiocruz.br (J.R.F)

^h Department of Agricultural Sciences, University of Naples Federico II, 80055 Portici, Italy; rafcapas@unina.it (R.C.)

*Corresponding author. E-mail addresses: hdmcoutinho@gmail.com, hdmcoutinho@urca.br (H.D.M.C) and rafcapas@unina.it (R.C.)

ABSTRACT

The present study aimed to characterize the chemical profile and evaluate the antibacterial and antibiotic-enhancing activities of the essential oil obtained from *Aloysia gratissima* (EOAG) and its major compound β -caryophyllene. The phytochemical analysis was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* 24, *Staphylococcus aureus* 10, and *Escherichia coli* 06 was assessed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using the broth microdilution method. A reduction in the MIC of the antibiotics against strains treated simultaneously with the essential oil or β -caryophyllene was interpreted as enhanced antibiotic activity. The GC-MS analysis of the EOAG identified 30 compounds, including β -caryophyllene as the major component. Both EOAG and β -caryophyllene presented antibacterial activity against *S. aureus*, in addition to potentiating the action of norfloxacin against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli*. These substances also reversed the degree of antibiotic resistance to gentamicin and erythromycin in cultures of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, respectively. In conclusion, both EOAG and β -caryophyllene have a notable potential for the development of new therapies against bacterial resistance. However, further research is needed to characterize the molecular mechanisms of action of these substances in the model used in the present study.

Keywords: *Aloysia gratissima*. β -caryophyllene. Essential oils. Antibiotic resistance. *In vitro* study.

1. Introduction

Aloysia gratissima Gilles and Hook Tronc. (Verbenaceae) is a plant popularly known as “erva santa” (holy herb). This species is widely used in Brazilian traditional medicine for the treatment of respiratory, digestive (Souza & Wiest, 2007) and central nervous system diseases (Silva et al., 2006; Zeni & Bosio, 2011). Studies have demonstrated that the essential oil of *A. gratissima* has unique pharmacological properties, including antimicrobial (Santos et al., 2015), leishmanicidal (Garcia et al., 2018), anticancer (Yang et al., 2016), sedative (Goleniowski et al., 2006) and larvicidal (Silva et al., 2014). In addition, due to the high content of compounds such as β -caryophyllene, spatulenol, β -pinene, the EOAG has been widely used in the composition of perfumes, foods, and beverages (Yadegarinia et al., 2006).

Previous research has identified β -caryophyllene in the essential oils of various plant species such as cloves, cinnamon, ginger, basil (Kumphune et al., 2011). This sesquiterpene was found to present anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities (Dorman & Deans, 2000; Dahham et al., 2015; Rodriguez et al., 2012). Accordingly, studies have demonstrated that many essential oils containing β -caryophyllene presented antibacterial effects against both Gram-positive and Gram-negative strains (Neta et al., 2017; Maia et al., 2010).

Staphylococcus aureus is a Gram-positive bacterium with significant impact on public health, causing both hospital and community infections, such as pneumonia, bacteremia, endocarditis, and osteomyelitis, in addition to skin diseases (Foster et al., 2014; Klevens, 2007). Studies have shown that this bacterium has developed resistance against most conventional antibiotics, impairing the treatment of several infections (Gibbons, 2004). Evidence has indicated that *S. aureus* can encode proteins associated with the development of resistance to fluoroquinolones, penicillins, and cephalosporins, in addition to other biocidal agents such as iodine (Eumkeb et al., 2010; Taylor, 2013).

On the other hand, *Escherichia coli* (Trabulsi & Alterthum, 2015) and *Pseudomonas aeruginosa* (Sterhling, Leite, & Silveira, 2010) are Gram-negative bacteria with remarkable pathogenicity and demonstrated resistance to antibiotics. *E. coli* is the most common cause of enteric urinary tract infections, in addition to being associated with severe conditions such as sepsis and meningitis (Dominguez et al. 2002; Pop-Vicas & Opal, 2014). In contrast, *P. aeruginosa* causes severe infections in immunosuppressed individuals. In fact, this microorganism has developed several immune evasion mechanisms (Reinhart & Oglesby-Sherrouse, 2016), besides demonstrating resistance to several antibiotics (Morita, Tomita, & Kawamura, 2014).

Bacterial resistance has become a global public health problem (Grillo et al., 2013). Studies have reported the emergence of multi-drug resistant (MDR) strains of clinically important bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* (Alarco, 2014; Korb et al., 2013; Pierozan et al., 2009), which has significantly hampered the treatment of infections with conventional antibiotics (Lima et al., 2015).

Antibiotic resistance occurs mainly through mutations in the bacterial chromosome or through the acquisition of plasmids or transposons containing resistance genes (Andersen, 2015). These phenomena can lead to the development of resistance mechanisms such as the acquisition of antibiotic-inactivating enzymes; decreased membrane permeability to an antibiotic; acquired changes in the target sites of an antibiotic and expression of efflux pumps, leading to antibiotic extrusion (Trabulsi & Alterthum, 2015).

Previous research has demonstrated that the essential oil, as well as constituents previously identified in *A. gratissima*, have promising antimicrobial properties (Trovati et al., 2009) and therefore have the potential to be used in the development of new drugs useful in combating infections by resistant bacterial strains (Brito & Cordeiro, 2012; Rice, 2008).

Therefore, the present study aimed to characterize the chemical profile and evaluate the antibacterial and antibiotic-enhancing activities of the essential oil obtained from *Aloysia gratissima* (EOAG) and its major compound β -caryophyllene.

2. Materials and Methods

2.1 Botanical material

The essential oil was extracted from terminal branches of plants collected in Atlantic Forest Areas in the states of Paraná and Santa Catarina, Southern Brazil. A voucher specimen was prepared and registered at the herbaria of the following institutions: Faculdades Integradas Espirita (registry number 8.822) and Royal Botanic Gardens (Kew, England). Terminal branches and inflorescences were randomly collected from at least 10 individual plants and dried with an electric dryer at 40 °C for 24 h.

2.2 Essential oil extraction and phytochemical analysis

The essential oil of *Aloysia gratissima* was extracted by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus. Briefly, each 50 g of dried leaves were crushed and subjected to three cycles of extraction with 1 L of distilled water at boiling temperature for 2 h (Wasicky, 1963). After extraction, the essential oil was collected and stored under refrigeration (-4 °C) for preservation. The yield of the essential oil on a dry basis was expressed as a percentage of the total weight of the dry leaves used in the extraction.

The chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-EM). Briefly, the essential oil was diluted in dichloromethane (1: 100) and injected with a 1: 20 flow rate in an Agilent 6890 chromatograph (Palo Alto, CA) coupled to an Agilent 5973N selective mass detector, operated at 250 °C. The separation of the constituents was performed in a HP-5MS capillary column (5% -phenyl-95% -dimethylpolysiloxane, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). For quantification, the diluted samples were injected into an Agilent 7890A chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID), operated at 280°C. The percentage composition was assessed using the electronic integration of the FID signal by dividing the area of each component by the total area.

