



**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**

RAY SILVA DE ALMEIDA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E POTENCIALIZADORA DA AÇÃO DE
ANTIBIÓTICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea odorífera* E SEU COMPOSTO
MAJORITÁRIO, FRENTE A CEPAS PORTADORAS DE BOMBAS DE EFLUXO**

**CRATO - CE
2020**

RAY SILVA DE ALMEIDA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E POTENCIALIZADORA DA AÇÃO DE
ANTIBIÓTICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea odorífera* E SEU COMPOSTO
MAJORITÁRIO, FRENTE A CEPAS PORTADORAS DE BOMBAS DE EFLUXO**

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

Orientador: Prof. Dr. Henrique
Douglas Melo Coutinho

Coorientador: Prof. Dr. Saulo Relison
Tintino

**Crato – CE
2020**

RAY SILVA DE ALMEIDA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E POTENCIALIZADORA DA AÇÃO DE
ANTIBIÓTICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea odorífera* E SEU COMPOSTO
MAJORITÁRIO SAFROL, FRENTE A CEPAS PORTADORAS DE BOMBAS DE
EFLUXO**

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

Dissertação aprovada em: __/__/__

Banca examinadora:

Prof. Dr. Henque Douglas Melo Coutinho
Orientador
URCA

Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos
Membro avaliador interno
UVA

Prof. Dra. Natália Ana Pereira da Cruz Martins
Membro avaliador externo
University of Porto

Prof. Dr. Luiz Everson da Silva
Membro avaliador externo (Suplente)
UFPB

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira
Membro Avaliador Interno (Suplente)
URCA

RESUMO

A disseminação de bactérias multiressistentes e o surgimento de novos perfis de resistência bacteriana mediante as diversas drogas utilizadas na clínica, a uma necessidade de novas alternativas de controle que possa atuar como inibidores dos mecanismos de resistência, e também como potencializadores de antibióticos. Mediante a capacidade que os óleos essenciais (OE) tem de conter atividades biológicas antibacteriana e antifúngica, este estudo dedicou-se a analisar o perfil fitoquímico da planta *Ocotea odorífera* e avaliar as propriedades antibacteriana e potencialização de antibióticos utilizados na clínica. Além de analisar o óleo essencial de *Ocotea odorífera* (E000) avaliou também a capacidade de atividade direta do safrol, como também o seu efeito potencializador e inibidor de bombas de efluxo. O E000 de folhas de ramos terminais foi obtido por hidrodestilação, e a análise química foi realizada pela cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). As atividades antibacteriana e potencializadora de antibióticos frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram analisadas pelo método de microdiluição em caldo. O efeito potencial de inibição de bombas de efluxo pelo safrol em associação ao brometo de etídio ou antibióticos foi avaliado usando as cepas de *S. aureus* 1199B e K2068, que são responsáveis por carregar os genes que codificam proteínas de efluxos associado a resistência aos antibióticos norfloxacina e ciprofloxacina, respectivamente. A redução da CIM do brometo de etídio e dos antibióticos foi utilizadas como parâmetro para inibição das bombas de efluxo. A análise química foi identificado 16 compostos, sendo o safrol o composto majoritário com 77,9 %. Na atividade antibacteriana direta o E000 e o safrol apresentaram atividade clinicamente relevantes apenas contra a cepa de *S. aureus*, com uma CIM de 512 µg/mL, porém eles apresentaram efeito potencializador de antibióticos contra todas as cepas testadas quando associado a norfloxacina. E000 mostrou um efeito sinérgico com Eritromicina contra a cepa de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, no entanto, não teve efeito significativo contra *E. coli*. A gentamicina associada ao E000 e também ao safrol mostrou atividade apenas contra *S. aureus*. Os ensaios de brometo de etídio e antibióticos usando as cepas de *S. aureus* SA1119B e K2068, bem como a análise de docking molecular, indicaram que o safrol inibe as bombas de efluxo NorA e MepA em *S. aureus*. Em conclusão, E000 e safrol apresentaram propriedades antibacterianas e potencializadoras de antibióticos promissoras, que devem ser exploradas no desenvolvimento de drogas para combater a resistência antibacteriana, especialmente em cepas portadoras de genes que codificam proteínas de efluxo.

Palavras-Chave: NorA. MepA. Safrol. *Ocotea odorífera*.

ABSTRACT

The spread of multi-resistant bacteria and the emergence of new profiles of bacterial resistance through the various drugs used in the clinic, to a need for new control alternatives that can act as inhibitors of resistance mechanisms, and also as antibiotic enhancers. Through the ability that essential oils (EO) have to contain biological activities, this study was dedicated to analyzing the phytochemical profile of the *Ocotea odorifera* plant and to evaluate the antibacterial properties and potentiation of antibiotics used in the clinic. In addition to analyzing the essential oil of *Ocotea odorifera* (E000), it also evaluated the direct activity capacity of safrole, as well as its potentiating and inhibiting effect of efflux pumps. E000 was obtained by hydrodistillation, and chemical analysis was performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-ME). The antibacterial and antibiotic enhancing activities against the strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, were analyzed using the broth microdilution method. The potential effect of inhibiting efflux pumps by safrole in association with ethidium bromide or antibiotics was evaluated using the strains of *S. aureus* 1199B and K2068, which are responsible for carrying the genes that code for efflux portins associated with resistance to norfloxacin antibiotics. and ciprofloxacin, respectively. The reduction in the MIC of ethidium bromide and antibiotics was used as a parameter to inhibit efflux pumps. Chemical analysis identified 16 compounds, with safrole being the major compound. In direct antibacterial activity, E000 and safrole showed clinically relevant activity only against the strain of *S. aureus*, however they showed a potentiating effect of antibiotics against all tested strains when associated with norfloxacin. E000 showed a synergistic effect with Erythromycin against the strain of *P. aeruginosa* and *S. aureus*, however, it had no significant effect against *E. coli*. Gentamicin associated with E000 and also safrole showed activity only against *S. aureus*. The ethidium bromide and antibiotic assays using the *S. aureus* SA1119B and K2068 strains, as well as the molecular docking analysis, indicated that safrole inhibits NorA and MepA efflux pumps in *S. aureus*. In conclusion, E000 and safrol showed promising antibacterial and antibiotic enhancing properties, which should be explored in the development of drugs to combat antibacterial resistance, especially in strains carrying genes that encode efflux proteins.

Keywords: NorA. MepA. Safrole. *Ocotea odorifera*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de resistência bacteriana	21
Figura 2 – Ramos terminais da planta <i>Ocotea odorífera</i>	24
Figura 3 – Molécula de safrol.....	28
Figura 4 – Transformação química do safrol	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- MDR – Resistência a múltiplas drogas
- CIM – Concentração inibitória mínima
- CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute
- MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina
- PLPs – Proteínas ligadoras de penicilinas
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- LPS – Lipopolissacarídeo
- SHU – Síndrome hemolítico-urêmica
- ECP – *Escherichia coli* Common Pilus
- BLEE – Enzimas β -lactamases de espectro estendido
- ERC – Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos
- EUA – Estados Unidos da América
- ABC – ATP binding cassette – Cassete de ligação de ATP
- MATE - Multi-drug and toxic efflux - Multidrogas e efluxo tóxico
- RND – Resistência - nodulação-divisão
- SMR – Pequena resistência a várias drogas
- MF – Facilitador principal
- cm – Centímetro
- OE – Óleo essencial
- IPP – Pirofosfato de isopentenila
- DMAPP – Pirofosfato de dimetilalila
- C – Carbono
- H – Hidrogênio
- O – Oxigênio
- °C – Graus Celsius
- E000 – Óleo essencial de *Ocotea odorífera*
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 Objetivos e questionamentos.....	11
1.2 Estratégias de pesquisa.....	12
1.3 Estrutura da dissertação	13
2. CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 Bactérias	14
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2.1.3 <i>Escherichia coli</i>	18
2.2 Terapias com antibacterianos.....	19
2.3 Mecanismo de resistência	20
2.3.1 <i>Bomba de efluxo</i>	21
2.4 Plantas medicinais.....	23
2.5 <i>Ocotea odorífera</i>.....	24
2.5.1 <i>Características Botânicas</i>	24
2.5.2 <i>Metabolitos Secundários</i>	25
2.5.3 <i>Atividade biológica do óleo essencial de <i>Ocotea odorífera</i></i>	26
2.6 Derivados de produtos naturais.....	27
2.6.1 <i>Óleo essencial</i>	27
2.6.2 <i>Terpenos</i>	27
2.6.3 <i>Safrol</i>	29
REFERÊNCIAS.....	31
3. CAPÍTULO II - GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil of <i>Ocotea odorífera</i> and Safrole: Inhibition of <i>Staphylococcus aureus</i> Efflux Pumps	41
1. Introduction	42
2. Results	43
3. Discussion	48

4. Materials and Methods	50
5. Conclusions.....	54
References.....	55
4. CAPÍTULO III - Potentiation of the antibiotic activity of gentamicin and erythromycin by the essential oil of <i>Ocotea odorifera</i> (VELL) ROWHER and safrole	60
1. Introduction.....	61
2. Results	61
2.1. Chemical composition of the EOOO	61
2.2. Antibiotic-enhancing activity of the EOOO	63
2.3. Effects of safrole on antibiotic resistance to gentamicin and erythromycin	63
3. Discussion	64
4. Materials and Methods.....	65
4.1. Collection, extraction and analysis of the botanical material	65
4.2. Bacterial cultures	66
4.3. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC).....	66
4.4. Analysis of antibiotic resistance modulation	66
4.5. Statistical analysis.....	67
5. Conclusions.....	67
References	68
5. CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
5.2 Conclusões gerais	71
5.3 Perspectivas de investigações futuras	71

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Objetivos e questionamentos

Perante a necessidade de se encontrar alternativas para o controle microbiano, observou que uso de plantas como alternativa terapêutica é uma prática milenar no mundo, e o potencial que os mesmos possuem, estimulam pesquisadores a um intenso e árduo estudo para promoção da saúde. O Brasil por possuir uma valiosa e ampla biodiversidade natural, tem recebido destaques quanto a quantidade de plantas com princípios medicinais (TENÓRIO *et al.*, 2016; LIMAVERDE *et al.*, 2017; HARAGUCHI; CARVALHO, 2010).

Dessa forma, com o objetivo de descobrir substância que atuem inibindo a resistência microbiana ou o crescimento microbiano, as plantas se tornaram uma alternativa terapêutica por possuírem compostos químicos com propriedades antimicrobianas que têm contribuído com resultados significativos e eficientes em tratamentos terapêuticos (ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006).

A utilização de produtos naturais é uma fonte muito útil, porém, é necessário a realização de pesquisas direcionadas na busca de substâncias que sejam eficazes, econômicas e ecologicamente viáveis para que os compostos bioativos das plantas possam ser utilizados de forma segura, e uma das maneiras para se estudar esses compostos é através da obtenção do óleo essencial (FIGUEREDO *et al.*, 2013; OLIVEIRA-TINTINO *et al.*, 2018).

A composição química de diversos tipos de plantas tem sido estudadas para verificar as propriedades químicas e farmacológicas dos seus constituintes. O rendimento e a composição dos óleos essenciais são frequentemente relacionados a vários fatores climáticos e ambientais como: temperatura, umidade, precipitação, solo, estação do ano, além do tempo de coleta das folhas, casca, semente ou raiz (SILVA *et al.*, 2018; BAHMANI & SCHMIDT, 2018; SOUZA *et al.*, 2019).

Dentre as plantas utilizadas podemos destacar a *Ocotea odorífera* pertencente à família *Lauraceae* que tem cerca de 350 espécies das quais 160 são encontradas no Brasil. É popularmente conhecida como canela-sassafrás e tem uma maior concentração na Mata atlântica, Rio Grande do Sul e o Sul da Bahia (FILHO & NOGUEIRA, 2005; YAMAGUCHI *et al.*, 2011)

Estudos fitoquímica anteriores com *Ocotea odorífera* demonstrou a presença de esteroides, terpenos, flavonoides, como o canferol e quercetina. O safrol, que é caracterizado como um terpeno, está presente como substância majoritária do óleo essencial, uma substância comercializada no mundo inteiro e utilizada em vários ramos industriais, fato esse que levou a

espécie a ser incluída na lista oficial de ameaçadas de extinção (CARMO *et al.*, 2007).

Os terpenos, por exemplo, são metabolitos secundários presentes em produtos naturais e que apresentam atividades antimicrobianas atuando como inibidor de bombas de efluxo. Atividades inibitórias e potencializadora de antimicrobianos foram demonstradas com os terpenos limoneno e α -pineno, demonstrando que os produtos naturais, em especial os terpenos, pode ser uma boa alternativa como inibidor de bomba de efluxo e potencializador de antibióticos para combater o mecanismo de resistência para um melhor tratamento terapêutico (FREITAS *et al.*, 2020; ARAÚJO *et al.*, 2020; LIMAVERDE *et al.*, 2017).

A terapêutica com os antimicrobianos depende de vários fatores, assim como, o desenvolvimento da resistência bacteriana. O uso inadequado de antimicrobianos e o seu espectro maior do que o necessário para combater as infecções, além da terapia prolongada são fatores que facilitam a seleção de cepas resistentes (LIMA *et al.*, 2017). E de acordo com Costa & Junior (2017) as cepas selecionadas podem adquirir essa resistência aos fármacos pelas seguintes situações: inativação enzimática do antibiótico, modificação do alvo do antibiótico, bomba de efluxo, produção de β -lactamase e formação de biofilmes.

As bombas de efluxos, por exemplo, estão associadas a um dos fatores de resistência sendo elas proteínas de transporte que faz a retirada de produtos indesejados pela célula para o meio externo, e dentre esses produtos indesejados ou tóxicos estão os antibióticos. Algumas bombas pode ser específica para um composto ou antibiótico, outras, no entanto, pode transportar vários tipos de antibióticos estando assim associado a resistência a múltiplas drogas (MDR) (BAMBEKE; BALZI; TULKENS, 2000; PIDDOCK, 2006).

Dentre as cepas resistentes algumas se destacam como o *Staphylococcus* que é uma bactéria caracterizada como Gram-positivas e a mais resistente aos antibióticos ao passo que as bactérias Gram-negativas mais resistentes são das espécies *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (LOUREIRO *et al.*, 2016; SILVA & AQUINO, 2018; DUARTE *et al.*, 2018; OLIVEIRA-TINTINO *et al.*, 2018). Oliveira *et al* (2016) registrou em seu trabalho que dentre a família *Enterobacteriaceae*, as espécies *Escherichia spp* e a *Klebsiella spp* se destacam pela elevada taxa de infecções e sua resistência acentuada a diversos fármacos.

Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade antibacteriana e o efeito de potencialização de antibióticos pelo óleo essencial da planta *O. odorífera* e do safrol seu composto majoritário, como também a inibição de bombas de efluxo.

1.2 Estratégias de pesquisa

As infecções causadas pelas bactérias tem sido há muito tempo o problema de muitas

mortes em vários setores da sociedade. A partir do descobrimento da penicilina por Alexander Fleming no ano de 1928, o uso de antibióticos para combater as enfermidades causadas por esses microrganismos tem crescido. Essa descoberta abriu novos caminhos para pesquisas científicas voltada a novos fármacos (HOEFEL & LAUTERT, 2006; ALÓS, 2015). Mota *et al* (2005) cita em seu trabalho que o descobrimento dos antibióticos além de ter sido um grande avanço nas ciências médicas também tem contribuído para uma diminuição da mortalidade e da morbidade por doenças infecciosas.

Para a realização dos testes algumas metodologias foram aplicadas para avaliar as atividades bacterianas, modificação da atividade de antibióticos, inibição de bomba de efluxo e interação molecular. Um método comumente utilizado para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) é a microdiluição em caldo realizadas em placas de 96 poços proposta pela CLSI (2015). A CIM é utilizada para avaliar a atividade bacteriana direta de derivados de produtos naturais, como por exemplo; óleos essenciais e seus compostos majoritários isolados. Para avaliação do efeito potencializador da atividade antibiótica do óleo essencial e do seu composto majoritário foi utilizado a técnica proposta por Coutinho e colaboradores (2008).

O método de microdiluição em caldo de acordo com Tintino e colaboradores (2017), também foi utilizada para avaliar o efeito de inibição de bomba de efluxo pelo composto majoritário associado a substrato tóxico (Brometo de etídio) ou ao antibiótico frente a estirpes superexpressoras de efluxo.

Outra metodologia muito importante utilizada para validar os resultados foi a análise de dosagem molecular. O docking ajuda a entender como ocorre as interações moleculares entre o composto majoritário e a bomba de efluxo. A compreensão dessas interações permite a modificação de compostos para melhorar a ligação com a bombas de efluxo alvo causando assim uma inibição mais eficiente (SHRIRAM *et al.*, 2018; RAO *et al.*, 2018).

1.3 Estrutura da dissertação

A dissertação foi dividida da seguinte forma: Introdução (objetivos e questionamentos, estratégias de pesquisa e estrutura da dissertação), capítulo I (referencial teórico), capítulo II (artigo aceito ou submetido), capítulo III (artigo aceito ou submetido), capítulo IV (considerações finais, Perspectivas de investigações futuras e referências), anexos e apêndice.

2. CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Bactérias

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* compreende bactérias gram-positivas que medem de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro e pertencentes à família *Staphylococcaceae*. Essas características estão presentes nesse gênero: se assemelham a um cacho de uvas, catalase-positivas e negativas, esféricas de cocos, imóveis, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. Segundo Lee *et al* (2018) o cirurgião escocês Alexandre Ogston em 1880, descreveu o gênero *Staphylococcus* em pus de abscessos cirúrgicos. O *Staphylococcus aureus* é considerado a cepa de maior importância clínica dentre as 52 espécies e 28 subespécies conhecidas (FERRASSO; GONZALEZ; TIMM, 2015; SANTOS *et al.*, 2007).

Os *Staphylococcus* podem sobreviver por longo tempo em superfícies secas, bem como também, são sensíveis à temperatura alta, desinfetantes e soluções antissépticas. O *S. aureus* é a espécie bacteriana mais virulenta do seu gênero. A disseminação exógena das bactérias pode ser transferida para uma pessoa vulnerável pelo contato direto ou através de fômites. A disseminação endógena desta bactéria é a mais corriqueira, sendo responsável por muitas das infecções adquiridas nos hospitais. Sendo assim, profissionais da saúde devem utilizar técnicas adequadas de lavagem das mãos para prevenir a transmissão deste microrganismo aos pacientes ou entre os próprios pacientes (LIMA *et al.*, 2015).