The identification of the chemical constituents was obtained by comparing their mass spectra with the standards reported in the literature (Nist, 2016) and also by comparing their

linear retention indexes, calculated from the injection of a homologous series of hydrocarbons (C7- C26) with the literature data (Adams, 2007).

2.3 Bacterial Cultures

The multidrug-resistant strains *Pseudomonas aeruginosa* 24, *Staphylococcus aureus* 10 and *Escherichia coli* 06 were used in the antibacterial tests. The origin and resistance profile of these strains is shown in table 1, as reported in the study of Bezerra et al. (2017).

All strains were initially kept on blood agar (Difco Laboratories Ltda., Brazil) and maintained in Heart Infusion Agar (HIA, Difco Laboratories) at 4 °C. Samples were transferred from the solid medium to test tubes containing sterile saline, and turbidity was assessed using a value of 0.5 on the McFarland scale, corresponding to 10⁵ CFU.

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

Bacterial strain	Origin	Resistance Profile
<i>S. aureus</i> 10	Rectum swab	Amc, Amox, Amp, Asb, Azy, Ca Cef, Cf, Cip, Cla, Clin, Eri, Lev, Mox, Oxa, Pen
<i>E. coli</i> 06	Urine	Asb, Ca, Cep, Cfo, Cmp, Cro
<i>P. aeruginosa</i> 24	Nasal discharge	Ami, Cip, Com, Ctz, Imi, Lev, Mer, Ptz

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

2.4 Drugs

Norfloxacin, gentamicin and erythromycin were used for evaluating the effects of the in vitro treatments with the natural products on antibiotic resistance. These antibiotics, as well as

sesquiterpene β -caryophyllene were purchased from SIGMA Chemical Co. (St. Louis, USA). All drugs were dissolved in DMSO and diluted in water to 1,024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and serially diluted in test tubes.

2.5 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The minimum inhibitory concentration was determined using the broth microdilution method (CLSI, 2009). Bacterial cultures kept on agar under refrigeration at 80 °C were cultured in brain and heart infusion (BHI) broth and incubated at 37 °C for 24 h. Then, each inoculum was prepared using 900 μL of 10 % BHI medium and 100 μL of the bacterial solution prepared as described above. Next, 100 μL of inoculum in medium was placed in wells on a 96-well plate followed by addition of 100 μL of the test substance at concentrations ranging from 1,024 to 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and incubation at 37 °C for 24 h. Positive controls (medium + inoculum) were included in the last wells of the plate (NCCLS, 2003). After incubation, 20 μL of a 0,01% sodium resazurin solution in saline (p/v) was added to each well, followed by an additional 1 h incubation period at room temperature. A change in the color of the solution (from blue to red), due to the reduction of resazurin, was used as an indicator of bacterial growth. The MIC was defined as the lowest concentration capable of inhibiting bacterial growth. All experiments were carried out in triplicate for all bacterial strains.

2.6 Analysis of antibiotic resistance modulation by the EOAG and β -caryophyllene

The antibiotic-enhancing activity of the EOAG and β -caryophyllene was assessed by calculating the MICs of the fluoroquinolone antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin (Sigma, MO, USA) against resistant strains of *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus* in the presence or absence of the essential oil or the isolated compound at concentrations equivalent to their MIC/8 (Coutinho et al., 2008; Tintino et al., 2018).

Each bacterial inoculum was prepared as previously described, and the EOAG and β -caryophyllene were added at concentrations equivalent to their MIC/8. Next, 100 μL of inoculum in medium was placed in wells on a 96-well plate followed by addition of 100 μL of the test substance at concentrations ranging from 1,024 to 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and incubation at 37 °C for 24 h. Positive controls (medium + inoculum) were included in the last wells of the plate. The MIC of each antibiotic was determined as described above. All experiments were carried out in triplicate for all bacterial strains.

2.7 Statistical analysis

Data are expressed as arithmetic means \pm standard deviation and were analyzed by analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's post-test using GraphPad Prism software version 7.0. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 Chemical composition of the essential oil of *Aloysia gratissima*

The phytochemical analysis of the EOAG identified 91.8% of the total constituents, revealing the presence of 30 different compounds, including β -caryophyllene (17.3%) nerolidol (9.7%) and bicyclogemacrene (7.3%), β -pinene (7.2%), α -pinene (6.2%) and caryophyllene oxide (5.9%) as major constituents (Table 2).

The present study characterized the chemical profile and *in vitro* antibacterial activity of *A. gratissima*. The GC-MS analysis identified the presence of 30 different constituents in the essential oil of this species, including β -caryophyllene as a major constituent. Accordingly, a study by Trovati et al. (2009) identified the presence of 14 constituents in the essential oil of the same species, including beta-caryophyllene as one of the main components (Santos et al., 2015).

In addition, Dambolena et al. (2010) identified β -elemene (35.7%), viridiflorol (33.6%), β -caryophyllene (28%), α -thujone (17.5%), 10-epi-cubebol (13.4%), bicyclogermacrene (12.8%), (E)-nerolidol (11.6%), and germacrene D (10.1%), as the main constituents of this species. On the other hand, Bersan et al. (2014) reported that E-pinocamphone (16.07%) was found as the predominant compound in the essential oil of *A. gratissima*, while β -caryophyllene was not identified among the constituents. These differences are justified by evidence demonstrating that the chemical composition of a given species may vary according to the method of extraction and collection, as well as the influence of seasonal factors (Figueiredo et al., 1997; Santos et al., 2013).

Table 2. GC-MS profile of the EOAG

Retention Index	Compound	%
-----------------	----------	---

937	Alpha-pinene	6.2
979	Beta-pinene	7.2
991	Myrcene	0.5
1030	Limonene	0.9
1098	Linalool	0.4
1139	Nopinone+trans-pinocarveol	1.3
1145	Trans-verbenol	1.5
1163	Pinocarvone	1.2
1194	Mythenol	1.5
1336	Delta-elemene	0.5
1417	(E)-beta- caryophyllene	17.3
1433	Trans-alpha-bergamotene	1.1
1441	(Z)-beta-bergamotene	3.3
1449	Alfa-humulene	1.3
1456	(E)-beta-farnesene + alpha-aromadendrene	0.8
1477	Gama-muurolene	5.3
1492	Bicyclogemacrene	7.3
1505	Beta-bisabolene	0.5
1509	Beta-curcumene + cubebol	0.8
1519	Delta-cadinene	0.6
1541	Cis-sesquisabinene hydrate	1.1
1565	(E)-nerolidol	9.7
1575	Spathulenol	3.8
1578	Caryophyllene oxide	5.9
1586	Globulol	0.7
1603	Ledol + rosifoliol	1.3
1636	Epi-alpha-cadinol	2.2
1649	Alpha-cadinol	1.2
1666	Epi-beta-bisabolol	1.1
2175	Sandaracopimaral	5.3
TOTAL		91.8%

3.2 Antibacterial activities of the EOAG and β -caryophyllene

The antibacterial activity analysis demonstrated that both EOAG and its major compound β -caryophyllene presented MIC values equivalent to 32 $\mu\text{g/mL}$ against *S. aureus* (Table 2). However, these treatments presented MIC values above 1,024 $\mu\text{g/mL}$ against *E. coli* and *P. aeruginosa*. These findings indicate that under the conditions adopted in the present study, the treatments showed clinically useful antibacterial activity only against the Gram-positive strain.