O *S. aureus* é uma das únicas subespécies desse gênero, dentre as patogênicas para humanos, que produz a enzima extracelular, a coagulase, capaz de converter fibrinogênio em fibrina, causando a coagulação do plasma, fator esse usado para identificação de *S. aureus* e diferenciação dos outros tipos de estafilococos (MURRAY *et al.*, 2003).

Dentre os vários membros patogênicos da flora normal, distingue-se o *S. aureus*, no qual é o responsável por infecções piogênicas como pneumonias, septicemias fatais, endocardite, furúnculos e outros tipos de manifestações, podendo ser encontrado em várias partes do corpo, e em maior incidência na pele e nas mucosas, tais como fossas nasais, mãos, garganta e intestino. A infecção cruzada, aquela que ocorre de pessoa para pessoa, através do contato direto e indireto, estando na dependência de uma fonte (doentes ou portadores), além da taxa de microrganismos liberados, o que por sua vez, depende da capacidade do microrganismo de sobreviver ao ambiente onde se encontra e aos agentes 13 adversos, sendo dependente da sua patogenicidade, da presença de indivíduo susceptíveis ou imunodeprimidos (ALEMÁN, 2013; MIRANDA *et al* 2015; TAVARES *et al.*, 2015).

A diversidade de doenças causadas pela bactéria *S. aureus* tem sido atribuída pela capacidade da bactéria produzir ou expressar uma variada gama de fatores de virulência, que a proporciona sobreviver a resposta imune do hospedeiro. A patogenicidade das infecções por *S. aureus* está associada a produção de proteínas de superfície que realizam funções de patogenicidade específicas, como: aderência aos tecidos do hospedeiro, secreção de uma série de toxinas extracelulares e enzimas que destroem as células e tecidos do hospedeiro, evitando ou incapacitando a defesa imune. Todos os fatores de patogenicidade e virulência permitem o crescimento e disseminação da bactéria nas células do hospedeiro (LOWY, 1998; OTTO., 2014).

De acordo com Otto (2014) a membrana plasmática é o alvo de uma série de toxinas bacterianas produzidas pelo *S. aureus*. Essas toxinas são citolíticas e tem a função ou objetivo de causar poros na membrana, levando ao efluxo de moléculas e metabólitos vitais. Dois subgrupos podem ser distinguidos: aqueles para os quais a lise subsequente é dependente da interação inicial do receptor e apresentam alta especificidade da célula-alvo, e aqueles que interferem com as membranas de uma forma menos específica, sem interação do receptor.

Estão presentes na estrutura da parede celular do *S. aureus*, polissacarídeos e proteínas antigênicas, ácido teicóico, adesinas, o glicanopeptídeo, a proteína A, além da presença de cápsula. As betalactamases, coagulases, hialuronidases e catalases são algumas das enzimas produzidas para facilitar sua patogenicidade e resistência. O *S. aureus* também produz DNAses, lipases, proteases e esterases. Algumas toxinas produzidas por essa bactéria recebem destaques e são elas: alfa, beta e gama toxinas, a leucocidina, a esfoliatina, a toxina do choque tóxico e as enterotoxinas (LUTZ *et al.*, 2003; BRAUNWALD *et al.*, 2002; BERNARD *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2016).

O diagnóstico das patologias causadas por *S. aureus* é realizado através de coleta de amostras que são processadas para início de identificação. Um dos testes iniciais é a cultura em placas de Petri e identificação pela técnica de coloração de Gram e testes bioquímicos para avaliar as enzimas produzidas. A sorologia também pode ser optada para detecção de anticorpos específicos contra a bactéria. Os meios seletivos como ágar monitol salgado e DNase, pode ser utilizado para isolamento de *S. aureus*. Se faz essencial a identificação da bactéria causadora da patologia para uma antibioticoterapia mais racional e efetiva evitando assim maiores problemas com a resistência microbiana (BRITO; CAMPOS; BRITO, 2002; PFALLER, 2014).

A penicilina G descoberta por Alexander Fleming, em 1928, foi um marco na história para tratamento de doenças infecciosas, passando a ser usada para pacientes infectados pelo

Staphylococcus aureus. No entanto, a cepa logo veio a exibir resistência àquele agrupamento β -lactâmico nos hospitais do Reino Unido e dos EUA. O mesmo ocorreu com a meticilina, (primeira penicilina semissintética lançada em clínica em 1960) (LOUREIRO *et al.*, 2016).

As cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) é também resistente aos demais β -lactâmicos, como, as cefalosporinas, começaram a aparecer na década de 70. As MRSA se disseminaram rapidamente nos ambientes hospitalares, limitando, assim, a antibioticoterapia de combate às infecções causadas por estas cepas aos glicopeptídios, como a vancomicina e teicoplanina. Os *S. aureus* codificam enzimas denominadas proteínas ligadoras de penicilinas (PLPs). Essas enzimas são responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana e constituem alvos de ação dos antibióticos β -lactâmicos. A resistência do *S. aureus* à meticilina ou oxacilina (MRSA) se deve à aquisição do gene *mecA* que codifica PLPs alteradas. As MRSA expressam um subtipo de PLP denominada de PLP2a ou PLP2', que possui afinidade reduzida não somente à meticilina ou oxacilina, mas a todos os antibióticos β -lactâmicos (SILVA *et al.*, 2011).

Segundo Arantes *et al* (2013) o aumento no índice de infecções hospitalares causadas por *S. aureus* resistente a meticilina, provocou um aumento no uso do antibiótico vancomicina. Sendo esse medicamento difundido após o ano de 1980, conseqüentemente ouvi uma pressão na resistência a essa droga de escolha as cepas MRSA, e em 1997 foi isolado a primeira cepa resistente a vancomicina e posteriormente em 2000, no Brasil. A resistência à vancomicina é ocasionada pela presença do gene *vanA*, que normalmente é encontrado em *Enterococcus* resistente à vancomicina. Por fim, ainda de acordo com Arantes e colaboradores (2013), a resistência ela podem ser classificadas em dois grades grupos principais: 1- resistência adquirida pela mutação de algum gene no cromossomo bacteriano; 2- resistência adquirida por aquisição de gene através de transdução, transformação e conjugação (RATTI; SOUSA, 2012).

2.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *P. aeruginosa* é caracterizada como um procariote, bacilo Gram-negativo, que não fermenta glicose e que é amplamente distribuído pelo ambiente. A *P. aeruginosa* apresenta um ou mais flagelos, sendo assim, considerada móvel. É considerado um dos principais patógenos oportunistas em decorrência dos mecanismos de resistência, bem como a sua capacidade de inibir outras espécies bacterianas (ROSANOVA *et al.*, 2019)

Kong *et al.*, (2015), pronunciou em seu artigo que o agente oportunista *P. aeruginosa* está associado com diversos tipos de infecções hospitalares graves e é o líder nas causas de mortes em pacientes com fibrose cística. De acordo com Fuentefria *et al* (2008) a bactéria *P. Aeruginosa* é responsável por diversos tipos de infecções em sítios do corpo humano, em

particular os pacientes imunocomprometidos.

O microrganismo *P. aeruginosa* pode formar biofilme, que é uma comunidade sésseis de bactérias que podem mudar para forma de vida móveis. Bactérias que se encontra em um biofilme estão rodeadas por uma matriz extracelular que consiste na mistura de DNA extracelular, proteínas e exopolissacarídeo, o que confere resistência ao tratamento com antibióticos e com células do sistema imunológico. Os biofilmes podem formar uma variante de superfícies em nichos naturais até indústrias e hospitalares. Na resistência conferida aos biofilmes a agentes antimicrobianos e a seleção de variantes fenotípicas, eles se relacionam diretamente as infecções persistentes e crônicas (FERREIRA; LALA, 2010; SOTO, 2013).

Esta bactéria é capaz de sobreviver por longos períodos em ambientes adversos e desenvolver resistência a agentes antimicrobianos, além de ser amplamente distribuída pelo ambiente. Além da característica intrínseca de apresentar baixo nível de sensibilidade aos antimicrobianos, diversos mecanismos de resistência têm sido identificados em *Pseudomonas aeruginosa*. Isolados de *P. aeruginosa* apresentam um amplo espectro de resistência, podendo ser resistentes a diferentes classes de antimicrobianos, inclusive contra cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos (STOVER *et al.*, 2000; NEVES *et al.*, 2011).

O antibiótico imipenem e meropenem faz parte da classe dos carbapenêmicos e são beta-lactâmicos de amplo espectro utilizados em infecções por *P. aeruginosa*. Esses fármacos são considerados fármacos de reserva, ou seja, utilizados como último recurso. Devido ao aparecimento de cepas resistentes a esse medicamento o quadro de antibioticoterapia se tornou preocupante nos casos de infecções por esse microrganismo. A resistência a esses antibióticos se dá: 1- perda de porina; 2 – hidrólise enzimática; 3 – presença de proteínas de ligação às penicilinas com baixa afinidade por carbapenêmicos; 4 – superexpressão de bomba de efluxo (NEVES *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2013).

Whiteley e colaboradores (2001) descreve que muitas infecções persistentes de *P. aeruginosa* é causada pela formação de biofilmes e que isso provoca um dos principais mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos, que é a impermeabilidade da bactéria à entrada de antibióticos. O produto do gene *tolA* afeta a estrutura do LPS, resultando na diminuição da afinidade do aminoglicosídeo para a membrana externa. Essa impermeabilidade envolve vários fatores, incluindo o produto do gene *tolA* e as proteínas de transporte de elétrons terminais. Evidências indicam que *tolA* é um gene essencial de *P. aeruginosa*.

As cepas de *P. aeruginosa*, portadoras de bombas de efluxo, tem a capacidade de inibir o efeito do antibiótico pela eliminação da concentração da droga do meio intracelular para o meio extracelular, resultando assim, resistência a múltiplas drogas. O mecanismo de efluxo

pode estar ligado especificamente a um antibiótico ou até mesmo a uma ampla variedade de drogas, o que torna este mecanismo de resistência bacteriana um grande problema na medicina atualmente (SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015).

2.1.3 *Escherichia coli*

O pediatra Theodor Escherich lutando contra a desenteria neonatal no ano 1885, conseguiu isolar pela primeira vez a *Bacterium coli commune* das fezes de bebês. Isso tudo ocorreu no laboratório de Otto von Bollinger, na cidade de Munique. Anos depois passou a ser conhecida como *Escherichia coli*, moldando todo cenário da genética bacteriana até os dias atuais (MÉRIC *et al.*, 2016).

E. coli é uma bactéria Gram negativa, com forma bacilar, que pode realizar os dois processos de respiração, ou seja, tanto a respiração aeróbica como anaeróbica e cujo habitat natural ou habitual é o lúmem intestinal de animais de sangue quente, no qual pode estabelecer relações de simbiose, embora possa sobreviver em outros ambientes que não seja no interior de hospedeiros. *E. coli* pertencente a família Enterobacteriaceae, podendo ser móvel ou não móvel, apresentando flagelos em peritríquio, distribuídos em toda célula (CROXEN *et al.*, 2013; JORGE; CANOVA; DE CASTRO, 2014; HEBERT, 2010; MACHADO *et al.*, 2013; KUDVA *et al.*, 2015).

Nas infecções de trato urinário as bactérias Gram negativas são as mais frequentes e desse grupo se destaca a *E. coli*, que segundo Resende *et al* (2016), a *Escherichia coli* é o principal agente de infecção do trato urinário de origem comunitária, com porcentagens de isolamento oscilando entre 48,2% a 87,5%.

A espécie de *E. coli*, é considerada um dos principais agente etiológico de infecções entéricas causadas pela água e alimentos contaminados, pois a mesma é comumente encontrada em solo e água. As infecções são causadas principalmente em grupos populacionais que não usufrui de sistema de saneamento eficaz e adequado, idosos e crianças imunocomprometidos. Sendo, portanto, considerada como um patógeno que causa infecções com índices de mortalidade e morbidade significativa (SHARMA *et al.*, 2016; VASCONCELOS *et al.*, 2010).

Não obstante a isso, a *E. coli*, assim como, a *P. aeruginosa* e *S. aureus*, estão entre os principais microrganismos causadores de bacteremia em ambiente hospitalares. A sua disseminação por esse ambiente é preocupante devido ao número de morte causada (GASPAR; BUSATO; SEVERO, 2012; PAZ *et al.*, 2015).

Segundo Meng *et al* (2012) com base em alguns padrões específicos de adesão, alguns tipos de *E. coli* enteropatogênicas são referidas como *E. coli* enteroaderente. Em 1982, foi identificado pela primeira vez a *E. coli* O157:H7, como um patógeno de origem alimentar. A

natureza grave dos sintomas de colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (SHU) causada por *E. coli* O157:H7 coloca este patógeno em uma categoria diferente de outros patógenos de origem alimentar, sendo assim considerado um dos mais graves microrganismos alimentares.

Devido a grande distribuição no ambiente e o uso abusivo das drogas bacterianas, a *E. coli* tem apresentado um dos perfis de multirresistencia mais acentuados, isso porque tem a capacidade de doar e receber elementos genéticos móveis, em especial os plasmídeos (WALLMANN, 2006; KREWER *et al.*, 2012).

Narciso *et al* (2010) descreve em seu artigo que além da *E. coli* possuir um perfil acentuado de multirresistência ela também possui factores intrínsecos que facilita interação entre o hospedeiro e o agente patogénico nas infecções urinárias. Esses factores intrínsecos de virulência associados a infecções severas invasivas devido facilidade de colonização e proliferação no organismo humano.

As adesinas e fimbrias estão associadas na adesão e invasão do epitélio da bexiga pela *E. coli* uropatogénica. Estas são essenciais para o estabelecimento inicial da infecção, permitindo que a mesma chegue às vias urinárias superiores levando assim à colonização do tracto urinário. Entre as fimbrias estão as do tipo S (operação *sfa*), as do tipo P (operação *pap*), as do tipo 1 (operação *fim*), e o pílus ECP (*E. coli* Common Pilus, gene *ecpA*). Além de outras proteínas podem também estar envolvidas na virulência, como hemolisinas, factores citotóxicos ou sideróforos (WANG *et al.*, 2009; RENDÓN *et al.*, 2007).

Os mecanismos de resistencia da *E. coli* estão associados a produção de enzima β -lactamases e também a presença de bombas de efluxos. As enzimas β -lactamases de espectro extendido (BLEE) podem ser produzidas pela *E. coli* tanto cromossômicas ou extracromossômicas. Essa produção de BLEE são mediadas por plasmídeos conferindo a bactéria resistência aos β -lactâmicos. Além disso, a bactéria pode carregar genes de resistência aos aminoglicosídeos, tetraciclinas e cotrimoxazol. Os antibióticos β -lactâmicos tem sua ação na fase de síntese do peptidoglicano, sendo os mecanismos de resistência a esses antimicrobianos: 1- Inativação enzimática por β -lactamase; Mecanismos de efluxo, alteração da proteína de ligação à penicilina alvo; 4- Permeabilidade membranar diminuída (GARCÍA, 2013; ARTOLA, 2004).

2.2 Terapias com antibacterianos

A entrada de bactérias através das barreiras de protecção seja ela cutânea ou mucosa, alcançando assim os tecidos, caracteriza uma infecção bacteriana (OLIVEIRA; MUNARETTO,

2010). O organismo com frequência é capaz de remover os invasores através de resposta imune, sem a manifestação de sinais da doença (LULLMANN *et al.*, 2008)

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, as infecções causam 25% das mortes em todo o mundo e 45% nos países menos desenvolvidos. Nas palavras de Fuchs (2004), o tratamento de infecções pode ser realizado por meio de cirurgia, imunoterapia passiva e antimicrobiana. Já Oliveira & Munaretto (2010) apontam a terapia antimicrobiana como um dos grandes avanços da humanidade, mudando o curso de doenças infecciosas graves (RELIS *et al.*, 2016)

Apesar dos avanços na descoberta de novos antimicrobianos, o grande salto no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, em 1928. A atividade da penicilina era superior à das sulfas e a demonstração que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana motivou uma nova frente de pesquisas na busca de antibióticos: a prospecção em culturas de microrganismos, especialmente fungos e bactérias (CALIXTO & CAVALHEIRO, 2012)

Através de triagens feitas com produtos naturais microbianos, vários antibióticos foram descobertos entre os anos 1940-1960, na sua maioria eficazes para o tratamento de bactérias Gram positivas, alguns deles são: β -lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), peptídeos (vancomicina) e outros. Neste período apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida, trimetopim e metronidazol (GUIMARÃES, 2010)

A descoberta dos antibióticos representou e representa um grande avanço da medicina, trazendo assim a esperança e a possibilidade de curar problemas de saúde que afeta a saúde de muitos além de levarem muitas pessoas à morte. Frente a esse fato, é indiscutível a validade do potencial terapêutico dos antibióticos e a contribuição que estes trouxeram para a saúde mundial (OLIVEIRA, 2006).

2.3 Mecanismo de resistência

Com a descoberta do mais antigo até o mais recente antimicrobiano, vem crescendo gradativamente os registros de microrganismos resistentes causada principalmente, pelo uso inadequado e indiscriminado de antibióticos e quimioterápicos (ABRANTES *et al.*, 2008).

A resistência a antibióticos e outras drogas antibacterianas foi e continuará a ser um dos grandes problemas da medicina. Causada pela recombinação de genes, que cria uma variabilidade genética dando vantagens as mais aptas, sendo assim as drogas atuam como agentes seletivos dos microrganismos (LUCENA *et al.*, 2015).

Para as bactérias se tornarem resistentes ocorre mutações no seu material genético (alterações na sequência de bases do cromossomo) e conseqüentemente para a transmissão de material genético extra cromossômico de outras bactérias. A resistência é transmitida verticalmente em gerações, em seguida, a transferência de genes é realizada horizontalmente através dos plasmídeos móveis. Sendo assim, as bactérias podem adquirir resistência a um ou mais antibióticos, sem ter estado em contato com eles (BECEIRO; BOU; TOMÁS, 2013)

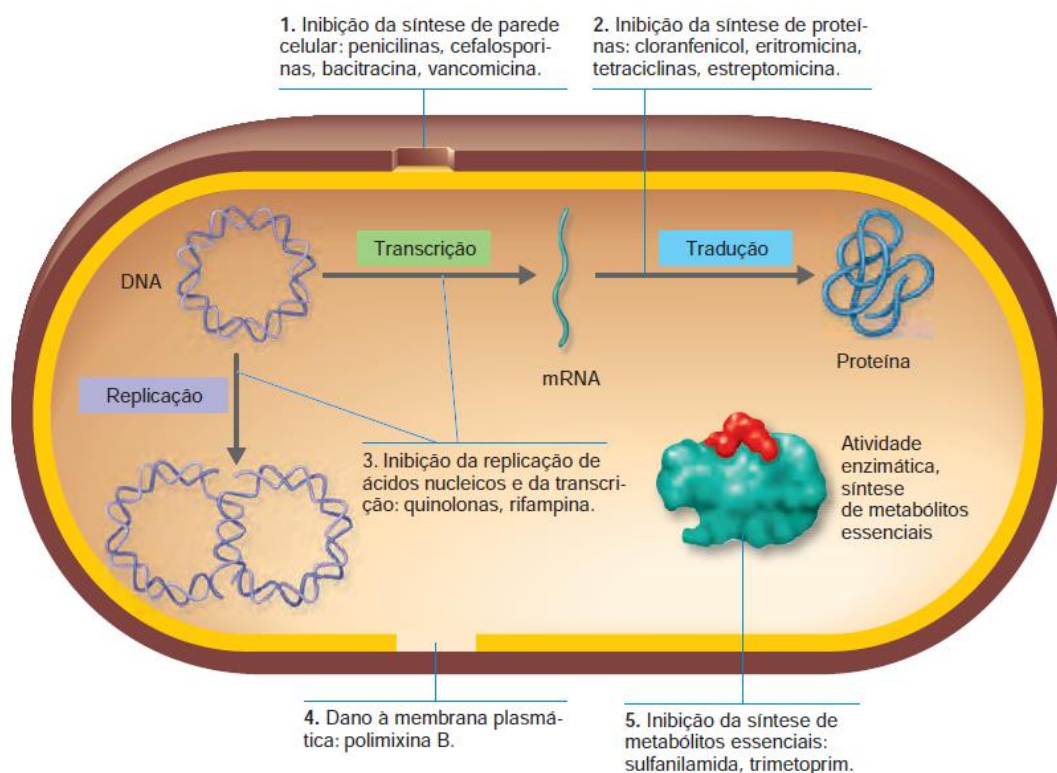
A resistência ocorre quando a bactéria adquire material genético extra (não pertencente a ela, mas de outra bactéria) através da transferência de plasmídeo, genes que permitem a interferência no mecanismo de ação do antibiótico por mutação espontânea de DNA ou por transformação (LEE *et al.*, 2013)

A disseminação gradativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) representam de fato uma grave ameaça à saúde pública mundial. Nos Estados Unidos (EUA), esses organismos estão diretamente associados à alta mortalidade e tem amplo poder de disseminação, sendo as opções terapêuticas restritas e difíceis. A gravidade das infecções se dá pela resistência aos antibióticos β -lactâmicos e também a outros antimicrobianos, como quinolonas e aminoglicosídeos. Os β -lactâmicos são utilizados como forma majoritária de combate às infecções em todo mundo. No entanto, as β -lactamases são o principal mecanismo de resistência aos antibióticos, limitando a ação dessas classe de fármaco (SOUZA *et al.*, 2016).

As bactérias naturalmente criam resistência a certos tipos de antimicrobianos, considerando assim um fato natural; por exemplo, os *Enterococcus* são naturalmente resistentes a qualquer vancomicina. Acaba sendo inevitável, pois ao se usar antibióticos, aparecerão bactérias que se tornarão resistentes a ele, pois o uso incorreto e errôneo favorece esse fato natural, porém, a utilização correta, pode causar um menor índice de resistência bacteriana (PAIM; LORENZINI, 2014).

2.3.1 Bomba de efluxo

É definido como resistência bacteriana a incapacidade de um determinado antibiótico de atingir o seu alvo em uma concentração suficiente para inibir as atividades da célula bacteriana. Essa resistência se dar das seguintes formas: 1 - alteração dos sítios de ligação, 2 - enzimas que inativam antibióticos, 3 - diminuição da permeabilidade pela membrana e 4 - bombas de efluxo dependente de energia, sendo as bombas de efluxos o alvo de vários estudos nos últimos anos (BLANCO *et al.*, 2016; TORTORA, 2012; TAFUR; TORRES; VILLEGAS, 2008).

Figura 1: Mecanismos de resistência bacteriano**Fonte:** Tortora., 2012

As bombas de efluxos são proteínas de transporte que fazem a retirada de produtos indesejados pela célula para o meio externo, e dentre esses produtos indesejados ou tóxicos estão os antibióticos. Algumas bombas podem ser específicas para um composto ou antibiótico, outras, no entanto, podem transportar vários tipos de antibióticos estando assim associadas à resistência a múltiplas drogas (MDR). A resistência bacteriana se dá pelo uso incorreto ou indiscriminado dos antibióticos causando seleção de cepas resistentes (BAMBEKE; BALZI; TULKENS, 2000; PIDDOCK, 2006).

Inicialmente o mecanismo de bombas de efluxos foram observadas em *E. coli*, que promovia a essa espécie de bactéria resistência a tetraciclina. Hoje existem cinco principais famílias descritas nos procariontes: ABC (cassete de ligação de ATP), MATE (multidrogas e efluxo tóxico), RND (resistência-nodulação-divisão), SMR (pequena resistência a várias drogas) e MF (facilitador principal) (WEBBER & PIDDOCK, 2003; POOPLE, 2007).

As bombas de efluxo facilitam a sobrevivência e colonização das bactérias em ambientes hostis, além de ser um mecanismo de resistência. A família SMR tem Smr/QacC e EmrE, identificadas nas bactérias *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Um exemplo de bombas da família MF são NorA e TecK que foram identificadas na bactéria *S. aureus*, RND tem a AcrB uma dos exemplos encontrada em *E. coli*, MATE contém NorM encontrada na *Neisseria*

meningitidis e a família ABC contêm MacB e MsbA, ambas identificadas na *E. coli* (BORGES-WALMSLEY; MCKEEGAN; WALMSLEY, 2003).

A bactéria *S. aureus* tem recebido grande destaque na pesquisa com produtos naturais atuante como inibidores de bomba de efluxo. É uma bactéria Gram positiva que faz parte da flora microbiana normal dos seres humanos, e também é responsável por uma série de infecções desde uma pneumonia até mesmo algo mais grave como a sepse. Sua linhagem apresenta vários tipos de bombas, como por exemplo, NorA, MepA e TetK (MUNIZ *et al.*, 2020; FIGUEREDO *et al.*, 2019; OLIVEIRA-TINTINO *et al.*, 2020).

2.4 Plantas medicinais

Plantas medicinais são todo e qualquer vegetal que contenha substâncias que possam ser utilizadas para fins terapêuticos ou que possa ser usado na produção de fármacos semissintéticos, onde a substância ativa provocara cura ou abrandamento da doença (SILVA *et al.*, 2015). Historicamente o uso de plantas medicinais faz parte da humanidade e têm sido objeto de estudo para o homem, sua utilização é datada desde 500 a.c relatada em um texto chinês que indica doses terapêuticas e tratamento de doenças. O manuscrito egípcio foi encontrado com 811 prescrições e 700 drogas e algumas dessas plantas ainda são utilizadas atualmente, inclusive como fontes para indústria farmacêutica, cosméticas, tecidos e matéria prima (DUARTE, 2006; SILVA & CARVALHO, 2004)

A maior parte do comércio de plantas medicinais é feita em lojas de produtos naturais, onde a demanda por fontes naturais tem crescido tanto nos países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos, no qual vendedores desses produtos prometem uma vida longa e saudável se apoiando no argumento de que as plantas são seguras para a população. Isso fortalece a crença da população de cura através das plantas para males como depressão, impotência e a obesidade. O grande problema é que por ser usadas a milênios eles acreditavam que elas não poderiam trazer nenhum malefício, e sim apenas benefícios e curas. (VEIGA *et al.*, 2005)

Existe também no Brasil um grande número de pesquisadores que contribui significativamente para o desenvolvimento de fitoterápicos e outras áreas relacionadas, no entanto, faz-se necessário educar essa população ao uso racional de produtos naturais tais como: coleta, manipulação e principalmente alternativas terapêuticas com o propósito de saber relacionar o conhecimento científico e popular afim de se avaliar os riscos e os benefícios para saúde (GONÇALVES, 2014)

Muitos estudos demonstraram que extratos e óleos essenciais de plantas podem modificar a atividade de antimicrobianos e assim melhorar seu desempenho diminuindo a

concentração necessária para que haja inibição do crescimento. Fato constatado com o estudo das plantas *Turner aulmifolia*, *Momordica charantia*, *Mentha arvensis*, *Cordia verbenaceae*. A capacidade dos produtos naturais em modificar a ação de antimicrobianos pode ser vista a partir de estudos que demonstram que a associação de drogas sintéticas e extratos de plantas podem atuar revertendo a resistência microbiana, eliminando plasmídios e inibindo a bomba de fluxo (COUTINHO *et al.*, 2009; COUTINHO *et al.*, 2010;)

A utilização de produtos naturais é uma fonte terapêutica muito útil devido à sua eficácia, acessibilidade e o baixo custo operacional aliado à compatibilidade cultural, porém pela falta de conhecimento da população esse uso desenfreado pode acarretar sérios problemas, por muitas dessas plantas apresentarem características toxicológicas onde algumas podem levar inclusive a óbito (FIGUEREDO *et al.*, 2013)

As plantas medicinais são consideradas úteis no uso para cura de inúmeras doenças incluindo doenças bacterianas, sendo as plantas medicinais uma fonte rica de princípios com atividades antimicrobianas (BEZERRA *et al.*, 2013).

2.5 *Ocotea odorífera*

2.5.1 Características Botânicas

Nativo do Brasil e encontrada na mata atlântica, *Ocotea odorífera* pertence à família *Lauraceae*, o maior gênero contendo um número aproximado de 350 espécies das quais 160 encontra-se no Brasil entre as regiões do Rio Grande do Sul até o Sul da Bahia. É vulgarmente conhecida como: sassafrã, canela de sassafrã, sassafrãs do Brasil e sassafrás (YAMAGUCHI *et al.*, 2011; CARMO *et al.*, 2007; PIERUZZI *et al.*, 2011).

A sua descrição botânica é: Contêm um tronco tortuoso, geralmente curto, pode chegar a 25 metros de altura quando adulta, com quinas irregulares e pronunciadas. Sua ramificação é irregular, ascendente; a copa é globosa, provida de folhagem densa. A Casca tem espessura de até 12 mm. A superfície da casca externa é castanho-acinzentada a castanho-pardacenta, rígida, com cicatrizes típicas provenientes da descamação. A casca interna é bege a salmão, com forte odor característico (IVANCHECHEN, 1988; CARVALHO *et al.*, 2000; RODRIGUES, 2001; FILHO & NOGUEIRA, 2005).

As folhas são simples, inteiras, oblongo-lanceoladas, com 5 a 15 cm de comprimento, por 1,5 a 5 cm de largura; quando esmagadas, apresentam cheiro inconfundível. Suas flores são hermafroditas, alvas ou amarelas, muito perfumadas. As flores acham-se reunidas em inflorescências glabras, paniculadas, na ponta dos ramos, com até 5 cm de comprimento e

contendo até nove flores. O fruto é elíptico, quase liso, castanho, de até 2,5 cm de comprimento por 1,2 cm de diâmetro, envolvido pela cúpula robusta, carnosa, verruculosa e hemisférica até cerca de metade de sua altura (VATTIMO, 1956).

Sua classificação taxonômica é a seguinte: Reino: *Plantae*, Ordem: *Magnoliales*, Família: *Lauraceae*, Gênero: *Ocotea*, Espécie: *Ocotea odorífera*. Pode ser conhecida pelas diferentes regiões do Brasil com os seguintes nomes: Minas Gerais: canela, canela-sassafrás, sassafrás e sassafrasinho; Estado do Rio de Janeiro: casca-preciosa; Estado de São Paulo: canela-funcho, canela-sassafrás-folha-grande, casca-preciosa, sassafrasinho, louro-sassafrás, louro-tapinhoã, sassafrás-amarelo, sassafrás-preto, sassafrás-rajado; Bahia: pau-funcho; sassafrás, na Bahia; Rio Grande do Sul e em Santa Catarina; sassafrás-do-paraná(GONTILO *et al.*, 2017; CARVALHO, 1994; SANTOS, 1987).

Figura 2: Ramos terminais da planta *Ocotea odorífera*



Fonte: Amaral, W.

2.5.2 Metabolitos Secundários

A utilização de extratos vegetais ou óleos essenciais para fins medicinais é uma das práticas mais antigas da humanidade. Favorecida pela atividade metabólica secundária a busca pelos vegetais superiores que tem capacidade de produzir substâncias antibióticas aumentaram, utilizadas como mecanismo de defesa contra diversos tipos de microrganismos (FERREIRA *et*

al., 2014).

São muitos os compostos biologicamente ativos que contem nos constituintes químicos que podem ser extraídos a partir de caule, folhas, cascas, incluindo raízes. O constituinte majoritário da planta é o safrol tanto do óleo de folhas como de caule. O safrol é uma substância éter aromática que é muito utilizado na produção de perfume como fixador, além de usar em bebidas e alimentos (OLTRAMARI *et al.*, 2004; ORELLANA & KOEHLER, 2008).

Segundo Rogatto *et al* (2014) na constituição química da *O. odorífera* também pode ser encontrado flavonoides, como canferol e quercetina, polipropanoides e sesquiterpenos. O sassafrás tem como os principais componentes químicos do óleo essencial de folhas são: safrol (47), γ - elemeno (6%), espatulenol (1,5%), cânfora (18), p-cimeno (1,8%), entre outros (OBRZUT & CARVALHO, 2011).

Plantas pertencentes ao mesmo gênero como *Ocotea bicolor* apresenta em sua fitoquímica a presença de: α -corocalene, α -calacorene, Spathulenol, Viridiflorol, Thujopsan-2- α -ol, Globulol, Epi-cedrol, Isolongifolan-7- α -ol, Cis-cadin-4-en-7-o, Epi- α -muurolol, α -cadinol, Epi- β -Bisabolol e Z- γ -Atlantone, α -cubebene, α -Ylangene, β -bourbonene, β -elemene, E-caryophyllene, β -copaene, Trans-muurola-3,5-diene, α -humulene, Allo-aromadendrene, Dauca-5,8-diene, Germacrene D, α -cubenene, Bicyclogermacrene, α -murolene, E,E- α -farnesene e β -sesquiphelland. (DAMASCENO *et al.*, 2017).

2.5.3 Atividade biológica do óleo essencial de *Ocotea odorífera*

Os compostos presentes no óleo essencial da planta *O. odorífera* contêm atividade inseticida e pode ser utilizado no controle de pequenas pragas (MOSSI *et al.*, 2014). Dentre esses componentes o safrol recebe um grande destaque por ser bastante comercialização no mundo sendo utilizado no preparo de medicamentos com propriedades sudoríficas, antirreumáticas, antissifilíticas, diuréticas e como repelente de mosquitos (ROGATTO *et al.*, 2014).

Grandes variedades de atividades farmacológicas e aplicações medicinais são conhecidas a partir de várias partes da planta. Relatos na literatura têm exibido grande diversidade de funções biológicas a partir de um grupo de compostos presentes na planta. Apesar da exata composição do óleo da planta ser ainda indeterminada, na literatura, têm sido descritas como usada para tratar dermatose, sífilis e malária (YAMAGUCH *et al.*, 2011).

Alcoba *et al* (2018), mencionou nos resultados de seu artigo ao trabalhar com promastigotas do parasita *Leishmania* que o óleo essencial da *O. odorífera* tem atividade antileishmanial, e não somente ela mais outra planta pertencente a mesma família chamada de

Ocotea dispersa também apresentou atividade contra o protozoário.

O óleo do sassafrás apresenta também atividade antifúngica contra as espécies de *C. albicans* e *C. tropicalis* de acordo com os resultados obtidos por Castro e Lima (2011). Testado a bioatividade do óleo essencial de sassafrás e de eucalipto em larvas de cascudinho, Pinto *et al* (2010) observou uma atividade mais acentuada de mortalidade das larvas jovens e adultas do que o eucalipto, mostrando então que a planta apresenta uma boa atividade larvicida.

2.6 Metabólitos secundários

2.6.1 Óleo essencial

Os óleos essenciais podem apresentar diversas atividades biológicas devido aos seus compostos químicos naturais como: propriedades anticancerígenas, antinociceptivas, antivirais, antiflogísticas, antioxidantes e antimicrobianas. No óleo essencial (OE) de orégano foi detectado a presença de fenóis, considerados os responsáveis pela atividade antimicrobiana e antioxidante (KABOUCHE *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2019).

De acordo com Lafhal *et al* (2019) a composição química de um OE depende de uma série de fatores e alguns deles são: espécie, origem, cultivar, época de colheita, método de extração e natureza do material vegetal. São uma mistura de compostos voláteis e nas plantas, os OE são produzidos para atuarem como defesas constitutivas contra estresses bióticos e abióticos, sendo as propriedades biológicas dos OEs consequência da sua produção e finalidade. Há uma vasta literatura que demonstra a atividade de OEs *in vitro* de anticâncer, antiviral, antiflogístico e antimicrobiano. Esse amplo espectro de atividades biológicas é geralmente acompanhado por biodegradabilidade e toxicidade reduzida (POMA *et al.*, 2018; BAKKALI *et al.*, 2008; DUDAREVA *et al.*, 2006).

Segundo Graziano *et al* (2016) o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* obteve atividade contra as cepas de *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* semelhantemente ao da clorexidina, mostrando, portanto, que o uso do OE pode ser uma alternativa promissora contra os microrganismos. Veras *et al* (2019) usando óleo da planta *Hymenaea cangaceira* mostrou que o OE é um potente antioxidante, com presença de atividade antimicrobiana e analgésico. Além dessas características o OE apresentou ausência de toxicidade nos testes realizados tornando-o um candidato a fitoterapia.

2.6.2 Terpenos

Os terpenos são desde muito cedo utilizados na medicina, culinária e perfumária, além das indústrias de outros ramos de produção, fato esse, que causou a extinção de algumas espécie

de plantas e colocou outras a lista de “prestes a serem extintas”. Devido a sua grande utilização o químico Otto Wallach, dedicou-se a estudar e em 1910, ganhou o prêmio Nobel por ter conseguido identificar e separar os terpenos (ORMEÑO; FERNÁNDEZ, 2012).