Our study showed that both EOAG and its primary compound presented clinically useful antibacterial activities against *S. aureus*, but not against *E. coli* and *P. aeruginosa*. This finding is corroborated by the work of Pérez-Zamora et al. (2018), who demonstrated that an essential oil obtained from *Aloysia gratissima* containing β -caryophyllene as a major compound exhibited antibacterial activity against *S. aureus*.

Accordingly, species of the same genus, such as *A. polystachya* and *A. sellowii* showed potent antibacterial actions against *S. aureus*, which may be related to the presence of β -caryophyllene. According to Dahham et al. (2015), this compound is active against both Gram-negative and Gram-positive bacteria. In addition, Maia et al. (2010) demonstrated that the essential oils of *Vernonia remotiflora* and *V. braziliiana*, which had approximately 40% of β -caryophyllene in their composition, had antibacterial action against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, including against *S. aureus*. Finally, evidence has shown that plants of the Verbenaceae family, due to the abundance of phenolic compounds, have excellent antibacterial activity (Costa et al., 2017).

Table 3. Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of the EOAG and β -caryophyllene

Bacterial Strain	EOAG MIC ($\mu\text{g/mL}$)	β-caryophyllene MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Escherichia coli</i> 6	$\geq 1,024$	$\geq 1,024$
<i>Staphylococcus aureus</i> 10	32	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 24	$\geq 1,024$	$\geq 1,024$

3.3 Antibiotic-enhancing effects of the EOAG and β -caryophyllene

Following the antibacterial activity analysis, this study investigated the potential of the essential oil and its major compound to potentiate the activity of conventional antibiotics against resistant strains of *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* (Fig. 1). The in vitro treatment with the EOAG potentiated ($p < 0.0001$) the activity of norfloxacin against all bacterial strains analyzed in this study. Of note, the essential oil caused a 6-fold reduction in the MIC of the antibiotic against resistant strains of *S. aureus*. The same combination of substances resulted in remarkable synergistic effects in inhibiting bacterial growth in *E. coli* cultures, in which the MIC was reduced from 32 $\mu\text{g/mL}$ to 2 $\mu\text{g/mL}$. In *P. aeruginosa* cultures, the combination of these treatments caused a 10-fold reduction in the MIC, indicating potentiation of antibiotic activity. On the other hand, the essential oil did not cause significant changes in the activity of gentamicin and erythromycin against the bacterial strains investigated in the study. These findings suggest that the EOAG selectively modulates the resistance to different classes of antibiotics.

The present study demonstrated that both the EOAG and β -caryophyllene increased the antibacterial activity of norfloxacin against multidrug resistant bacteria. This finding is corroborated by a previous study showing that the essential oil of *Lippia menosides*, which has a chemical composition similar to *A. gratissima*, potentiated the action of ampicillin and cephalothin against *S. aureus* (Guimarães et al., 2014). While in the present work these substances have potentiated the effect of antibiotics against Gram-negative bacteria, studies with *E. coli* demonstrated variable results from the combination with conventional antibiotics (Oliveira et al., 2006). Nevertheless, evidence has suggested that the potentiating activity of this essential oil might be due to the presence of terpenes (Costa et al., 2005).

Accordingly, Goren et al. (2011) demonstrated that β -caryophyllene potentiated the action of sulfamethoxazole in a disk diffusion model. Moreover, the properties of the different chemical constituents found in the essential oil of this species can vary significantly and, therefore, should be carefully evaluated (Mahizan et al., 2019; Lewis, 2001).

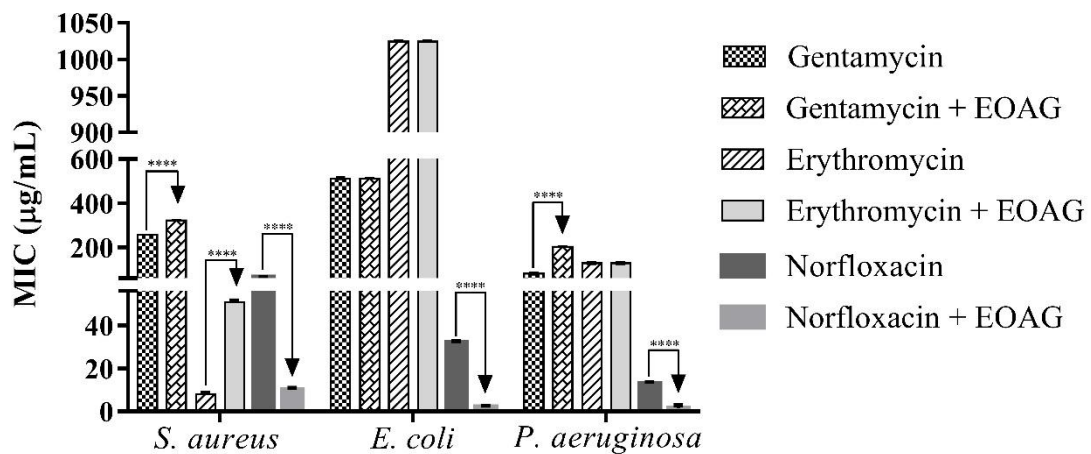


Fig. 1. Modulation of antibiotic resistance by the EOAG in association with norfloxacin, gentamicin or erythromycin against MDR of *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*. **** $p < 0.0001$ indicates significant differences between groups.

To analyze whether the antibacterial action of the EOAG would be associated with the activity of its major compound β -caryophyllene, this study investigated the effects of the association of this compound with conventional antibiotics under the same experimental conditions previously described (Fig. 2). Like the EOAG, the isolated compound potentiated the antibiotic activity of norfloxacin against all bacterial strains. However, β -caryophyllene was found to increase the antibacterial activity of *erythromycin* and *gentamicin* against *P. aeruginosa* and *S. aureus*, respectively, suggesting a selective activity by the compound, which varied according to the bacterial strain. Nevertheless, considering the comparable antibiotic-enhancing activity between the essential oil and the isolated compound, it is suggested that the effects of the modulating effects of the EOAG on antibiotic resistance result, at least partially, from the action of its major constituent β -caryophyllene.