Na sua grande maioria os óleos essenciais são constituídos por terpenos e seus derivados. São considerados metabólitos secundários que geralmente são produzidos nas plantas para evitar algumas ações promovidas pelo meio externo. A produção dos terpenos não é limitada apenas no reino das plantas, mas também, são produzidos por animais, bactérias e fungos (CORREIA *et al.*, 2008; DVORA; KOFFAS, 2013).

De acordo com Mc Murry (2011), os terpenos são considerados quimicamente como “alcenos naturais”, pois contêm em sua estrutura química uma ligação dupla carbono-carbono, sendo assim considerado como um hidrocarboneto. Os terpenos apresetam funções variadas com a presença de grupos funcionais diferentes, e isso podemos ver quando o terpeno apresenta na estrutura molécula um oxigênio (terpenoide) que proporciona a essa molécula as seguintes funções: ácidos, aldeídos, álcoois, éteres, fenóis e cetona (FELIPE; BICAS., 2016).

Para a produção dos terpenos a natureza possui um esqueleto carbônico que é formado pela junção de unidades isoprenóides básicas, o pirofosfato de isopentenila (IPP) e o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP). Existe duas rotas de biossíntese para a formação desses blocos de intermediários gerados na glicólise, e são elas: 1- essa rota se inicia com a Acetil-coenzima A (conhecido como rota do mevalonato); 2- essa outra rota utiliza o ácido pirúvico como material de partida (NOVAES, 2019).

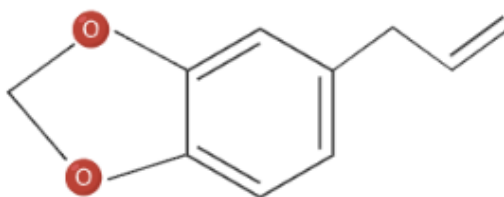
A quantidade de carbonos presentes nas estruturas químicas dos terpenos vão subdividi-los em classes e cada classe recebe uma denominação dependendo da quantidade de carbono, e são comumente nomeados da seguinte forma: 1- hemiterpenos (C₅); 2- monoterpenos (C₁₀); 3- sesquiterpenos (C₁₅); 4- diterpenos (C₂₀); 5- sesterterpenos (C₂₅); 6- triterpenos (C₃₀); 7- tetraterpenos (C₄₀) (NOVAES, 2019; ORMEÑO; FERNÁNDEZ, 2012).

A diversidade de estrutura dos terpenos o coloca como uma das maiores e mais diversas classes de metabólitos secundários, com dezenas de milhares de estruturas relatadas. Essa grande diversidade de estrutura dos terpenos garante a eles varias bioatividades como, por exemplo, ação antibacteriana e antifungicas. As propriedades bioativas dos terpenos o coloca como uma fonte alternativas para o controle de resistência a diversos tipos de drogas e no auxilio de combate a enfermidades (FREITAS *et al.*, 2020; ARAÚJO *et al.*, 2020; GONÇALVES, 2017).

2.6.3 Safrol

O safrol é um éter fenólico de líquido incolor, um composto orgânico de fórmula $C_{10}H_{10}O_2$, levemente oleoso, de densidade 1,096 g/ml (a 20°C) e ponto de fusão em torno de 11°C. O safrol é um terpeno considerado como um dos principais componentes presentes em óleos essenciais de *Ocotea sp*, encontrado no sul do Brasil (BARREIRO; FRAGA, 1999; MAAR; ROSENBROCK, 2012).

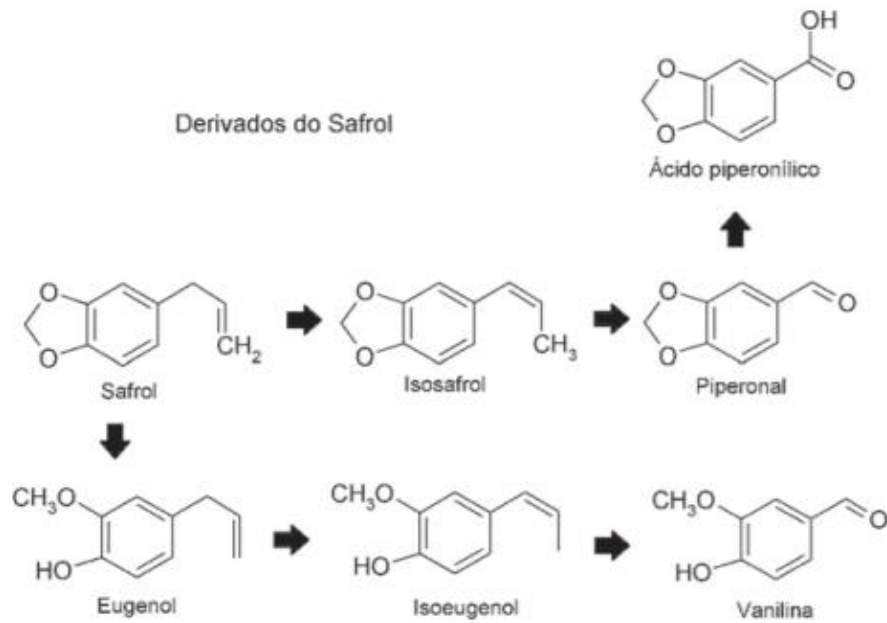
Figura 3: Molécula de safrol



Fonte: Produzida pelo autor

O safrol e seus derivados como eugenol e isoeugenol apresentam atividades biológicas comprovadas. Almeida *et al* (2020) mostrou atividade antimicrobiana do safrol de forma direta e também associado com antibiótico, além de mostrar que uma de suas atuações para efeito antibacteriano é na inibição da bomba de efluxo. Já Rodrigues-Chaves *et al* (2018) demonstrou que o safrol contém atividade anti-Leishmania.

Os derivados de safrol são bastante utilizados para produção de medicamentos, para testes clínicos e em perfumária como fixador. Obtenção dos derivados de safrol de interesse comercial são relativamente simples de um ponto de vista químico. Essas possibilidades de síntese a partir do safrol e outras biomoléculas tem se aplicado consideravelmente na busca de novos compostos biologicamente ativos, consistindo assim, em um processo de amplo espectro na indústria de fármacos. Os derivados de safrol (eugenol e piperonal) servem como ponto de partida de drogas ilícitas do grupo das anfetaminas (COSTA, 2000; BARREIRO; FRAGA, 1999; MAAR; ROSENBROCK, 2012).

Figura 4: Transformação química do safrol

Fonte: Maar & Rosenbrock, 2012

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, P. M. et al. A qualidade da prescrição de antimicrobianos em ambulatórios públicos da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, MG. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 711-720, 2008.
- ALBUQUERQUE U. P.; HANAZAKI N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALCOBA, A. E. T. et al. Chemical composition and in vitro antileishmanial and cytotoxic activities of the essential oils of *Ocotea dispersa* (Nees) Mez and *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer (Lauraceae). **Natural Product Research**, v. 32, n. 23, p. 2865-2868, 2018.
- ALEMÁN, M. G. Resistencia antimicrobiana, una amenaza mundial. **Revista Cubana de Pediatría**. v. 85, p. 414-417, 2013.
- ALMEIDA, M. S. C. et al. *Staphylococcus aureus*. **Mostra Científica em Biomedicina**, V. 1, N. 1, 2016.
- 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.
- ALÓS, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 33, n. 10, p. 692-699, 2015.
- ARANTES, T. et al. Avaliação da colonização e perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* em amostras de secreção nasal de profissionais de enfermagem. *Rev Bras Farm* 2013 Fev; 94(1): 30-34.
- 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, 111023, 2020.
- ARAÚJO, A.C.J. et al. Caracterização por GC-MS-FID e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Mikania cordifolia* e limoneno contra cepas MDR. **Food and Chemical Toxicology**, v.136, 111023, 2020. doi: 10.1016 / j.fct.2019.111023
- ARTOLA, B. S. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Curso sepsis grave: capítulo 6. **Revista Electrónica de Medicina Intensiva**, 2004; 4 (8), Artículo nº C 6.
- BAHMANI, M.; SCHMIDT, O. Plant essential oils for environment-friendly protection of wood objects against fungi. **Maderas. Ciencia y tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 325 - 332, 2018.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—A review. **Food Chem. Toxicol**, v. 46, p.446–475, 2008.
- BAMBEKE, F.V.; BALZI, E.; TULKENS, P.M. Antibiotic efflux pumps. **Biochemical pharmacology**, v. 60, p. 457-470, 2000.
- BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico:

antiinflamatório, analgésicos e anti-trombótico. **Química nova**, v. 22, n. 5, 1999.

BECEIRO, A; TOMÁS, M; BOU, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 185–230, 2013.

BERNARD, L. et al. Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant *S. aureus* strains. **JMicrobiolMeth**, v. 57, p. 231-9, 2004.

BEZERRA, L. M. D. et al. Atividade Antibacteriana In Vitro de Fitoconstituintes Sobre Micorganismos do Biofilme Dentário. **Rev. Brasileira de Ciências da Saúde**, v.17, p. 79-84, 2013.

BLANCO, P. et al. Bacterial multidrug efflux pumps: Much more than antibiotic resistance determinants. **Microorganisms**, v. 4, n.14, p. 1-19, 2016. doi:10.3390/microorganisms4010014

BORGES-WALMSLEY, M.I.; MCKEEGAN, K.S.; WALMSLEY, A.R. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. **Biochemical Journal**, v.376, p. 313-338, 2003.

BRAUNWALD, E. et al. Harrison Medicina Interna. 15. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana do Brasil, 2002.

BRITO, M.A.V.P., CAMPOS, G.M.M., BRITO., J.R.F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positiva isolados de mastite bovina. **Ciências rural**, v. 32, n.1, 79-82, 2002.

CALIXTO, C. M. F; CAVALHEIRO, E. T. G. Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico no Desenvolvimento Científico. **Química e sociedade**, v. 34, p. 118-123, 2012.

CARMO, F. M. S. et al. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta bot. Bras.** v. 21, n. 3, p. 697-705, 2007.

CARVALHO, D. A. et al. Florística e estrutura da vegetação arbórea de um fragmento de floresta semidecidual às margens do Reservatório da Usina Hidrelétrica Dona Rita (Itambé do Mato Dentro, MG). **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 37-55, 2000.

CARVALHO, P. E. R. Espécies Florestais Brasileiras : recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: Embrapa. p. 640, 1994.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 13, n. 2, p. 203-208, 2011.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute**. CLSI Document M100-S16CLSI, Wayne, PA, [s.l.], v. 32, n 1, p. 1-184, 2015.

CORREIA, S. J. et al. Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das Folhas de *Tapirira guianensis*. **Química Nova**. v. 31, n° 8, p. 2056-2059, 2008.

COSTA, A. L. P; JUNIOR. A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e saúde pública:

- uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45 – 57, 2017.
- COSTA, P.R.R. Safrol e eugenol: Estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química nova**, v. 23, n. 3, p. 357-369, 2000.
- 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, p. 328–330, 2008. doi: 10.1159 / 000151267.
- COUTINHO, H. D. M. et al. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: Potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMC Complement and Altern.Med**, v.9, p.13, 2009.
- COUTINHO, H. D. M. et al. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**, v. 33, p. 467–471, 2010.
- CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, 26, n. 4, p. 822-880, 2013.
- DAMASCENO, C. S. B. et al. Chemical composition, antioxidant and biological activity of *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil (LAURACEAE) essential oil. **Braz. J. Pharm. Sci**, v. 53, n. 4, 2017.
- DUDAREVA, N. et al. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. **Crit. Rev. Plant Sci**, v. 25, p. 417–440, 2006.
- DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Rev. MultiCiência**. v. 7, p. 1-16, 2006.
- DUARTE, F. C. et al. Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: Uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. **Revista de epidemiologia e controle de infecção**. v. 8, n. 3, 2018.
- DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Rev. MultiCiência**. v. 7, p. 1-16, 2006.
- DVORA, H., KOFFAS, M.A.G. In: McNeil, B.; Archer, D.; Giavasis, I.; Harvey, L.. (ed). 1º Ed. Microbial production of flavonoids and terpenoids. **Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals**, 2013. Chap. 10, p. 234-261.
- FELIPE, L.O., BICAS, J.L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química nova escola**, v.39, n. 2, p. 120-130, 2017.
- FERRASSO, M.M. et al. *Staphylococcus hyicus*. **Arq. Inst. Biol**, v. 82, p. 1-6, 2015.
- FERREIRA, H.; LALA, E. R. P. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Rev Panam Infectol**, v. 12, p. 44-50, 2010.
- FERREIRA, S. B. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel). **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 16, n. 2, p. 225-230, 2014.

FIGUEREDO, F. G. et al. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, v. 1, p. 1-5, 2013.

FIGUEREDO, F.G. et al. Effect of hydroxyamines derived from lapachol and norlachol against *Staphylococcus aureus* strains carrying the NorA efflux pump, *Infection*, **Genetics and Evolution** (2019). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104370>

FILHO, R. C; NOGUEIRA, A. C. Influência da temperatura na germinação de diásporos de *Ocotea odorífera* (Vellozo) Rohwer (Canela-sassafrás). **Ciências florestal**, v. 15, n. 2, p. 191-198, 2005.

FREITAS, P.R. et al. GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. and α -pinene. **Industrial crops and products**, v. 145, 112106, 2020.

FREITAS, P.R. et al. GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. And α -pinene. *Industrial. Crops & Products*, v. 145, 112106, 2020. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112106

FUENTEFRÍA, D.B. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 41, n. 5, p. 470-473, 2008.

GARCÍA, M.C.M. *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. Resistencia. **Sanid Mil**, v. 69, n. 4, p. 244-248, 2013.

GASPAR, M.D.R., BUSATO, C.R., SEVERO, E. Prevalência de infecções hospitalares em um hospital geral de alta complexidade no município de Ponta Grossa. **Acta Scientiarum**, v. 34, n. 1, p. 23-29, 2012.

GONÇALVES, I.L.F. Efeito sinérgico e antibiofilme de terpenos associados a antifúngicos convencionais sobre cepas de *Candida glabrata*. Universidade Federal do Pernambuco, **dissertação de mestrado em Patologia**, 2017.

GONÇALVES, C. L. Bacteriostasia, citotoxicidade, atividade antioxidante e sinergismo com antibacterianos comerciais de plantas bioativas com indicativo medicinal. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, f. 91, 2014.

GONTILO, D. C. et al. Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorífera* aqueous extract leaves. **Food Chemistry**, p. 618-626, 2017.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GRAZIANO, T.S. et al. In vitro effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on growth and production of volatil e sulphurcompounds by oral bacteria. **J Appl Oral Sci**, v. 24, n.6, p. 582-589, 2016.

HARAGUCHI, L. M. M.; CARVALHO, O. B. Plantas Medicinais. Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente. Divisão Técnica Escola Municipal de Jardinagem, São Paulo, SP,

2010.

HEBERT, F. C. Formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica. Dissertação de mestrado. USP. **Online na biblioteca digital** com o link: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-17082010-122633/pt-br.php> ou DOI: 10.11606/D.87.2010.tde-17082010-122633.

HOEFEL, H. H. K; LAUTERT, L. Administração endovenosa de antibióticos e resistência bacteriana: responsabilidade da enfermagem. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 08, n. 03, p. 441- 449, 2006.

IVANCHECHEN, S. L. Estudo morfológico e terminológico do tronco e casca de 30 espécies arbóreas em floresta ombrófila mista. 1988. 221 f. Tese (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

JAVADPOUR, M. M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

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

KABOUCHE, Z. et al. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. **Int. J. Aromather**, v.15, p.129-133, 2005

KONG, Y. et al. High Throughput Sequencing Identifies MicroRNAs Mediating α -Synuclein Toxicity by Targeting Neuroactive-Ligand Receptor Interaction Pathway in Early Stage of Drosophila Parkinson's Disease Model. **Plos one**, v. 10, 2015.

KREWER, C.C. et al. Suscetibilidade a desinfetantes e perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli*. **Pesq. Vet. Bras**, v. 32, n. 11, p. 1116-1120, 2012.

KUDVA, I. T. et al. The *Escherichia coli* O157:H7 cattle immuno-proteome includes outer membrane protein A (OmpA), a modulator of adherence to bovine recto-anal junction squamous epithelial (RSE) **Cells. Proteomics**, v. 15, p. 1829–1842, 2015.

LAFHAL, S. et al. Chiroptical fingerprints to characterize lavender and lavandin essential oils. **Journal of Chromatography A**, 2019.

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

LEE, C. R. et al. Strategies to Minimize Antibiotic Resistance, **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 10, p. 4274-4305, 2013.

LIMA, C. C. et al. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **Cuidarte enfermagem**, v. 11, n. 1, p. 105 – 113, 2017.

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.

LIMAVERDE, P.W. et al. Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and α - terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. **Food**

and Chemical Toxicology, 2017, doi: 10.1016/j.fct.2017.02.031.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução, **Rev. Port. Saúde pública**, v. 34, p. 77-84, 2016.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–532, 1998.

LUCENA, B.F.F. et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DE AMINOGLICOSÍDEOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Acta biologica colombiana**, v. 20, n. 1, p. 39-45, 2015.

LULLMANN, H. et al. Farmacologia texto e atlas. 5. ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 416, 2008.

LUTZ, L. et al. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 7, n. 3, p. 224-8, 2006.

MAAR, J.H., ROSENBROCK, L.C.C. A química fina que poderia ter sido: a extração do óleo sassafrás e de safrol no alto e médio vale de Itajaí. **Scientiae studia**, v. 10, n. 4, p. 799-820, 2012.

MACHADO, L. S. et al. Pcr na detecção de gene *fel a* de *Escherichia coli* em frangos de corte condenados por aerossaculite pela inspeção sanitária federal. **Arq. Inst. Biol**, v.80, p.145-149, 2013.

MARTINS, C. M. et al. Constituintes químicos e avaliação das atividades antimicrobianas e citotóxicas de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. Óleos essenciais. **Medicina Complementar e Alternativa Baseada em Evidências**, vol. 2015, n. 1, pp. 842047.

McMURRY, J. Química orgânica. 7ª edição Norte-Americana, 2011.