On the other hand, a study by Aguiar and collaborators (2015) demonstrated that the essential oil of *Lantana caatingensis* (Verbenaceae), which has β -caryophyllene as the major component, differentially modulated the activity of aminoglycoside antibiotics against *S. aureus* and *E. coli*. In this context, the association with gentamicin showed antagonistic effects against both strains. However, the association caused a 75% reduction in the MIC of amikacin against *S. aureus*. In addition, the association with neomycin caused a 50% reduction in the MIC of this antibiotic against *E. coli*, providing evidence of the existence of a link between the presence of β -caryophyllene as a major constituent, and the antibiotic-enhancing properties of this species.

Dahham et al. (2015), studying the action of β -caryophyllene against Gram-positive and Gram-negative bacteria, demonstrated that this compound has potent activity against strains of *S. aureus*, with MIC values ranging between 3 and 4 μM . The authors also suggested that β -caryophyllene antibacterial activity may be due to interference with antioxidant mechanisms.

Studies have shown that essential oils rich in terpenes can show both synergism and antagonism in associations with antibiotics, which seems to be influenced by the composition of the oil, the mechanism of action of the antibiotic, and the intrinsic characteristics of the bacterial strain. However, evidence suggests that terpenes, due to their lipophilic character, can alter the permeability of the bacterial cell membrane, causing damage resulting from the loss of K^+ ions and electrolyte imbalance (Pinto, 2014), leading to the loss of fundamental cellular components such as proteins and lipids (Oliveira et al., 2006; Mahizan et al., 2019).

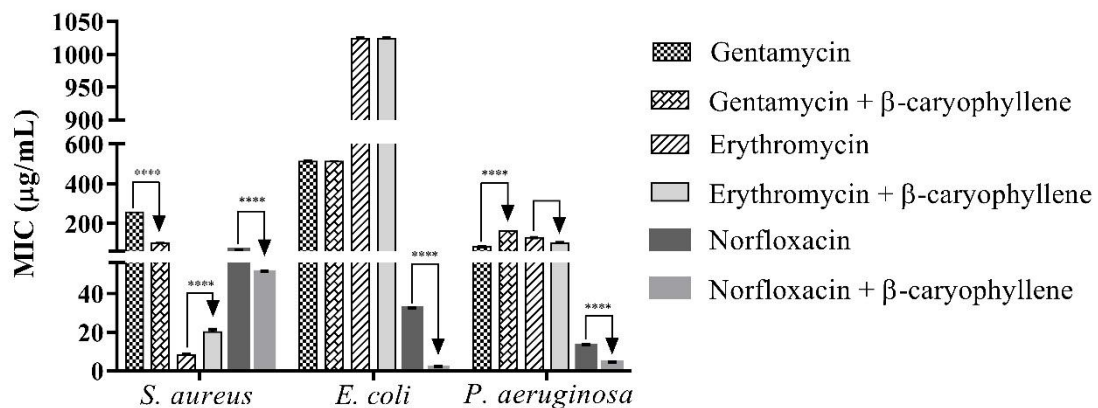


Fig. 2. Modulation of antibiotic resistance by β -caryophyllene in association with norfloxacin, gentamicin or erythromycin against MDR of *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*. **** $p < 0.0001$ indicates significant differences between groups.

4. Conclusion

The essential oil of *A. gratissima* exhibited antibacterial and antibiotic-enhancing activities that are, at least partially, mediated by its major constituent β -caryophyllene. Both treatments presented antibacterial activity against *S. aureus*, in addition to potentiating the action of norfloxacin against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli*. These substances also reversed the degree of antibiotic resistance to gentamicin and erythromycin in cultures of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, respectively.

In conclusion, both EOAG and β -caryophyllene have a notable potential for the development of new therapies against bacterial resistance. However, further research is needed

to characterize the molecular mechanisms of action of these substances in the model used in the present study.

Funding: This research received no external funding

Author Contributions: Conceptualization: E.L.S; experiments were conducted by: A.C.J.A and P.R.F.; data analysis: H.D.M.C.; formal analysis, C.L.R.P.; writing original draft preparation, W.d.A. and C.D.; writing of manuscript: A.C.A.S and J.R.F.; critical review: S.R.T and J.R.F. All authors read and agreed with the final version of the manuscript.

Acknowledgments: The authors would like to thank Prof. S. Gibbons (University of London) for kindly providing the bacterial strains used in this study

Conflicts of Interest: The authors deny the existence of any conflicts of interest regarding this publication.

References

- Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4rd ed; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Dupage.
- Aguiar, N. U., Lima, G. S., Rocha, S. M., Citó, L. G. M. A., Sousa, P. J. A., Silva, M. R., Silva, A. S. I., Costa, M. G. J. (2015). Chemical composition and modulation of antibiotic activity of essential oil of *Lantana caatingensis* M. (Verbenaceae). *Industrial Crops and Products*, 74, 165-170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.011>.
- Alarco, J. J. (2014). Resistencia bacteriana: una pandemia silente. *Revista Médica Panacea*, 4, 1-2. <https://doi.org/10.35563/rmp.v4i1.161>.
- Andersen J. L., He G-X., Kakarla P., Ranjana K.C., Kumar S., Lakra W.S., Mukherjee M.M., Ranaweera I., Shrestha U., Tran ., Varela M.F. (2015). Multidrug efflux pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 1487–1547. <https://doi.org/10.3390/ijerph120201487>
- Bersan, S. M. F., Galvão, C. C. L., Goes, F. F. V., Sartoratto, A., Figueira, M. G, Rehder, G. L. V., Alencar, M. S., Duarte, T. M. R., Rosalen, L. P., Duarte, T. C. M. (2014). Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. *Complementary and Alternative Medicine*, 14, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-451>.

- Bezerra, C. F., Camilo, J. C., Silva, N. K. M., Freitas, S. T., Ribeiro-Filho J., Coutinho, H. D. M. (2017). Vanillin Selectively Modulates the action of antibiotics against resistant bacteria, *Microbial Pathogenesis*, 113, 265-26. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.052>.
- Brito, M. A., Cordeiro, B. C. (2012). Necessidade de novos antibióticos. *Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial*, 48, 247-249. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442012000400002>.
- CLSI, (2009). Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Eighth Edition. Wayne, CLSI document M07-A8.
- Costa, J. G. M., Rodrigues, F. F. G., Angélico, E. C., Silva, M. R., Mota, M. L., Santos, N. K. A., Cardoso, A. L. H., Lemos, T. L. G. (2005). Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15, 304-309. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400008>.
- Costa, P. S., Souza, E. B., Brito, E. H. S., Fontenelle, R. O. S. (2017). Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). *Hoehnea*, 44, 158-171. <http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-68/2016>.
- Coutinho, H. D. M., Costa, M. G. J., Lima, O. E., Falcão-Silva, S. V., Siqueira-Júnior, P. J. (2008). Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*, 54, 328-330. <https://doi.org/10.1159/000151267>.
- Dahham, S. S., Tabana, N. Y., Iqbal, A. M., Ahamed, K. B. M., Ezzat, O. M., Majid, A. S. A., Majid, A. S. M. A. (2015). The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, 20, 11808-11829. <https://doi.org/10.3390/molecules200711808>.
- Dambolena, J. S., Zunino, P. M., Lucini, I. E., Zyglado, A. J., Banchio, E., Biurrun, F., Ahumada, O. E. A. (2010). Aromatic plants of northwest Argentina. Constituents of the essential oils of aerial parts of seven Verbenaceae: *Lantana* and *Aloysia*. *Journal of Essential Oil Research*, 22, 289-293. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700326>.
- Domínguez, E., Zarazaga, M., Sáenz, Y., Briñas, L., Torres, C. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from healthy children in Spain. *Microbial Drug Resistance*, 8, 321-7. <https://doi.org/10.1089/10766290260469589>.
- Dorman, H., Deans, S. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>.
- Eumkeb, G., Sakdarat, S., Siriwong, S. (2010). Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine*, 18, 40-45. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.09.003>.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Scheffer, J. J. C. (1997). Physiological aspects of essential oil production. In: *Essential Oils: Basic and Applied Research*.

- Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils Vienna, Áustria September 8-11 Edits., Ch. Franz, Á. Máthé and G. Buchbauer. Carol Stream: Allured Pub. Corp Vienna, Austria. 95–107.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>.
- Garcia, M. C. F., Soares, D. C., Santana, R. C., Saraiva, E. M., Siani, A. C., Ramos, M. F. S., Danelli, M. G. M., Souto-Padron, T. C., Pinto-da-Silva, L. H. (2018). The in vitro antileishmanial activity of essential oil from *Aloysia gratissima* and guaiol, its major sesquiterpene against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology*, 145, 1219-1227. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002335>.
- Gibbons, S. (2004). Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*, 21, 263-277. <https://doi.org/10.1039/b212695h>.
- Goleniowski, M. E., Bongiovanni, G. A., Palacio, L., Nuñez, C. O., Cantero, J. J. (2006). Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 324-341. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.026>.
- Goren, A. C., Piozzi, F., Akcicek, E., Kılıc, T., Çarıkçı, S., Mozioglu, E., Setzer, N. W. (2011). Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochemistry Letters*, 4, 448–453. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2011.04.013>.
- Grillo, V. T. R. S., Gonçalves, T. G., Júnior, J. C., Paniágua, N. C., Teles, C. B. G. (2013). Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, 34, 117-123.
- Guimarães, L. G. L., Cardoso, G. M., Souza, M. R., Zacaroni, B. A., Santos, R. G. (2014). Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: Composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*, 45, 267-275. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902014000200006>.
- Klevens R. M. (2007). Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Journal of the American Medical Association*, 298, 1763-1771. <https://doi.org/10.1001/jama.298.15.1763>.
- Korb, A., Nazareno, E. R.,endonça F. A., Dalsenter, P. R. (2013). Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. *Revista de Biologia e Ciência da Terra*, 13, 72-79.
- Kumphune, S., Prompant, E., Phaebuaw, K., Sriudwong, P., Pankla, R., Thongyoo, P. (2011). Anti-inflammatory effects of the ethyl acetate extract of *Aquilaria crassna* inhibits LPS-induced tumour necrosis factor-alpha production by attenuating P38 MAPK activation. *International Journal of Green Pharmacy*, 5, 43-48. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.82099>.
- Lewis K. (2001). In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3, 247–54.

- Lima, M. F. P., Borges, M. A., Parente, R. S., Júnior, R. C. V., Oliveira M. E. (2015). *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – Revisão de Literatura. *Revista Uningá Review*, 21, 32-39.
- Mahizan, N. A., Yang, S-K., Moo, C-L., Song, A-LA., Chong, C-M., Chong, C-W., Abushelaibi, A., Lim, ES-H., Lai, K-S. (2019). Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) pathogens. *Molecules*, 24, 1-21. <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>.
- Maia, A. I. V., Torres, M. C. M., Pessoa, O. D. L., De Menezes, J. E. S.A., Costa, S. M. O., Nogueira, V. L. R. (2010). Volatile leaf oils of *Vernonia Brasiliiana* and *Vernonia remotiflora*: chemical composition and biological activity. *Quimica Nova*, 3, 584-586. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200701129>.
- Morita, Y., Tomida, J., Kawamura, Y. (2014). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 4, 422. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00422>.
- NCCLS. (National Committee For Clinical Laboratory Standards). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. 6ed. Pennsylvania, PA, USA; 2003. https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf/ accessed 10 January 2020.
- Neta, M. C. S., Vittorazzi, C., Guimarães, A. C., Martins, J. D. L., Fronza, M., Endringer, D. C., Scherer, R. (2017). Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time–kill curve studies. *Pharmaceutical Biology*, 1, 190-197. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200701129>.
- NIST (National Institute of Standards and Technology) Chemistry Webbook, edited by P. J. Linstrom and W. G. Mallard. (2016). <http://webbook.nist.gov/> accessed 20 junho de 2016.
- Oliveira, R. A. G., Lima, O. E., Vieira, L. W., Freire, L. R. K., Trajano, N. V., Lima, O. I., Souza, L. E., Toledo, S. M., Silva-Filho, N. R. (2006). Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 77-82. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000100014>.
- Pérez-zamora, C. M. Torres, C. A., Nuñez, M. B. (2018). Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Verbenaceae Species Growing in South America. *Molecules*, 23, 1-21. <https://doi.org/10.3390/molecules23030544>.
- Pierozan, M., Pauletti, G. F., Rota, L., Santos, A. C. A., Lerin, L. A., Cansian, R. L., Oliveira, J. V. (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. *Ciência e Tecnologia Alimentos*, 29, 764-770. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000400010>.
- Pinto, N. R. P. (2014). Estudo da atividade antibacteriana da Carvona e seus derivados Dissertação (mestrado) Univeridade da Beira Interior. Química Industrial. Covilhã, 2-112.
- Pop-Vicas, A., Opal, S. M. (2014). The clinical impact of multidrug-resistant gram-negative bacilli in the management of septic shock. *Virulence*, 5, 206-12. <https://doi.org/10.4161/viru.26210>.