MENG, J. et al. Microbiologia alimentar: fundamentos e fronteiras. 4º edição, 2012. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch12>

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

MIRANDA, J.A.L. et al. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Rev. Bras. Pl. Med.** v.17, p.1142-1149, 2015.

MORAES, G.M. et al. Infection or colonization with resistant microorganisms: identification of predictors. **Acta Paul de Enfermagem**, v. 26, n. 2, p. 185-191, 2013.

MOSSI, A. J. et al. Essential oil of *Ocotea odorifera*: An alternative against *Sitophilus zeamais*. **Renewable Agriculture and Food Systems**, p. 1-6, 2014.

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multiresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MUNIZ, D.F. et al. *In vitro* and *in silico* inhibitory effects of synthetic and natural eugenol derivatives against the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*, **Food Chemistry** (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127776>

MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 8th. ed. Washington; D.C.; USA: American Society for Microbiology, 2003. v. 1.

MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., PFALLER, M.A. Microbiologia médica. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

NARCIAO, A. et al. *Escherichia coli* uropatogénica: resistência aos antibióticos versus factores de virulência. **Acta Urol**, v. 27, n. 2, p. 11-20, 2010.

NEVES, P.R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

NOVAES, L.F.T. Síntese total de terpenos e monoterpenos: actinoranona, pleocarpanona e sesquiterpenos *ILLICIUM*. Universidade Estadual de Campinas, **tese de doutorado apresentado ao Intituto de Química**, 2019.

OBRZUT, V. V.; CARVALHO, R. I. N. Utilização do óleo essencial de sassafrás para o manejo da mariposa oriental em pessegueiro. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient**, v. 9, n.1, p. 65-71, 2011.

OLIVEIRA, A. L. Resistência bacteriana a antibióticos: uma análise da conduta hospitalar. **Rev. CESUMAR**, v. 11, p. 59-69, 2006.

OLIVEIRA, C. G. et al. Perfil de resistência e incidência de *Klebsiella pneumoniae* em um hospital público de ensino. **Revista UNINGÁ review**, v. 25, n. 3, p. 36-40, 2016.

OLIVEIRA, K. R; MUNARETTO, P. USO RACIONAL DE ANTIBIÓTICOS: Responsabilidade de Prescritores, Usuários e Dispensadores. **Revista contexto & saúde**, v. 9, p. 43-51, 2010.

OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M. et al. Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. **Food Chemistry**, p. 72-77, 2018.

OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M. et al. Do 1,8-naphthyridine sulfonamides possess an inhibitory action against Tet (K) and MsrA efflux pumps in multiresistant *Staphylococcus aureus* strains?. **Microbial pathogenesis**, v. 147, 104268, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104268>

OLTRAMARI, A. C. et al. Safrole analysis by GC-MS of prototrophic (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) cell cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p. 1-5, 2004.

ORELLANA, E.; KOEHLER, A. B. RELAÇÕES MORFOMÉTRICAS DE *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient**, v. 6, n. 2, p. 229-237, 2008.

ORMEÑO, E., FERNÁNDEZ, C. Los terpenos de las plantas. **Investigación y ciencia**, n. 428, p. 62-69, 2012.

OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Curr opin microbiol**, 32-37, 2014. doi:10.1016/j.mib.2013.11.004.

PAIM, R. S. P; LORENZIN, E. Estratégias para prevenção da resistência bacteriana: contribuições para a segurança do paciente. **Rev CUIDARTE**, v.5, p.757-64, 2014.

PAZ, M.C.F., FORTES, D.I.F.M., SILVA, D.H.G. Análise da infecção hospitalar em um hospital universitário na Paraíba no período de 2012 a 2014. **Revista Saúde e Ciência**, v. 5, n. 3, p. 31-43, 2015.

PFALLER, M. A et al. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 32, n. 2, p. 156-67, 2001.

PIDDOCK, L.J.V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bactéria. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 382-402, 2006. doi:10.1128/CMR.19.2.382-402.2006

PIDDOCK, L.J.V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bactéria. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 382-402, 2006. doi:10.1128/CMR.19.2.382-402.2006

PIERUZZI, F. P. et al. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). **Annals of Botany**, v. 108, p. 337-345, 2011.

POMA, P. et al. Chemical composition, in vitro antitumor and pro-oxidant activities of *Glandora rosmarinifolia* (Boraginaceae) essential oil. **PLoS ONE**, v.13, 2013.

POOPLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of medicine**, v. 39, p. 162-176, 2007. DOI: 10.1080/07853890701195262

RAO, M. et al. Antimicrobial Compounds of Plant Origin as Efflux Pump Inhibitors: New Avenues for Controlling Multidrug Resistant Pathogens. **Journal of Antimicrobial Agents, [S. l.]**, v. 04, n. 01, p. 1-6, 2018. DOI: 10.4172/2472-1212.1000159

RATTI, R.P., SOUSA, C.P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2009; 30(2): 1-8.

RELIS, E. P. et al. Uso de antimicrobianos en el servicio de medicina. Hospital General Docente "Dr. Enrique Cabrera". 2016. **Revista Habanera de Ciencias Médicas**, v. 15, p. 363-376, 2016.

RENDÓN, MA. et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104, n. 25, p. 10637-10642, 2007.

RESENDE, J.A. et al. Infecções do trato urinário de origem hospitalar e comunitária: uma revisão dos principais micro-organismos causadores e perfil de susceptibilidade. **Revista científica Fagoc**, v. 1, p. 55-62, 2016.

RODRIGUEZ-CHAVES, D., et al. Actividad in vitro anti-Leishmania (Trypanosomatidae) del epóxido trans-Z- α -bisaboleno y del Safrol, en frutos de *Piper auritum* (Piperaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 66, n. 2, p. 826-835, 2018.

RODRIGUES, L. A. Estudo florístico e estrutural da comunidade arbustiva e arbórea de uma Floresta em Luminárias, MG, e informações etnobotânicas da população local. 2001. 184 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

- ROGATTO, J. M. et al. Caracterização do potencial antimicrobiano de ocotea odorifera (vellozo) rohwer. **Revista da Universidade do Vale do Rio Verde**, v. 12, n. 1, p. 886-894, 2014.
- ROSANOVA, M. T. *et al.* Epidemiological features and risk factors for mortality in Pseudomonas aeruginosa bacteremia in children. **Arch Argent Pediatr**, 117, n. 2, p. 128-131, 2019
- SANTOS, E. Nossas madeiras. Belo Horizonte: Itatiaia, p. 313, 1987.
- SANTOS, A.L. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Bras. Patol. Med. Lab**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- SANTOS, I. D. A. L. *et al.* Mecanismos de resistência antimicrobiana em Pseudomonas aeruginosa. 2015.
- SHARMA, G. *et al.* Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. **Journal of applied microbiology**, 121, n. 2, p. 309-319, 2016.
- SHRIRAM, V. et al. Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phyto-therapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. DEC, p. 1–18, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02990.
- SILVA, E. A. J. et al. Antibacterial and antiproliferative activities of the fresh leaf essential oil of Psidium guajava L. (Myrtaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 4, p. 697-702, 2019.
- SILVA, M.C.; CARVALHO, J. C. T. Plantas Medicinais: Fitoterápicos. Antiinflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP, **Tecmedd**, p. 1-480, 2004.
- SILVA, D. C. et al. Chemical diversity of essential oils from native populations of Eplingiella fruticosa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, p. 205-214, 2018.
- SILVA, L. E. et al. Estudo etnobotânico e etnofarmacológico de plantas medicinais utilizadas na região de Matinhos – PR. **Revista Ciência e Natureza**, v. 37, n. 2, p. 266-276, 2015.
- SILVA, L.V. et al. Evaluation of the synergistic potential of vancomycin combined with other antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011 Feb; 106(1): 44-50.
- SILVA, M. O; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de epidemiologia e controle de infecção**, v. 8, n. 4, 2018.
- SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, p. 223–229, 2013.
- SOUZA, L. M. et al. Essential oil composition in natural population of Lippia organoides (Verbenaceae) during dry and rainy seasons. **Revista de Biologia Tropical**, v. 67, n. 1, p. 278-285, 2019.
- STOVER, C. *et al.* Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, 406, n. 6799, p. 959, 2000.

TAFUR, J.D., TORRES, J.A., VILLEGAS, M.V. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. **Asociación Colombiana de Infectología**, v. 12, n. 3, p. 217-226, 2008.

TAVARES, A. G. et al. Habituation of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* to *Origanum vulgare* L. essential oil does not induce direct-tolerance and cross-tolerance to salts and organic acids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 835-840, 2015.

TENÓRIO, R. F. L. et al. Atividade antibacteriana in vitro do extrato de *Abarema cochliacarpus* (gomes) Barneby & J.W. Grimes contra bactérias isoladas de feridas cutâneas de cães. **Ciências Animal Brasileira**, v.17, n.2, p. 252-259, 2016.

TINTINO, S.R. et al. Cholesterol and ergosterol affect the activity of *Staphylococcus aureus* antibiotic efflux pumps. **Microbial. Pathogenesis** **2017a**, *104*, 133–136. doi: 10.1016 / j.micpath.2017.01.019

TORTORA, G.J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R. **Microbiologia. 10ª Ed**; Artmed Editora: Porto Alegre, RS, Brazil; 2012.

VATTIMO, I. de. Nota prévia sobre as espécies de *Ocotea* Aubl. que ocorrem no Estado do Paraná (Lauraceae). Arquivos do Serviço Florestal, Rio de Janeiro, p. 109- 117, 1956.

VASCONCELOS, F.R. et al. PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADOS DO AÇUDE SANTO ANASTÁCIO, CEARÁ, BRASIL. **Arq. Inst. Biol**, v. 77, n. 3, p. 405-410, 2010.

VEIGA Jr, V.F.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura?. **Quim Nova**. v. 28, p. 519-528, 2005.

VERAS, B. O. et al. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 247, 2019.

WALLMANN, J. Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. **Int. J. Med. Microbiol**, v. 41, p. 81-86, 2006.

WANG, H. et al. Uropathogenic *E. coli* adhesion-induced host cell receptor conformational changes: implication in transmembrane signaling transduction. **J Mol Biol**, v. 392: p. 352-361, 2009.

WEBBER, M.A.; PIDDOCK, L.J.V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal antimicrobial chemotherapy**, v. 51, p. 9-11, 2003. DOI: 10.1093/jac/dkg050

WHITELEY, M. et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**, v. 413, p. 860-864, 2001.

YAMAGUCHI, M. U. et al. Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorífera* (Lauraceae). **Antonie van Leeuwenhoek**, 99: p. 507-514, 2011.

3. CAPÍTULO II - GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil of *Ocotea odorífera* and Safrole: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pumps

Revista: Antibiotics Situação: Publicado Fator de impacto: 3,893



antibiotics

Article

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 ⁵, Cícero Deschamps ⁶, Marcello Iriti ^{7,*} and Henrique D. M. Coutinho ^{1,*}

¹ Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri-URCA, Crato 63105-000, Brazil; rayalmeidasilva2306@gmail.com (R.S.A.); priscilla.r.freitas@hotmail.com (P.R.F.); caroljustino@outlook.com (A.C.J.A.); Irwin.alencar@urca.br (I.R.A.M.); 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), Salvador 40296-710, Brazil; jaime.ribeiro@fiocruz.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; 011800513@prof.uninassau.edu.br

⁵ Post graduate Program in Sustainable Territorial Development, Federal University of Paraná-UFPR, Matinhos 59950-000, Brazil; luizeverson@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. Celoria 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 odorífera* (E000) and safrole against efflux pump (EP)-carrying strains. The E000 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 E000 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 E000 including safrole as the principal constituent. While the E000 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. aureus*. In conclusion, *Ocotea odorífera* 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 aromatic plants [8]. Accordingly, the essential oil of the leaves of *Aloysia gratissima* and *Baccharis reticulata*, which have 1,8-cineole, germacrene D, α -pinene, β -caryophyllene, and β -pinene as major constituents, demonstrated bactericidal activity against both Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*) and Gram-negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacterial strains [9,10].

Ocotea odorifera (Lauraceae) is a plant popularly known as “sassafras”. This species, native to Brazil, is widely found in the Atlantic Forest where is used by the local communities in the treatment of malaria and rheumatism. In addition, due to its remarkable chemical constitution and abundance of essential oils, this plant has been used as a source of flavoring agents in the food industry [11–13]. Previous research with the essential oil of *O. odorifera* (EOOO) has identified safrole (C₁₀H₁₀O₂) as a major constituent, with unique chemical and pharmacological properties [14–16]. Accordingly, safrole has been used in the production of fragrances and as a raw material in the synthesis of drugs and insecticides [17]. While the effects of essential oils containing safrole against Gram-negative strains of *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, and *Pseudomonas aeruginosa*, have been demonstrated previously, the antibacterial activity of this organic compound against *Staphylococcus aureus* strains remains to be characterized [18–20].

S. aureus is a Gram-positive bacterium with remarkable pathogenicity. Accordingly, resistance to antibiotics is currently a major worldwide public health problem [21]. Resistant bacteria are characterized by the presence of natural or acquired mechanisms that confer survivability even in the presence of high concentrations of antibiotics [22]. In this context, genetic modification of the binding site, enzymatic inactivation, and active transport by efflux pumps (EPs) are recognized as the principal mechanisms of resistance to antibiotics [23]. Importantly, EPs were found to mediate antibiotic resistance in several strains of *S. aureus*. By actively transporting drugs to the extracellular medium, these transmembrane proteins reduce the intracellular concentrations of antibiotics, resulting in ineffective therapy [24].

Aiming to discover new weapons to combat bacterial resistance, researchers have been dedicated to investigating the antibacterial and antibiotic-modulating properties of natural products. Therefore, considering the evidence that essential oils and 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 of *Ocotea odoriferas* and safrole in EP-carrying strains.

2. Results

2.1. Chemical Composition of the Essential Oil of *Ocotea Odorifera*

The extraction of the EOOO by hydrodistillation presented a yield of 2.31%, considering the dry weight of the botanical material. Phytochemical analysis of the essential oil through gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) identified 93.1% of the total constituents, revealing the presence of 16 different compounds, including safrole (77.9%), spathulenol (4.0%) and ortho-cymene (3.0%) as major constituents (Table 1).

Table 1. GC-MS profile of the essential oil of *Ocotea odorifera*.

RI	Compound	%
936	Alpha-pinene	0.3
951	Camphene	0.2
978	Beta-pinene	0.1
1005	Alpha-felandrene	1.9
1026	Ortho-cymene	3.0
1033	1,8-Cineole	0.9
1145	Camphor	0.4
1189	Alfa-terpineol	0.3
1292	Safrole	77.9
1356	Eugenol	0.6
1414	(E)-caryophyllene	0.4
1476	Gama-muurolene	0.3
1487	Delta-selinene	0.5
1491	Bicyclogemacrene	1.1
1572	Spathulenol	4.0
1648	11-selinen-4-alpha-ol	1.2
Total composition identified 93.1		

Legend: RI = Retention Index.

2.2. Antibacterial Activities of the EOOO and Safrole

The broth dilution method was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the essential oil of *Ocotea odorifera* and its major constituent safrole against multi-resistant strains of *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. The antibacterial activity analysis revealed that both treatments presented MIC values above 1024 µg/mL against *E. coli* and *P. aeruginosa*, indicating that they exert clinically ineffective antibacterial activity against these strains. However, both treatments presented MIC values of 512 µg/mL against *S. aureus*, suggesting that *O. odorifera* and its major constituent safrole exert antibacterial effects against this Gram-positive strain (Table 2).

Table 2. Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of the EOOO and safrole.

Bacterial Strain	EOOO MIC(µg/mL)	Safrole MIC (µg/mL)
<i>S. aureus</i> 10	512	512
<i>E. coli</i> 06	≥ 1024	≥ 1024
<i>P. aeruginosa</i> 24	≥ 1024	≥ 1024

2.3. Antibiotic-Potentiating Effects of the EOOO and Safrole

As the EOOO and safrole presented variable intrinsic antibacterial activity, this study analyzed the ability of these substances to modulate the antibacterial resistance to norfloxacin, a fluoroquinolone antibiotic. To this end, the MIC of this antibiotic was calculated after culturing the same bacterial strains in the presence or absence of the natural products at concentrations equivalent to their MIC \div 8. As shown in Figure 1, The MIC values of norfloxacin against strains of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* were significantly reduced by both EOOO and safrole, indicating that they present antibiotic-modulating effects against all investigated strains. Interestingly, while these treatments did not present direct antibacterial effects against *P. aeruginosa* and *E. coli*, they were found to modulate the antibacterial resistance to norfloxacin observed for the Gram-positive and Gram-negative strains evaluated by the present study.

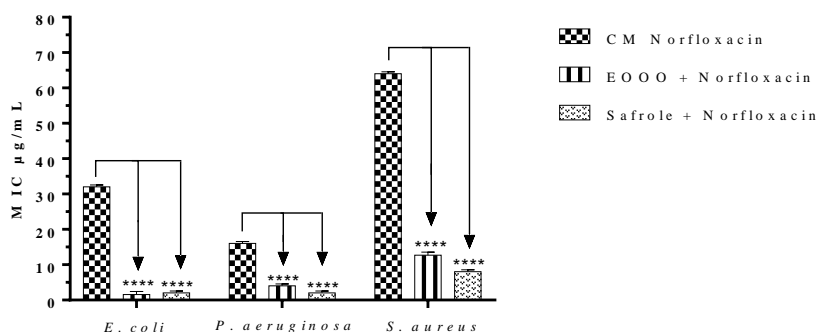


Figure 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of norfloxacin alone or in the presence of *O. odorifera* or safrole against the multiresistant strains *E. coli* 06, *S. aureus* 10 and *P. aeruginosa* 24. **** $p < 0.0001$ indicates significant differences between groups. Statistical significance was determined by one-way ANOVA and Bonferroni's post-hoc test.

2.4. Effects of Safrole on the *S. aureus* NorA and MepA Efflux Proteins

The ethidium bromide assay has been widely used to evaluate the potential action of drugs as EP inhibitors [25]. Therefore, it was evaluated whether safrole could modulate bacterial resistance in the *S. aureus* 1199B and K2068 strains, which express the NorA and MepA EP, respectively. The association with subinhibitory concentrations of safrole or chlorpromazine (control drug) significantly reduced the MIC of ethidium bromide against both strains, indicating that safrole could act as an EP inhibitor in some *S. aureus* strains (Figure 2).