- Reinhart, A. A., Oglesby-Sherrouse, A.G. (2016). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Distinct Iron Sources. *Genes*, 7, 126. <https://doi.org/10.3390/genes7120126>.
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *Journal of Infectious Diseases*, 197, 1079-1081. <https://doi.org/10.1086/533450>.
- Rodriguez, E. J., Ramis-Ramos, G., Heyden, Y. V., Simó-Alfonso, E. F., Lerma-García, M. J., Saucedo-Hernández, Y., Monteagudo, U., Morales, Y., Holgado, B., Herrero-Martínez, J. M. (2012). Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of the essential oil of *Murraya paniculata* leaves from the mountains of Central Cuba. *Natural Product Communications*, 7, 1527–1530. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1254251>.
- Santos, T. G., Laemmle, J., Rebelo, R. A., Dalmarco, E. M., Cruz, A. B., Schmit, A. P., Cruz, R. C. B., Zeni, A. L. B. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of *Aloysia gratissima* (Verbenaceae) leaf essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 27, 125-130. <https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1006737>.
- Santos, F. M., Pinto, J. E. B. P., Bertolucci, S. K. V., Alvarenga, A. A., Alves, M. N. I., Duarte, M. C. T. I., Sartoratto, A. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the leaves and flowers of *Aloysia gratissima*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15, 583-588. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000400015>.
- Silva, C. C., Vandresen, F., Oliveira, C. M. A., Kato, L., Tanaka, C. M. A., Ferreira, H. E. (2006). Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. (Verbenaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 593–595. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.01.001>.
- Silva, D. T., Silva, L. L., Amaral, L. P., Pinheiro, C. G., Pires, M. M., Schindler, B., Garlet, Q. I., Benovit, S. C., Baldisserotto, B., Longhi, S. J., Kotzian, C. B., Heinzmann, B. M. (2014). Larvicidal Activity of Brazilian Plant Essential Oils Against *Coenagrionidae* Larvae. *Journal of Economic Entomology* 7, 1714-1720. <https://doi.org/10.1603/ec13361>
- Souza, A. A., Wiest, J. M. (2007). Antibacterial activity of *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, herbsaint), used in the traditional medicine in Rio Grande do Sul State - Brazil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 9, 23-29.
- Sterhling, G. E., Leite, D. S., Silveira, W. D. (2010). Molecular typing and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, 14, 462-467. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702010000500007>.
- Taylor, P. W. (2013). Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42, 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.05.004>.
- Tintino, S. R. (2018). Avaliação da inibição de bombas de efluxos em linhagens de *Staphylococcus aureus* por substâncias sintéticas de origem natural. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 1-114.

- Trabulsi, L. R., Alterthum, F. (2015). *Microbiologia*. 6rd ed. Atheneu. São Paulo. São Paulo.
- Trovati, G., Chierice, O. G., Sanches, A. E., Galhiane, S. M. (2009). Essential oil composition of *Aloysia gratissima* from Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 21, 325-326. <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700183>.
- Wasicky, R. (1963). Uma modificação do aparelho de clevenger para extração de óleos essenciais. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, 1, 77-81.
- Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, A. S., Rasooli, I. (2006). Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochem*, 67, 1249–1255. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.04.025>.
- Yang, Q., Wu, J., Luo, Y., Huang, N., Zhen, N., Zhou, Y., Sun, F., Li, Z., Pan, Q., Li, Y. (2016). Guaiol regulates RAD51 stability via autophagy to induce cell apoptosis in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7, 62585–62597. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11540>.
- Zeni, A. L. B., Bosio, F. (2011). O uso de plantas medicinais em uma comunidade rural de Mata Atlântica – Nova Rússia, SC. *Neotropical Biology and Conservation*, 6, 55–63. <https://doi.org/10.4013/nbc.2011.61.07>.

4. CAPÍTULO III: CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1 CONCLUSÕES GERAIS

Com o presente trabalho pode-se concluir que o óleo essencial da *Aloysia gratissima* e seu composto majoritário β -cariofileno possuem atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. Observa-se que quando associados ao antibiótico norfloxacinina obteve-se uma ação sinérgica na redução da concentração inibitória mínima de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Verifica-se ainda que o composto isolado pode inferir sinergismo com a redução da CIM da gentamicina para *S. aureus* e eritromicina para *P. Aeruginosa*.

As variáveis encontradas no estudo mostram que para mitigar a resistência bacteriana pode-se realizar estudos com a combinação de antibióticos e terapias alternativas associadas ao uso de produtos naturais que possuam compostos químicos como o β -cariofileno, como é o caso da *Aloysia gratissima*, que podem auxiliar futuramente no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes.

4.2 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS

A atividade antibacteriana e ação sinérgica do óleo essencial de *A. gratissima* podem ser depreendidas pela ação do seu composto majoritário β -cariofileno, no entanto é necessário o desenvolvimento de mais estudos frente a atividade da planta, uma vez que, a literatura é escassa de trabalhos que estudaram a *Aloysia gratissima* e o seu composto majoritário β -cariofileno como agentes que favoreçam o sinergismos com antibióticos comumente utilizados. Busca-se ainda novas pesquisas *in vivo* para verificar essa atividade antibacteriana e avaliação da toxicidade.

5. ANEXOS

5.1 PRODUÇÕES CIENTÍFICAS LIGADAS AO MESTRADO




Article

GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil of *Ocotea odorifera* and Safrole: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pumps

Ray S. Almeida ¹, Priscilla R. Freitas ¹, Ana Carolina J. Araújo ¹, Irwin R. A. Menezes ¹, Eduardo L. Santos ¹, Saulo R. Tintino ¹, Talysson F. Moura ¹, Jaime R. Filho ², Vitória A. Ferreira ³, Ana Cristina A. Silva ⁴, Luiz E. Silva ⁵, Wanderlei do Amaral ⁶, Cicero Deschamps ⁶, Marcello Iriti ^{7*} and Henrique D. M. Coutinho ^{8*}

¹ Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri-URCA, Crato 63105-000, Brazil; rayalmeidasilva2306@gmail.com (R.S.A.); priscilla.z.freitas@hotmail.com (P.R.F.); caroljustino@outlook.com (A.C.J.A.); Irwin.alencar@urca.br (I.R.A.M.); Eduardulo.santos@kroton.com.br (E.L.S.); saulo.tintino@urca.br (S.R.T.); talysson771.moura@gmail.com (T.F.M.)

² Genpalo Meniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA), Salvador 40296-710, Brazil; jaime.zibetto@fio cruz.br

³ Department, Christus University Center-Unichristus, Fortaleza 60.190-060, Brazil; vitoriaferreira057@outlook.com

⁴ Department, Maurício de Nassau College-UNINASSAU, Petrolina, 58401-115, Brazil; 01180813@prof.uninassau.edu.br

⁵ Post graduate Program in Sustainable Territorial Development, Federal University of Paraná-UFPR, Marimbos 59950-000, Brazil; luizneves@ufpr.br (L.E.S.); wdoamaral@ufpr.br (W.d.A.)

⁶ Department, Post graduate Program in Agronomy, Federal University of Paraná-UFPR, Curitiba 80011970, Brazil; cicero@ufpr.br

⁷ Department of Agricultural and Environmental Sciences, Milan State University, via G. Galvani 2, 20133 Milan, Italy

* Correspondence: marcello.iriti@unimi.it (M.I.); hdmcoutinho@urca.br (H.D.M.C.)