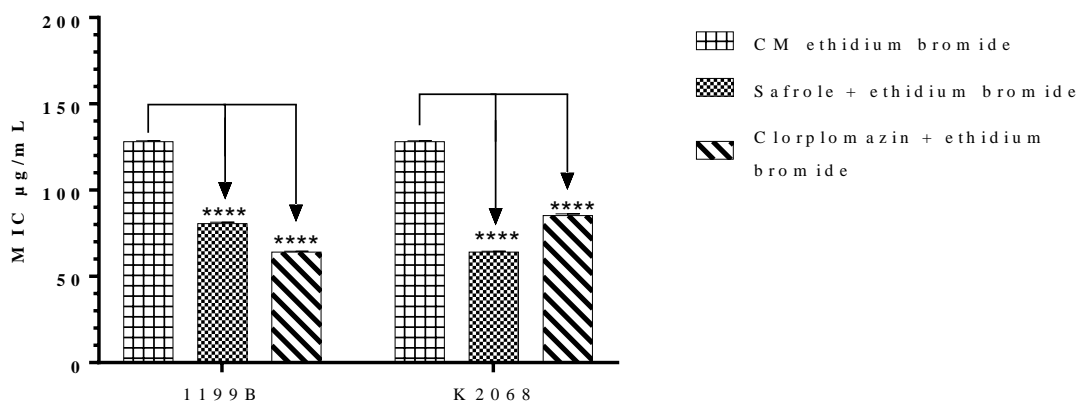


Figure 2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of ethidium bromide alone or associated with safrole or chlorpromazine (control) against *S. aureus* 1199B and K2068 strains. **** $p < 0.0001$ indicates significant differences between groups. Statistical significance was determined by one-way ANOVA and Bonferroni's post-hoc test.

Following the promising effects demonstrated by safrole in the ethidium bromide test, the effects of this compound as a modulator of bacterial resistance in association with norfloxacin and ciprofloxacin was investigated. Of note, the 1199B and K2068 strains, respectively, bear resistance genes against each of these antibiotics. To this end, the MIC of this antibiotic was calculated after culturing the same bacterial strains in the presence or absence of the natural products at concentrations equivalent to their MIC $\div 8$. As shown in Figure 3, the association with safrole or chlorpromazine (control) significantly reduced the MICs of both antibiotics, suggesting that the resistance to these drugs was, at least partially, reverted by safrole, which possibly inhibits the NorA and MepA-mediated efflux mechanisms in *S. aureus*.

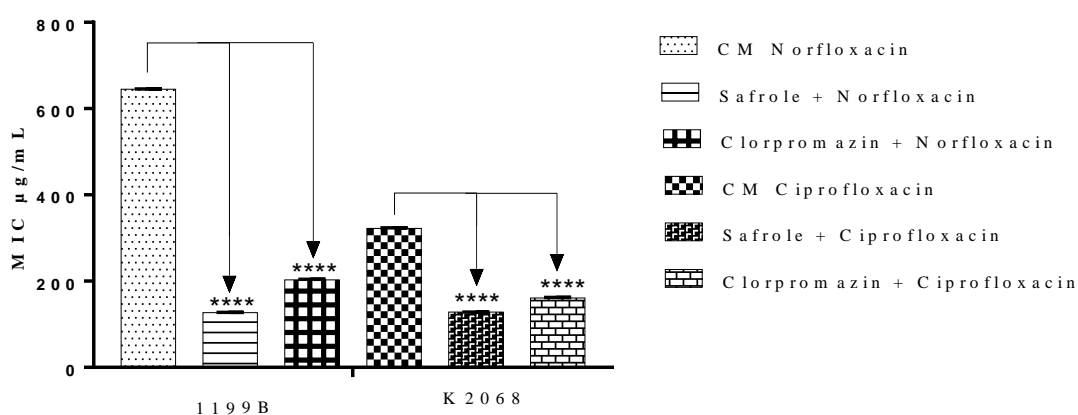


Figure 3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by safrole in association with norfloxacin or ciprofloxacin against *S. aureus* 1199B and K2068 strains. **** $p < 0.0001$ indicates significant differences between groups. Statistical significance was determined by one-way ANOVA and Bonferroni's post-hoc test.

2.5. Molecular Docking and Analysis of Interactions between Safrole and Efflux Proteins

The docking simulations determined the ligand-bound protein complexes with minimal

energy and the best stability. The best-docked ligand conformations were saved in output clusters 0. The docking studies revealed that chlorpromazine and safrole presented the most favorable interaction energies (IE), which were positively correlated with their MIC values, inhibition constants (Ki) and size-independent ligand efficiency (SILE) for both NorA (Table 3) and MepA (Table 4) efflux proteins. Together, this data shows that safrole has a more favorable interaction with the MepA protein compared to NorA.

Table 3. Molecular docking and analysis of interactions between EP inhibitors and NorA.

Compound	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	IE (Kcal/mol)	Ki (μM)	SILE
Ethidium Bromide	128	-7.8	1.95	0.74
Chlorpromazine	64	-6.4	20.64	7.86
Safrole	80.63	-5.9	47.95	18.72

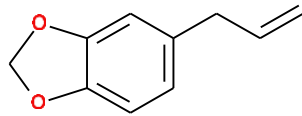
Legends: MIC = minimum inhibitory concentration; IE = interaction energy; Ki = inhibition constant; SILE = size independent ligand efficiency.

Table 4. Molecular docking and analysis of interactions between EP inhibitors and MepA.

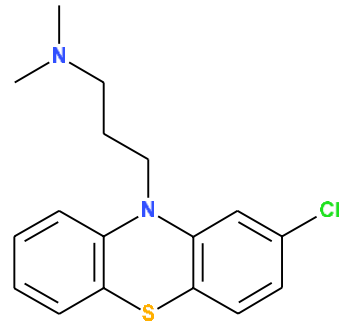
Compound	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	IE (Kcal/mol)	Ki (μM)	SILE
Ethidium Bromide	128	-8.6	0.51	0.19
Chlorpromazine	85.33	-6.9	8.88	3.47
Safrole	64	-6.1	34.23	15.19

Legends: MIC = minimum inhibitory concentration; IE = interaction energy; Ki = inhibition constant; SILE = size independent ligand efficiency.

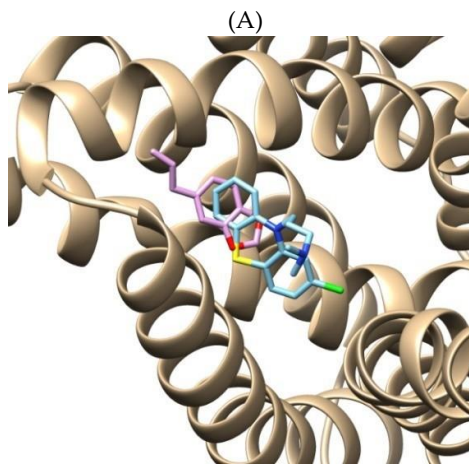
Figure 4 shows the chemical structures of safrole (Figure 4A) and chlorpromazine (Figure 4B) in the binding pockets of the NorA (Figure 4C) and MepA (Figure 4D) efflux pumps. Interaction maps were used to predict the participation of amino acid residues in the binding of chlorpromazine (Figure 4E–F) or safrole (Figure 4G–H) to these efflux pumps. The interaction maps show that chlorpromazine and safrole similarly interact with the MepA binding site through anchors with Glu287, Leu366, Met363, Met341 Pro286, Val283, Leu282, and Val334, as well as with the NorA binding site through Gly342, Val286, Ile258, Ala261, Ile341, Ala339, Leu325, and Phe283. The interactions between these amino acids and safrole are given at nonpolar and partially hydrophobic regions involving Van der Waals, π -Allyl, and Allyl interactions. On the other hand, the binding of chlorpromazine to the corresponding amino acids predominantly involves Van der Waals, π -Allyl, Allyl, carbon hydrogen bond, π - π , π -sigma, and π -sulfur interactions. These findings corroborate the evidence that safrole, as well as chlorpromazine, could act as efflux pump inhibitors in the *S. aureus* SA1119B and K2068 strains.



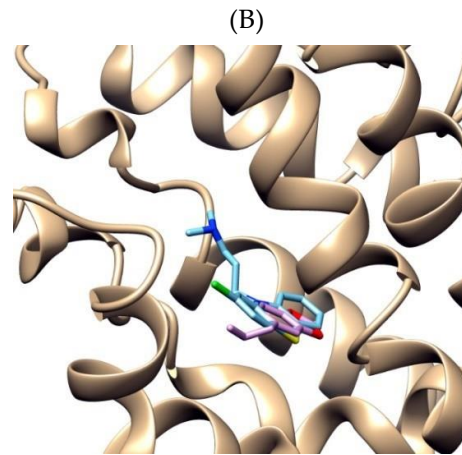
Safrole



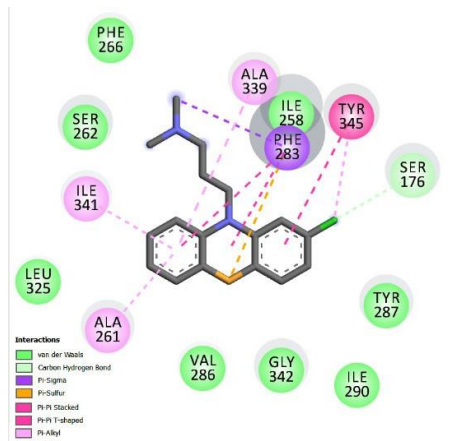
Chlorpromazine



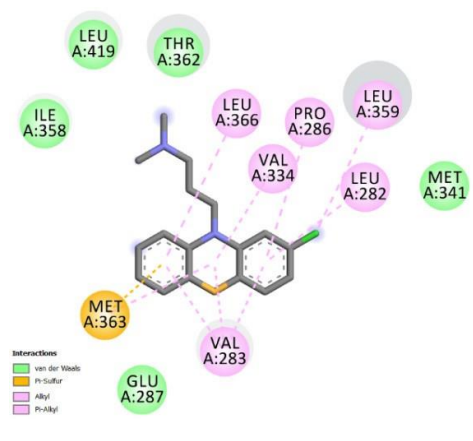
(C)



(D)



(E)



(F)

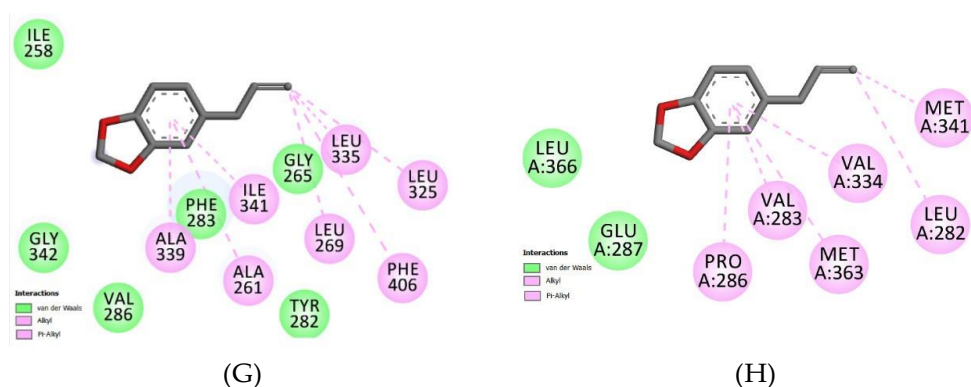


Figure 4. Chemical structures of Safrol (A) and Chlorpromazine (B). Binding poses of best stability of safrole and chlorpromazine with the NorA (C) and MepA (D). Interaction maps showing the binding of chlorpromazine to amino acid residues in the NorA (E) and MepA (F) binding sites. Interaction maps showing the binding of safrole to amino acid residues in the NorA (G) and MepA (H) binding sites.

3. Discussion

The discovery of penicillin represented an important milestone in the therapy of bacterial diseases and opened new perspectives for antibacterial drug development. Additionally, the introduction of the last generation of antibiotics has had a significant impact on public health, contributing to reduced morbidity and mortality rates caused by bacterial infections. However, the irrational use of these therapeutic classes has contributed to the selection of multidrug-resistant bacterial strains, against which conventional antibiotics may become ineffective. Therefore, the discovery of new antibiotics is crucially important to ensure the success of antibiotic therapy in future medicine [26–28].

The present research investigated the antibacterial effects of the essential oil of *O. odorifera* and its major constituent safrole against multi-resistant strains. The phytochemical analysis identified 93.1% of the total constituents of the EOOO, revealing the presence of 16 different compounds, including safrole as a major constituent. This finding is corroborated by a previous study showing a similar composition, as well as the presence of safrole as the principal component of essential oil obtained from the leaves of the same species [29]. According to Junior et al. [30] and Lorenzi and Matos [31], safrole is a bioactive compound widely used in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries. In general, essential oils present significant yield, and their composition can vary depending on climatic and environmental factors, such as temperature, humidity, precipitation, soil, and time of collection. Additionally, the part of the plant used (leaves, bark, seeds or root), as well as the method of the extraction, may interfere with the composition of the essential oil of a given species [15,32,33].

The antibacterial activity analysis revealed that while the essential oil of *O. odorifera* and safrole presented clinically ineffective antibacterial activity against *E. coli* and *P. aeruginosa*, they presented clinically relevant MIC values against *S. aureus*. The data obtained by this study suggest that safrole is, at least partially, responsible for the antibacterial effects of the EOOO. It is still suggested that both the oil and the isolated compound are more effective against Gram-positive strains, which may be justified by differences in the constitution of the membrane of Gram-positive and Gram-negative bacteria.

According to Nazzaro et al. [34], Gram-negative bacteria are more resistant to the penetration of essential oils due to the presence of an outer layer of lipopolysaccharides.

Accordingly, Betim et al. [35], comparing the antibacterial activities of *O. odorifera* and *O. nutans*, demonstrated that the essential oil of *O. odorifera* presented more potent effects. In addition, they found that both essential oils were more effective against Gram-positive bacteria, corroborating the findings of the present research. On the other hand, a study by Damascemo et al. [36] found clinically ineffective MIC values for the essential oil of *O. bicolor* against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli*. Furthermore, Cansian et al. [37] found that an essential oil obtained from *O. odorifera* was more efficient against Gram-negative bacteria. As discussed above, the chemical composition of a species may be significantly influenced by several environmental factors, which may affect the pharmacological effects of extracts, fractions, and essential oils.

Following the antibacterial activity analysis, this work investigated the ability of the EOOO and safrole ability to modulate the antibacterial resistance to norfloxacin, a fluoroquinolone antibiotic. The MIC values of norfloxacin against strains of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli* were significantly reduced in the presence of a subinhibitory concentration of the EOOO and safrole ($MIC \div 8$) indicating that both the oil and the isolated compound can modulate the antibacterial resistance to norfloxacin observed for the Gram-positive and Gram-negative strains evaluated by our study. Nevertheless, the isolated compound showed more potent antibiotic-enhancing activity against all strains, reducing the MIC of norfloxacin by up to 7 fold in comparison with the antibiotic alone. Studies have demonstrated that antibacterial resistance to norfloxacin is significantly mediated by the expression of efflux systems [38]. Therefore, it is hypothesized that the antibiotic-enhancing effects shown by the EOOO and safrole might involve inhibition of efflux pumps.

Efflux pumps are membrane proteins that carry out the active transport of a wide range of molecules, removing potentially toxic substances from the intracellular medium. However, in the context of antibiotic therapy, the active transport of drugs by these proteins results in reduced intracellular concentrations and, consequently, failure in the therapeutic effect [23]. Increasing evidence has demonstrated that efflux pumps are overexpressed in multiresistant bacterial strains, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Thus, considering the notable role of efflux pumps on antibacterial resistance in *S. aureus*, we evaluated the potential involvement of EP inhibition on safrole-mediated antibiotic resistance modulation in the *S. aureus* 1199B and K2068 strains, which express the NorA and MepA EP, respectively. In the present study, the association with subinhibitory concentrations of safrole or chlorpromazine (control drug) significantly reduced the MIC of ethidium bromide against both strains. According to Tintino et al. [39], when natural or synthetic compounds are tested against EP-bearing strains in association with ethidium bromide, a reduction in the MIC of this substance indicates that the tested compound also acts as an EP inhibitor. Thus, it is suggested that safrole could serve as an EP inhibitor in these *S. aureus* strains.

Accordingly, Oliveira-Tintino et al. [40] reported that while the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* significantly reduced the MIC of ethidium bromide against the 1199B strain, its principal constituent α -Terpinene presented no significant modulating effect, suggesting that other components of the *C. ambrosioides* oil could act as EP inhibitors. However, the molecular mechanisms associated with EP inhibition by essential oils, as well as their isolated components, remain to be fully characterized. Nevertheless, since ethidium bromide is used as a substrate by bacterial EP, it is hypothesized that these natural products could act by blocking the binding of the substrate to the pump. Additionally, it has been suggested that energy depletion, competition with ATP, and interference with the proton gradient are potential mechanisms associated with EP inhibition by natural or synthetic compounds [41].

Considering the promising effects demonstrated by safrole in the efflux pump inhibition assay, it was evaluated whether safrole could modulate bacterial resistance *S. aureus* strains bearing resistance genes against norfloxacin and ciprofloxacin. The results of the present study demonstrated that safrole, as well as the EP inhibitor chlorpromazine (control), significantly reduced the MICs of both antibiotics, suggesting that the resistance to these drugs was, at least partially, reverted by safrole, which possibly inhibits the NorA- and MepA-mediated efflux mechanisms in *S. aureus* [42,43]. To confirm this hypothesis, molecular modeling and docking analysis were used to evaluate *in silico*, the potential interactions between safrole or chlorpromazine (control drug) and the NorA and MepA efflux pumps. The present findings suggest that safrole, as well as chlorpromazine, could act as efflux pump inhibitors in the *S. aureus* SA1119B and K2068 strains, and that safrole has a more favorable interaction with the MepA protein compared to NorA.

Previous studies suggest that chlorpromazine affects the membrane potassium flow in *S. aureus*. However, in multi-drug resistant strains, a significant inhibition is observed only at concentrations above 50 μM [44]. Chlorpromazine is a typical antipsychotic drug acting as a dopamine antagonist. Curiously, studies have shown that this drug also acts as a strong inhibitor of the NorA efflux pump, and there is evidence that the interaction between this drug and the amino acid residues is favored by its hydrophobic properties and molecular dimension, corroborating the findings shown in the interaction map [45].

Finally, structure-activity relationship (SAR) studies indicate that phenyl-ether groups significantly contribute to the interactions with the NorA and MepA EP in *S. aureus* [46]. Additionally, accumulating evidence suggest that high lipophilicity facilitates the action of EP inhibitors on these proteins, corroborating the findings of the present research [43].

4. Materials and Methods

4.1. Collection and Identification of the Botanic Material

The essential oil was extracted from terminal branches and inflorescences of plants (Figure 5) collected in a segment of Atlantic Forest in the State of Paraná, Southern Brazil, located at the following geographical coordinates: S 25° 19.862' W 49° 48.338'. The collection and transport of the plant samples were performed under the authorization of the Paraná Environmental Institute (registry number 284/11). A voucher specimen was prepared and registered at the Herbarium of "Faculdades Integradas Espirita" (HFIE) (registry number 9.000). Terminal branches and inflorescences were randomly collected from at least 10 individual plants and dried with an electric dryer (Gama Italy IQ perfetto 127V) at 40 °C for 24 h.



Figure 5. Sample of the plant *Ocotea odorifera*.

4.2. Essential Oil Extraction

The essential oil of *O. odorifera* was extracted by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus. Briefly, approximately 1 kg of the plant material was crushed and subjected to extraction with 2.5 L of distilled water at boiling temperature for 2 h. After extraction, the essential oil was combined with anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) and stored under refrigeration ($-4\text{ }^\circ\text{C}$) for preservation [47].

4.3. Calculation of Essential Oil Yield

The yield of the essential oil was calculated as a percentage of the dry biomass obtained from the aerial parts of the plant, using the following equation:

$$TO = \frac{VO}{MS} \times 100$$

Legend: TO = oil content in 100 g of biomass; VO = volume of oil obtained; DM = amount of dry biomass, free of water and humidity; and 100 = conversion factor to percentage [48].

4.4. Phytochemical Analysis

The chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-EM) using an Agilent 6890 chromatograph (Palo Alto, CA, USA) coupled to an Agilent 5973N mass selection detector. The separation of the constituents was obtained in a capillary column HP-5MS (5%-phenyl-95%-dimethylpolysiloxane, 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) and using helium as the carrier gas (1.0 mL min^{-1}). The chemical constituents were identified by comparing their mass spectra with the standards reported in the literature [49].

4.5. Bacterial Cultures

The following multidrug-resistant strains were used in the antibacterial tests: *Pseudomonas aeruginosa* 24, *Staphylococcus aureus* 10 and *Escherichia coli* 06. The origin and resistance profile of these strains is shown in Table 5.

Table 5. Origin and antibiotic resistance profile of the strains.

Bacterial strain	Origin	Resistance Profile
<i>S. aureus</i> 10	Rectum swab	Amc, Amox, Amp, Asb, Azi, Cefa Cef, Cf, Cip, Cla, Clin, Ery, Lev, Mox, Oxa, Pen
<i>E. coli</i> 06	Urine	Asb, Cefa, Cef, Cfo, Cpm, Ctx
<i>P. aeruginosa</i> 24	Nasal discharge	Ami, Cip, Ctz, Imi, Lev, Mer, Ptz

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

S. aureus strains 1199B and K2068, which carry the NorA and MepA efflux proteins, respectively, were kindly provided by Prof. S. Gibbons (University of London). All strains were initially kept on blood agar (Laboratorios Difco Ltd.a., São Paulo, Brazil) and maintained in Heart Infusion Agar (HIA, Difco) medium 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.

4.6. Drugs

Norfloxacin and ciprofloxacin were used in the tests with the 1199B and K2068 strains, respectively. These strains carry the NorA and MepA efflux proteins, respectively, which confer resistance to the corresponding antibiotic. Ethidium bromide was used as an efflux pump inhibitor control. Both antibiotics were dissolved in DMSO and diluted in water, while ethidium bromide was dissolved in water. All drugs were prepared at initial concentrations of 1024 µg/mL and serially diluted in test tubes. Both antibiotics, ethidium bromide and safrole were purchased from SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

4.7. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Each inoculum was prepared with 10% Brain Heart Infusion (BHI) at a ratio of 1:9. Next, 100 µL of inoculum in medium was placed in wells on a 96-well plate with 100 µL of the substance at concentrations ranging from 1024 to 8 µg/mL, followed by incubation at 37 °C for 24 h. Positive controls (medium + inoculum) were included in the last wells of the plate [50]. After incubation, 20 µL of sodium resazurin was added to each well, followed by an additional 1 h incubation period at room temperature. A change in the color of the solution, due to the reduction of resazurin, was used as an indicator of bacterial growth [51,52]. The MIC was defined as the lowest concentration capable of inhibiting bacterial growth. All experiments were carried out in triplicate for all bacterial strains.

4.8. Analysis of Antibiotic Resistance Modulation

To evaluate the ability of the EOOO and safrole to modulate bacterial resistance in the presence of other drugs, the MICs of norfloxacin and ciprofloxacin against resistant strains of *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus* were determined in the presence or absence of these natural products at concentrations equivalent to their MIC ÷ 8 [53]. The readings were performed as

described above.

4.9. Efflux Pump Inhibition Analysis Using an Ethidium Bromide Assay

In this test, the MIC of ethidium bromide was determined in the presence or absence of sub-inhibitory concentrations of the EOOO and safrole. Briefly, the bacterial inocula were prepared in BHI medium, and the treatments were added at concentrations equivalent to their MIC \div 8. Wells on a 96-well plate were filled with 100 μ L of the solutions of each treatment and then, ethidium bromide was added to the wells at concentrations ranging from 1024 to 0.5 μ g/mL. A reduction in the ethidium bromide MIC was interpreted as EP inhibition [54]. Experimental controls and MIC values for both OEOC and safrole were determined as described above. All tests were performed in triplicate.

4.10. Efflux Pump Inhibition Analysis Using an Antibiotic Resistance Modulation Assay

Considering that the *S. aureus* strains 1199B and K2068 carry genes encoding efflux proteins associated with antibiotic resistance to norfloxacin and ciprofloxacin, respectively, this protocol was used to evaluate the ability of the EOOO and safrole to modulate bacterial resistance in association with these antibiotics against the corresponding strain. The bacterial inocula were prepared in BHI medium and the treatments were added at concentrations equivalent to their MIC \div 8. Wells on a 96-well plate were filled with 100 μ L of the solutions of each treatment and then, each antibiotic was added to the wells at concentrations ranging from 1024 to 0.5 μ g/mL. A reduction in the MIC of the antibiotic was interpreted as EP inhibition [54]. Experimental controls and MIC values for both EOOO and safrole were determined as described above. All tests were performed in triplicate.

4.11. Molecular Modelling and Docking Studies

The three-dimensional (3D) structures of the NoRA and MepA proteins were determined using homology models as follows: the three-dimensional structures were predicted using the Protein Homology/Analogy Recognition Engine version 2.0 (Phyre2, available <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) web server, and confirmed using the Iterative Threading Assembly Refinement (I-TASSER, available <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) and MODELLER 9.14 servers. The stereochemical quality of the protein structures was checked by the Ramachandran plot using the PROCHECK program [55]. The topographic structure of the pockets and cavities were characterized using the Computed Atlas of Surface Topography of proteins (CASTp, available <http://cast.engr.uic.edu>) with a standard value of 1.4 Å of the radius, and the ligand-binding sites were predicted using the 3DligandSite server [56].

Docking simulations were carried out with a binding region defined by a 10 Å \times 10 Å \times 10 Å box set at the centroid of predicted ligand-binding sites. The structures were adjusted using a protein preparation tool provided by the Chimera package (version 1.14, University of California, San Francisco, CA, USA), the 3D structures of ligands were obtained using the corina[®] 3D structure generator (version 4.3, Altamira LLC, Oklahoma city, OK, USA), and minimization of energy was achieved using the UCSF Chimera structure build module [57]. The docking analyses were carried out using the UCSF Chimera and AutoDock Vina software (version 1.1.2., The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) based on the iterated local search global optimizer [58]. Proteins and ligands were maintained flexible during the docking process. The selection of flexible residues from proteins was based on the active site at 4.0 Å from the co-crystallized ligands. The most favorable binding free energy was represented by clustering the positional Root-mean-square deviation of atomic positions (RMSD) data with no more than 1.0 Å. The final docked complexes were analyzed using the

Discovery Studio visualizer program version 3.1 (Dassault Systèmes, San Diego, CA, USA). The binding energy score was used to calculate the inhibition constant (K_i value)-based in an equation by Onawole et al. [59], and the size-independent ligand efficiency (SILE) was measured using the equation described by Nissink, J. W. M. [60].

4.12. Statistical Analysis

Data are expressed as arithmetic means \pm standard error of the mean and were analyzed by analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's post-test using GraphPad Prism software version 7.00 (available <http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

5. Conclusions

The essential oil of *Ocotea odorifera* has antibacterial and antibiotic-enhancing activities that are, at least partially, mediated by its major constituent, safrole. Safrole modulates antibiotic resistance in the *S. aureus* SA1119B and K2068 strains, possibly through direct inhibition of the NorA and MepA efflux pumps, respectively.

In conclusion, *Ocotea odorifera* and safrole present 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.

Author Contributions: Conceptualization, R.S.A.; methodology, R.S.A., A.C.J.A. and P.R.F.; project administration, I.R.A.M., M.I. and H.D.M.C.; software, I.R.A.M.; conceptualization, E.L.S. and S.R.T.; formal analysis, T.F.M. and V.A.F.; investigation, J.R.F., A.C.A.S. and L.E.S.; writing—original draft preparation, W.d.A. and C.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors would like to thank Regional University of Cariri

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

References

1. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *J. food Microbiol.* **2004**, *94*, 223–253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
2. Ahmad, A.; Khan, Um.; Kumar, P.; Bhatt, R.P.; Manzoor, N. Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Yeast.* **2011**, *28*, 611–617. doi: 10.1002/yea.1890
3. Pérez, S.G.; Ramos-López, M.A.; Sánchez-Miranda, E.; Fresán-Orozco, M.C.; Pérez-Ramos, J. Antiprotozoa activity of some essential oils. *J. Med. Plants Res.* **2012**, *6*, 2901–2908. doi: 10.5897/JMPR11.1572
4. Sadekuzzaman, M.; Yang, S.; Mizan, M.F.R.; Ha, S.D. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2015**, *14*, 491–509. doi: 10.1111/1541-4337.12144
5. Franz, C.M. Essential oil research: past, present and future. *Flavour. Fragr. J.* **2010**, *25*, 112–113. doi: 10.1002/ffj.1983
6. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475. doi: org/10.1016/j.fct.2007.09.106
7. Dubey, V. S.; Bhalla, R. Luthra, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal Biosciences*, **2003**, *28*, 637–646. DOI.org/10.1007/BF02703339
8. Peixoto-Neves, D.; Silva-Alves, K.S.; Gomes, M.D.; Lima, F.C.; Lahlou, S.; Magalhães, P.J.; Ceccatto, V.M.; Coelho-de-Souza, A.N.; Leal-Cardoso, J.H. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2010**, *24*, 341–350. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00768.x
9. Santos, T.G.; Laemmle, J.; Rebelo, R.A.; Dalmarco, E.M.; Cruz, A.B.; Schmitd, A.P.; Cruz, R.C.B.; Zeni, A.L.B. Chemical composition and antimicrobial activity of *Aloysia gratissima* (Verbenaceae) leaf essential oil. *J. Essent. Oil Res.* **2015**, *2*, 125–130. doi: 10.1080/10412905.2015.1006737
10. Priscilla, R.F.; Ana Carolina, J.A.; Cristina, R.S.B.; Débora, F.M.; Silva, A.C.A.; Rocha, J.E.; Oliveira-Tintino, C.D.M.; Ribeiro-Filho, J.; Silva, L.E.; Camila Confortin, C.; et al. GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. And α -pinene. *Industrial. Crops & Products* **2020**, *145*, 112106. doi:10.1016/j.indcrop.2020.112106
11. Oliveira, B.V.; Yamada, L.T.; Fagg, C.W.; Brandão, M.G.L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. *Food Research International* **2012**, *48*, 170–179. doi: 10.1016/j.foodres.2012.03.011
12. Bolsaris, A.S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2007**, *3*, 1–8. doi: 10.1186/1746-4269-3-18
13. Tribess, B.; Pintarelli, G.M.; Bini, L.A.; Camargo, A.; Funez, L.A.; de Gasper, A.L.; Zeni, A.L. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *164*, 136–146. doi: 10.1016/j.jep.2015.02.005
14. Castro, R.D.; Lima, E.O. Antifungal activity of Brazilian sassafras (*Ocotea odorifera* Vell.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils against genus *Candida*. *Brazilian J. Med. Plant.* **2011**, *13*, 203–208. doi: 10.1590/S1516-05722011000200012
15. Junior, A.R.P.; de Carvalho, R.I.N.; Netto, S.P.; Weber, S.H.; de Souza, E.; Furiatti, R.S. Bioactivity of essential oils of Brazilian 13imple13se and eucalyptus against lesser mealworm. *Ciência. Rural.* **2010**, *40*, 637–643. doi: 10.1590/S0103-84782010005000026

16. Riva, D.; Simionatto, E.L.; Junior, A.W.; Salerno, A.R.; Schallenberger, T.H. Estudo da adaptação da espécie *Piper hispidinervum* C. DC. (pimenta longa) à região do Vale do Itajaí-SC, através da composição química do óleo essencial obtido por hidrodestilação por micro-ondas e convencional. *Act. Amazonica*. **2011**, *41*, 297. doi: 10.1590/S0044-59672011000200016
17. Costa, P.R.R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. *Quím. Nova*. **2000**, *23*, 357. doi: 10.1590/S0100-40422000000300013
18. Khayyat, A.S.; Al-Zahrani, S.H. Thermal, photosynthesis and antibacterial studies of bioactive safrole derivative as precursor for natural flavor and fragrance. *Arab. J. Chem.* **2014**, *7*, 800–804. doi: 10.1016/j.arabjc.2011.09.014
19. Barbosa, Q.P.; da Câmara, C.A.G.; Ramos, C.S.; Nascimento, D.C.O.; Lima-Filho, J.V.; Guimarães, E.F. Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. *Quím. Nova*. **2012**, *35*, 1806–1808. doi: 10.1590/S0100-40422012000900019
20. Alterthum, F. *Microbiologia*. 6ª Ed. Atheneu: São Paulo, SP, Brazil; **2017**.
21. Loureiro, R.J.; Roque, F.; Rodrigues, A.T.; Herdeiro, M.T.; Ramalheira, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Ver. Port. Ver. Pub.* **2016**, *34*, 77–84. doi: 10.1016/j.rpsp.2015.11.003.
22. Kohl, T.; Pontarolo, G.H.; Pedrassani, D. Resistência Antimicrobiana De Bactérias Isoladas De Amostras De Animais Atendidos Em Hospital Veterinário. *Saúde. Meio. Ambiente*. **2016**, *5*, 115–127. doi: 10.24302/sma.v5i2.1197
23. Tortora, G.J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R. *Microbiologia*. 10ª Ed; Artmed Editora: Porto Alegre, RS, Brazil; 2012.
24. Blair, J.M.A.; Baylay, A.J.; Ogbolu, D.O.; Piddock, L.J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Ver. Microbiol.* **2015**, *13*, 42. doi: 10.1038/nrmicro3380
25. Tintino, S.R.; Oliveira-Tintino, C.D.M.; Campina, F.F.; Limaverde, P.W.; Pereira, P.S.; Siqueira-Junior, J.P.; Coutinho, H.D.M.; Quintans-Júnior, L.J.; da Silva, T.G.; Leal-Balbino, T.C. et al. Vitamin K enhances the effect of antibiotics inhibiting the efflux pumps of *Staphylococcus aureus* strains. *Med. chem. Rese.* **2018**, *27*, 261–267. doi: 10.1007 / s00044-017-2063-y
26. Bahmani, M.; Schmidt, O. Plant essential oils for environment-friendly protection of wood objects against fungi. *Maderas. Ciência. y tecnologia*. **2018**, *20*, 325–332. doi: 10.4067/S0718-221X201800500330
27. Souza, L.M.; Fonseca, F.S.A.; Silva, J.C.R.L.; Silva, A.M.; Silva, J.R.; Martins, E.R. Essential oil composition in natural population of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) during dry and rainy seasons. *Revista. de Biologia. Tropical*. **2019**, *67*, 278–285. doi: 10.15517/rbt.v67i1.31407
28. Hoefel, H.H.K; Lautert, L. Administração endovenosa de antibióticos e resistência bacteriana: responsabilidade da enfermagem. *Revista. Eletrônica. de Enfermagem*. **2006**, *8*, 441–449. doi: 10.5216/ree.v8i3.7083
29. Alós, J.I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: ver crisis global. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2015**, *33*, 692–699. doi: 10.1016 / j.eimc.2014.10.004
30. Mota, R.A.; da Silva, K.P.C.; de Freitas, M.F.L.; Porto, W.J.N.; da Silva, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a resistência bacteriana. *Brazilian J. Veterinary Res. Animal Sci.* **2005**, *42*, 465–470. doi:10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2005.26406
31. Mossi, J.A.; Zanella, C.A.; Kubiak, G.B.; Lerin, L.A.; Cansian, R.L.; Frandoloso, F.S.; Prá, V.D.; Mazutti, M.A.;