Received: 21 April 2020; Accepted: 5 May 2020; Published: 12 May 2020

Abstract: Considering the evidence that essential oils, as well as safrole, could modulate bacterial growth in different resistant strains, this study aims to characterize the phytochemical profile and evaluate the antibacterial and antibiotic-modulating properties of the essential oil *Ocotea odorifera* (EOOO) and safrole against efflux pump (EP)-carrying strains. The EOOO was extracted by hydrodistillation, and the phytochemical analysis was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The antibacterial and antibiotic-modulating activities of the EOOO and safrole against resistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were analyzed through the broth microdilution method. The EP-inhibiting potential of safrole in association with ethidium bromide or antibiotics was evaluated using the *S. aureus* 1199B and K2068 strains, which carry genes encoding efflux proteins associated with antibiotic resistance to norfloxacin and ciprofloxacin, respectively. A reduction in the MIC of ethidium bromide or antibiotics was used as a parameter of EP inhibition. The phytochemical analysis identified 16 different compounds in the EOOO including safrole as the principal constituent. While the EOOO and safrole exerted clinically relevant antibacterial effects against *S. aureus* only, they potentiated the antibacterial activity of norfloxacin against all strains evaluated by our study. The ethidium bromide and antibiotic assays using the strains of *S. aureus* SA1119B and K2068, as well as molecular docking analysis, indicated that safrole inhibits the NorA and MepA efflux pumps in *S.*

Antibiotics 2020, 9, 247; doi:10.3390/antibiotics908247 www.mdpi.com/journal/antibiotics

Antibiotics 2020, 9, 247

2 of 26

aureus. In conclusion, *Ocotea odorifera* and safrole presented promising antibacterial and antibiotic-enhancing properties, which should be explored in the development of drugs to combat antibacterial resistance, especially in strains bearing genes encoding efflux proteins.

Keywords: ethidium bromide; bacterial resistance; biological activity; chemical composition

1. Introduction

Compounds generated by the secondary metabolism of plants constitute a large group of substances with significant structural and functional diversity, among which essential oils are notable bioactive compounds with antifungal, antiviral, antiprotozoal and antibacterial properties [1–4]. Essential oils are complex mixtures of volatile and aromatic compounds found in a great variety of plant species, acting in defense against infections, parasites, and other stress conditions [5,6]. In this context, terpenes, which comprise the largest class of natural products, have been identified as very potent bioactive compounds [7]. Thymol and carvacrol are notable compounds with potent antimicrobial activities. These monoterpenes have been found as major constituents of essential oils obtained from a wide variety of species of the *Origanum* genus, the essential oil of the

Article

Potentialiation of the antibiotic activity of gentamicin and erythromycin by the essential oil of *Ocotea odorifera* (VELL) ROWHER and safrole

Ray Silva de Almeida¹, Jaime Ribeiro-Filho², Priscilla Ramos Freitas¹, Ana Carolina Justino de Araújo¹, Eduardo Lourenço dos Santos¹, Saulo Relison Tintino¹, Talysson Felismo Moura¹, Vitória Assunção Ferreira¹, Beatriz Assunção Ferreira¹, Pedro Ivo Palacio Leite¹, Ana Cristina Albuquerque da Silva⁴, Luiz Everson da Silva⁵, Wanderlei do Amaral⁵, Cícero Deschamps⁶, Henrique Douglas Melo Coutinho^{*}

¹ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil; rayalmeidasilva2306@gmail.com (R.S.A.); priscilla.r.freitas@hotmail.com (P.R.F.); caroljustino@outlook.com (A.C.J.A.); Eduardo.l.santos@kroton.com.br (E.L.S.); saulo.tintino@urca.br (S.R.T.); talysson97f.moura@gmail.com (T.F.M.)

² Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA); jaimeribeiro@fiocruz.br³ Centro Universitário Christus – Unichristus, Fortaleza (CE), Brasil; vitoriaferreira057@outlook.com; beatrizferreiraassuncao@gmail.com

⁴ Faculdade Maurício de Nassau - UNINASSAU, Petrolina (PE), Brasil; 011800513@prof.uninassau.edu.br

⁵ Post Graduate Programme in Sustainable Territorial Development, Federal University of Paraná – UFPR, Matinhos, Brazil; luizeverson@ufpr.br (L.E.S.); wdoamaral@ufpr.br (W.A.)

⁶ Post Graduate Programme in Agronomy, Federal University of Paraná - UFPR, Curitiba, Brazil; cicero@ufpr.br

* Correspondence: hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.)

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: In a recent study, our research group demonstrated that the essential oil of *Ocotea odorifera* (ECCO) and its major compound safrole potentiated the action fluoroquinolones, modulating bacterial resistance possibly due to direct inhibition of efflux pumps. Thus, in the present study, we investigated whether these treatments could enhance the activity of gentamicin and erythromycin

6. APÊNDICE

6.1 METODOLOGIA ESTENDIDA (METHODX)

Origem do produto

Na extração do óleo essencial foi utilizado ramais terminais da planta. Colhidos nos Campos Gerais, Vale do Ribeira e no Litoral do Paraná, assim como também em Atalanta, Santa Catarina Sul do Brasil. A coleta foi aleatória de pelo menos 10 plantas individuais. As amostras foram secas a 40°C por 24h em secador elétrico (Lawrence, 1951; IBGE, 1992)

No campo foram localizadas as espécies, e preparadas as exsiccatas para posterior identificação botânica e registro fotográfico. As exsiccatas foram transportadas até o Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba e Herbário das Faculdades Integradas Espírita, para serem herborizadas (Lawrence, 1951; IBGE, 1992), sendo tombadas no acervo, e também no Herbário Royal Botanic Gardens, Kew, Inglaterra.

Extração e determinação da composição química do óleo essencial das folhas de *Aloysia gratissima*

Para a extração do óleo essencial foi utilizada a metodologia de hidrodestilação em aparelho graduado do tipo Clevenger durante 2 horas e meia. Utilizou-se 1 litro de água para cada 50g de folhas secas, com 3 (três) repetições (WASICKY, 1963). Para a verificação do teor de umidade das folhas frescas foram coletadas amostras de 20g em triplicata. As folhas foram secas por secador elétrico com circulação de ar a 65°C até atingir peso constante. Após a extração o óleo foi coletado com pipeta de precisão e armazenado em freezer que permaneceram até o momento da análise. Para determinação do teor de OE em base seca, foi aferido a massa total de óleo essencial produzido em relação a quantidade de massa seca de material botânico utilizada na extração.

A identificação dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Os óleos essenciais foram diluídos em diclorometano na proporção de 1 % e 1,0 µL da solução foi injetada, com divisão de fluxo de 1:20 em um cromatógrafo Agilent 6890 (Palo Alto, CA) acoplado a detector seletivo de massas Agilent 5973N. O injetor permaneceu a 250 °C. A separação dos constituintes obteve-se em coluna capilar HP-5MS (5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Para a quantificação, as amostras diluídas foram injetadas em cromatógrafo Agilent 7890A equipado com detector de ionização por chama (DIC), operado a 280°C. A composição percentual constou-se pela integração eletrônica do sinal do DIC pela divisão da área de cada componente pela área total (área %).

A identificação dos constituintes químicos foi obtida por comparação de seus espectros de massas com aqueles das espectrotescas (WILEY, 1994; NIST, 2016) e também por seus índices de retenção linear, calculados a partir da injeção de uma série homóloga de hidrocarbonetos (C7-C26) e comparados com dados da literatura (ADAMS, 2007).

Microrganismos, meio de cultura e preparo de inóculo

A linhagem microbiana utilizada foi de bactérias multirresistentes: *Pseudomonas aeruginosa* 24, *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06. A tabela 1 explana a origem e o perfil dessas cepas demonstrado no trabalho de Bezerra et al (2017).

As bactérias foram inicialmente mantidas em ágar sangue para comprovar o tipo de cepa (Laboratorios Difco Ltda., Brazil), depois transferidas para o estoque. Sendo mantidas em dois estoques, um em Heart Infusion Agar slants (HIA, Difco) a 4° C e o outro mantido em glicerol em freezer -80 ° C. Para o estudo foram utilizados os meios Agar Heart Infusion (HIA, difco laboratories Ltda.) e Caldo Brain Heart Infusion (BHI, difco laboratories Ltda.).

Tabela 1: Origem e perfil de resistência a antibióticos das cepas.

Cepas bacterianas	Origem	Perfil de resistência
<i>S. aureus</i> 10	Swab retal	Amc, Amox, Amp, Asb, Azi, Ca Cef, Cf, Cip, Cla, Clin, Ery, Lev, Mox, Oxa, Pen
<i>E. coli</i> 06	Urina	Asb, Ca, Cef, Cfo, Cmp, Cro
<i>P. aeruginosa</i> 24	Corrimento nasal	Ami, Cip, Com, Ctz, Imi, Lev, Mer, Ptz

Subtítulo: Amc - Amoxicilina + Ácido Clavulânico, Ami - Amicacina, Amox - Amoxicilina, Amp - Ampicilina, Asb - Ampicilina + Sulbactam, Azi - Azitromicina, Ca - Cefadroxil; Cef - Cefalexina, Cfo - Cefoxitina, Cip - Ciprofloxacina, Cla - Claritromicina, Clin - Clindamicina, Cmp –Cefepima, Cro- Ceftriaxona, Ctz - Ceftazidima, Eri - Eritromicina, Imi - Imipenem, Mer - Levoflox, Moxifloxacina, Oxa - Oxacilina, Caneta - Penicilina e Ptz - Piperacilina

Para os testes da pesquisa foram realizados semeios das bactérias em meio sólido e mantidas a 4°C em Heart Infusion Agar (HIA). A partir desse meio sólido realizou-se inóculos utilizando tubos de ensaio contendo solução salina estéril, e esse inóculo teve como padrão a

escala Mcfarland 0.5 que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC. Todas as bactérias utilizadas foram de semeios realizados no período de 24 horas antes do teste.

Preparo dos antibióticos

Para o preparo, os antibióticos foram dissolvidos em DMSO a 10 mg/mL e diluídos em água, diminuindo a concentração para 1024 µg/mL.

Determinação da concentração inibitória mínima (cim)

Os ensaios da CIM realizou-se em série através da técnica de microdiluição em caldo utilizando placas esterilizadas (CLSI, 2009) com adaptação. As culturas bacterianas mantidas em ágar estoque sob refrigeração a 80°C as quais serão repicadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 37°C durante 24 h. Posteriormente, Após esse período, foi preparado o meio de distribuição na concentração de 10%, que foi adicionado em eppendorfs 900µL de meio BHI e 100µL de inóculo, e este meio de distribuição foi transferido para cada cavidade 100 µL.

Posteriormente realizou-se a microdiluição do OEAG e do composto β-cariofileno, com concentração de 1024 µg/mL, sendo 100 µL nesse meio até penúltima cavidade, sendo a última cavidade o controle de crescimento. As concentrações das amostras no meio de cultura variavam entre 1024 e 8 µg/mL. Os testes foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C, durante 24 h. Foi utilizada a resazurina sódica como substância reveladora. Esta solução será preparada em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Considerou-se inibição poços que não apresentaram crescimento microbiano, ou seja, permaneceram com a coloração azul e negativa os que obtiveram coloração vermelha.

Avaliação da interferência do OEAG e β-cariofileno sobre ação potencializadora aos antibióticos.

Na análise da ação do óleo essencial e composto majoritário como potencializadores da ação antibiótica, foram utilizadas concentrações subinibitórias (CIM/8) (Coutinho et al., 2008) com as cepas *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*. A CIM dos antibióticos gentamicina, eritromicina e norfloxacina, foram avaliadas na presença e na ausência das substâncias teste em microplacas estéreis. Todos os antibióticos testados foram obtidos junto à Sigma.

Foram utilizados inóculos padronizados. Do produto β -cariofileno usou-se concentrações subinibitórias de CIM/8 referente a metodologia adaptada de Coutinho et al., (2008) e Tintino et al., (2018). Nos eppendorfs com volume total de 1,5mL adiciona 10% do inóculo bacteriano com o composto majoritário e adicionado meio BHI até completar 1,5 mL. Posteriormente realizou-se a transferências de 100 μ L dessa solução para placas de microdiluição de 96 poços preenchendo todos os poços. Foram produzidos controles para os antibióticos apenas com o meio BHI e inóculo bacteriano. Após esse processo deu-se isso à microdiluição seriada dos antibióticos. Ressaltando que a microdiluição realizada até o penúltimo poço. As concentrações variaram de 1024 μ g/mL a 0,5 μ g/mL. As placas são incubadas e reveladas em condições semelhantes a etapa de CIM.

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média geométrica \pm desvio padrão, avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo pos-test Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism. 7.0, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Referências

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 2007.

BEZERRA C.F. et al. Vanillin Selectively Modulates the action of antibiotics against resistant bacteria, **Microbial Pathogenesis**, v.113, p, 265-268, 2017.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bactéria That Grow Aerobically; Approved Standard- Eighth Edition**. Wayne, CLSI document M07-A8, 2009.

COUTINHO, H. D. M et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.

LAWRENCE, G. H. M. **Taxonomia das Plantas Vasculares**, volume I, Fundação Galouste Gulbenkian, Lisboa 1951, 296p.

NIST Chemistry Webbook, edited by P. J. Linstrom and W. G. Mallard, <http://webbook.nist.gov> (acessado em junho de 2016).

TINTINO, S. R. **Avaliação da inibição de bombas de efluxos em linhagens de *Staphylococcus aureus* por substâncias sintéticas de origem natural.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2018.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade de farmácia e Bioquímica**, São Paulo, v.1, n. 1, p. 77-81, 1963.

Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edn. **Wiley Interscience**, New York, 1994.