- Costa, J.A.V.; Treichel, H. Essential oil of *Ocotea odorifera*: An alternative against *Sitophilus zeamais*. *Renew. Agr. Food Syst.* **2014**, *29*, 1–6. doi: 10.1017/S1742170513000045
32. Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. *Instituto. Plantarum.* **2002**. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=LIBROS.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=008440> (accessed on 10 may 2020)
33. Silva, D.C.; Blank, A.F.; Nizio, D.A.C.; Sampaio, T.S.; Nogueira, P.C.L.; Arrigoni-blank, M.F. Chemical diversity of essential oils from native populations of *Eplingiella 14imple14se*. *Crop Breed. Appl. Biot.* **2018**, *18*, 205–214. doi: 10.1590/1984-70332018v18n2n29
34. Nazzaro, F.; Frantianni, F.; de Martino, L.; Coppola, R.; de Feo, V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 1451–1474. doi: 10.3390 / ph6121451
35. Betim, F.C.M.; Souza, A.M.; Szabo, E.M.; Zanin, S.M.W.; Miguel, O.G.; Miguel, M.D.; Dias, J.F.G. *Ocotea nutans* (Nees) Mez (LAURACEAE): Chemical composition, antioxidante capacity and biological properties of essential oil. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **2019**, *55*, 1–10. doi: 10.1590/s2175-97902019000118284
36. Damascemo, C.S.B.; de Oliveira, L.F.; Szabo, E.M.; Souza, A.M.; Dias, J.F.G.; Miguel, M.D.; Miguel, O.G. Chemical composition, antioxidant and biological activity of *Ocotea odorifera* Vattimo-Gil (LAURACEAE) essential oil. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **2017**, *53*, 1–8. doi: 10.1590/s2175-902017000417298
37. Cansian, R.L.; Mossi, A.J.; Paroul, N.; Toniazzo, G.; Zboralski, F.; Prichoa, F.C.; Kubiak, G.B.; Lerin, L.A. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (VELL) Rowher). *PERSPECTIVA Erechim.* **2010**, *34*, 123–133.
38. Pereira, P.S. Lima, M.D.C.A.; Neto, P.P.M.; Oliveira-Tintino, C.D.M.; Tintino, S.R. Menezes, I.R.A.; de Oliveira, J.F.; Marchand, P.; Coutinho, H.D.M.; Rodrigues, M.D.D.; et al. Thiazolidinedione and thiazole derivatives potentiate norfloxacin activity against NorA efflux pump over expression in *Staphylococcus aureus* 1199B strains. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 3797–3804. doi: 10.1016 / j.bmc.2019.07.006
39. Tintino, S.R.; Oliveira-Tintino, C.D.; Campina, F.F.; Silva, R.L.; Costa, M.do.S.; Menezes, I.R.; Calixto-Júnior, J.T.; Siqueira-Junior, J.P.; Coutinho, H.D.M.; Leal-Balbino, T.C.; et al. Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Microbial. Pathogenesis* **2016**, *97*, 9–13. doi: 10.1016 / j.micpath.2016.04.003
40. Oliveira-Tintino, C.D.M.; Tintino, S.R.; Limaverde, P.W.; Figueredo, F.G.; Campina, F.F.; da Cunha, F.A.B.; da Costa, R.H.S.; Pereira, P.S.; Lima, L.F.; de Matos, Y.M.L.S.; et al. Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. *Food chem.* **2018**, *226*, 72–77. doi: 10.1016 / j.foodchem.2018.04.040
41. Tintino, S.R.; Oliveira-Tintino, C.D.M.; Campina, F.F.; Costa, M.D.S.; Menezes, I.R.A.; Matos, Y.M.L.S.; Calixto-Júnior, J.T.; Pereira, P.S.; Siqueira-Junior, J.P.; Leal-Balbino, T.C.; et al. Tannic acid affects the phenotype of *Staphylococcus aureus* resistant to tetracycline and erythromycin by inhibition of efflux pumps. *Bioorg. Chem.* **2017b**, *74*, 197–200. doi: 10.1016 / j.bioorg.2017.08.004
42. Costa, S.S.; Falcão, C.; Viveiros, H.; Machado, D.; Martins, H.; Melo, C.J.; Amaral, G. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* **2011**, *11*, 241. doi: 10.1186 / 1471-2180-11-241
43. Schindler, B.D.; Jacinto, P.; Kaatz, G.W. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. *Future. Microbiol.* **2013**, *8*, 491–507. doi: 10.2217 / fmb.13.16

44. Kaatz, G.W. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2003**, *47*, 719–726. doi: 10.1128 / AAC.47.2.719-726.2003
45. Sabatini, S.; Kaatz, G.W.; Rossolini, G.M.; Brandini, D.; Fravolini, A. From phenothiazine to 3-phenyl-1, 4-benzothiazine derivatives as inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA multidrug efflux pump. *J. med. Chem.* **2008**, *51*, 4321–4330. doi.org/10.1021/jm701623q
46. Alemão, N.; Wei, P.; Kaatz, G.W.; Kerns, R.J. Synthesis and evaluation of fluoroquinolone derivatives as substrate-based inhibitors of bacterial efflux pumps. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2453–2463. doi: 10.1016 / j.ejmech.2008.01.042
47. Wasicky, R. Uma modificação do aparelho de clevenger para extração de óleos essenciais. *Revista Faculdade de farmácia e Bioquímica, São Paulo* **1963**, *1*, 77–81.
48. Girard, E.A.; Koehler, H.S; Netto, S.P. Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (*pimenta pseudocaryophyllus (gomes) landrum*. *Ver. Acad. Curitiba.* **2007**, *5*, 147–165. doi: 10.7213/cienciaanimal.v5i2.9744
49. Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA; 2007.
50. 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)
51. Mann, C.M.; Markham, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J. Appl. Microb.* **1998**, *84*, 538–544. doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00379.x
52. Palomino, J.C.; Martin, A.; Camacho, H.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: 15imple and unexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2720–2722. doi: 10.1128 / AAC.46.8.2720-2722.2002
53. Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.; Lima, E.O.; Falcão-Silva, V.S.; Siqueira-Júnior, J.P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy* **2008**, *54*, 328–330. doi: 10.1159 / 000151267
54. Tintino, S.R.; Oliveira-Tintino, C.D.; Campina, F.F.; Costa, M.S.; Cruz, R.P.; Pereira, R.L.; Andrade, J.C.; Sousa, E.O.; Siqueira-Junior, J.P.; Coutinho, H.D.M.; et al. Cholesterol and ergosterol affect the activity of *Staphylococcus aureus* antibiotic efflux pumps. *Microbial. Pathogenesis* **2017a**, *104*, 133–136. doi: 10.1016 / j.micpath.2017.01.019
55. Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M. PROCHECK—a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.* **1993**, *26*, 283–291.
56. Wass, M.N., Kelley, L.A., & Sternberg, M.J. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic. acids res.* **2010**, *38*, W469–W473
57. 3D Structure Generator CORINA Classic. **2019**. 3D Structure Generator CORINA Classic. Nürnberg: Molecular Networks GmbH. Available at <http://www.mn-am.com> (accessed on 10 may2020)
58. O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461.
59. Onawole, A.T.; Kolapo, T.U.; Sulaiman, K.O.; Adegoke, R.O. Structure based virtual screening of the Ebola virus trimeric glycoprotein using consensus scoring. *Comput. Biol. chem.* **2018**, *72*, 170–180. doi: 10.1016 /

j.combiolchem.2017.11.006

60. Nissink, J.W.M. Simple size-independent measure of ligand efficiency. *J. chem. Inform. Model.* **2009**, *49*, 1617–1622. doi: 10.1021/ci900094m



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4. CAPÍTULO III - Potentiation of the antibiotic activity of gentamicin and erythromycin by the essential oil of *Ocotea odorifera* (VELL) ROWHER and safrole

Revista: Chemistry

Situação: Sob revisão

Article

Potentiation 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 Ferreira³, Beatriz Assunção Ferreira³, Pedro Ivo Palacio Leite¹, Ana Cristina Albuquerque da Silva⁴, Luiz Everson da Silva⁵, Wanderlei do Amaral⁵, Cícero Deschamps⁶, Henriques Douglas Melo Coutinho^{1*}

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.br ³ 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: 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* (E000) 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 against multidrug-resistant (MDR) bacteria. The E000 was extracted by hydrodistillation, and the phytochemical analysis was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The antibiotic-enhancing effect of the E000 and safrole against MDR strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was analyzed by the broth microdilution method. The chemical analysis confirmed the presence of safrole as a major component among the 16 compounds identified in the E000. Both the essential oil and the isolated compound showed clinically relevant antibacterial activities against *S. aureus*. Regarding the modulation of antibiotic resistance, the E000 was found to enhance the activity of erythromycin against the strains of *P. aeruginosa* and *S. aureus*, as well as improving the action of gentamicin against *S. aureus*. On the other hand, safrole potentiated the activity of gentamicin against the *S. aureus* strain alone. It is concluded, therefore, that the E000 and safrole can enhance the activity of macrolides and aminoglycosides, and as such are useful in the development of therapeutic tools to combat bacterial resistance against these classes of antibiotics.

Keywords: Macrolides. Aminoglycosides. Antibiotic resistance modulation. Safrole. *Ocotea odorifera*

1. Introduction

Brazil is known for its great biodiversity, accounting for about 20% of all plant species of the planet, many of which are used in folk medicine [1,2]. Essential oils are volatile substances synthesized by the plant secondary metabolism, composed mainly of monoterpenes, sesquiterpenes and phenylpropanoids [3]. Importantly, several studies have demonstrated that this class of compounds present anti-inflammatory, antitumor, antioxidant and antimicrobial properties [4-6].

Ocotea odorifera (Vell.) Rohwer (Lauraceae) is a species native to Brazil, where it is traditionally used to treat infected wounds². This species is phytochemically characterized by the presence of flavonoids such as kaempferol and quercetin, as well as for producing an essential oil containing safrole as a major component [7,8]. Safrole is a phenylpropanoid widely used in the production of fragrances and insecticides [9]. Previous research has demonstrated that both the essential oil of *O. odorifera* (EOOO) and safrole have antibacterial, antileishmania and insecticidal activities, justifying their use in drug development research [8,10-12].

Bacterial resistance is a global health problem with significant impact on mortality rates and health care costs [13]. Evidence has indicated that multi-drug resistant (MDR) bacterial strains can become increasingly virulent, hindering the treatment of several infections [14,15]. Bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* have been recognized as highly pathogenic microorganisms responsible for a significant number of serious infections [16-24]. Accordingly, the emergence of multidrug-resistant strains in these species has hampered the treatment with most conventional antibiotics and therefore, the development of new drugs capable of combating bacterial resistance has become a priority in the search for new antimicrobial agents.

Our group has recently demonstrated that the EOOO and safrole presents clinically relevant activity against *S. aureus* and that safrole modulates antibiotic resistance to quinolones in the *S. aureus* SA1119B and K2068 strains, possibly through direct inhibition of the NorA and MepA efflux pumps, respectively [25]. However, to date it is unknown if these products are capable of modulating antibacterial resistance to other classes of antibiotics.

Therefore, this study aimed to investigate the antibiotic-enhancing activity of the EOOO and safrole in association with macrolides against MDR bacterial strains.

2. Results

2.1. Chemical composition of the EOOO

Figure 1 shows the chromatogram corresponding to the phytochemical analysis (GC-MS) of the EOOO (please, see Almeida et al., 2020 for details)²⁵, which revealed the presence of safrole (77.9%) as a major component, in addition to α -pinene (0.3%), camphene (0.2%), β -pinene (0.1%), α -felandrene (1.9%), ortho-cymene (3.0%), 1.8-cineole (0.9%), camphor (0.4%), α -terpineol (0.3%), eugenol (0.6%), (E)-caryophyllene (0.4%), γ -muurolene (0.3%), δ -selinene (0.5%), bicyclogermagrene (1.1%), spatulenol (4.0%) and 11-selinene-4- α -ol.

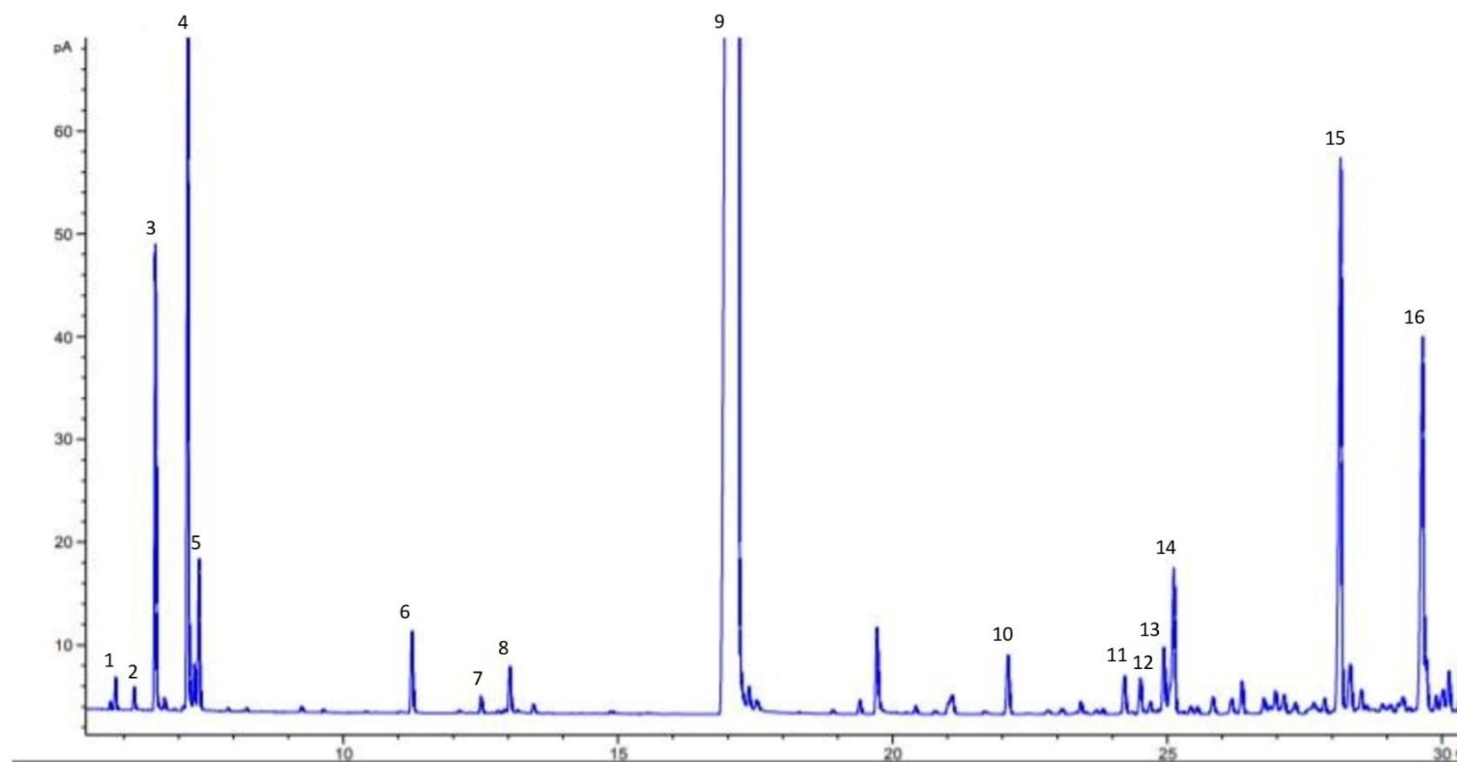


Figure 1. Chromatogram corresponding to the phytochemical analysis of the EOOO by GC-MS. 1= α -pinene; 2=camphene; 3= β -pinene ; 4= α -felandrene; 5=orto-cymene 6=1,8-cineole; 7=camphor; 8= α -terpineol; 9=safrole; 10= Eugenol; 11=(*E*)-caryophyllene; 12= γ -muurolene; 13= δ -selinene; 14=bicyclogermagrene; 15=spathulenol; 16=11-selinene-4- α -ol.

2.2. Antibiotic-enhancing activity of the EOOO

The antibacterial activity analysis of the EOOO found MIC values above 1,024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *P. aeruginosa* 24 and *E. coli* 06. On the other hand, the essential oil presented a MIC of 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *S. aureus* 10, indicating that the EOOO only has clinically relevant antibacterial activity against the Gram-positive strain. However, when a subinhibitory concentration of the essential oil was associated with conventional antibiotics to analyze the potentiating effect, synergistic effects were obtained with erythromycin against *S. aureus*, reducing the MIC of the modulation control (CM) from 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ when associated. The CM of the antibiotic erythromycin against the bacterium *P. aeruginosa* was 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and when associated with EOOO it decreased to 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The same occurred with gentamicin, which showed a MIC reduction from 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, against the *S. aureus* strain. Nevertheless, none of these antibiotics had the antibacterial activity against *E. coli* modulated by the essential oil.

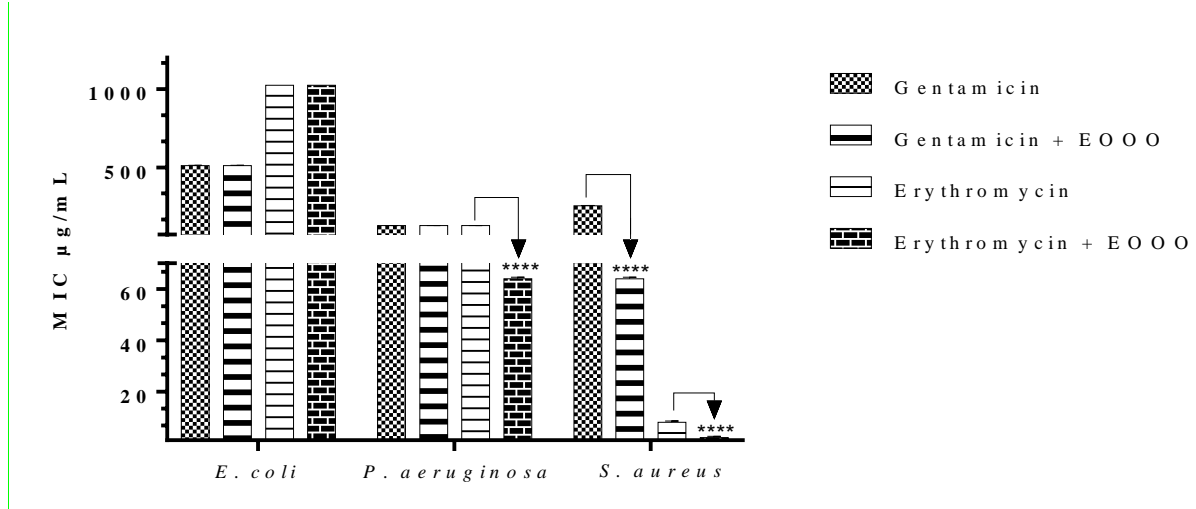


Figure 2. Modulation of antibiotic resistance by the EOOO in association with gentamicin or erythromycin against MDR *E. coli* 06, *S. aureus* 10 and *P. aeruginosa* 24. **** $p < 0.0001$ indicates significant differences between groups.

2.3. Effects of safrole on antibiotic resistance to gentamicin and erythromycin

The analysis of the antibacterial activity of safrole found the same MIC values as those obtained for EOOO against all bacterial strains. However, the compound alone did not affect the antibacterial activity of antibiotics against none of the Gram-negative strains. On the other hand, the combination of safrole with gentamicin resulted in a significant reduction in the MIC from 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *S. aureus*, indicating potentiation of antibacterial activity (modulation of resistance to gentamicin).

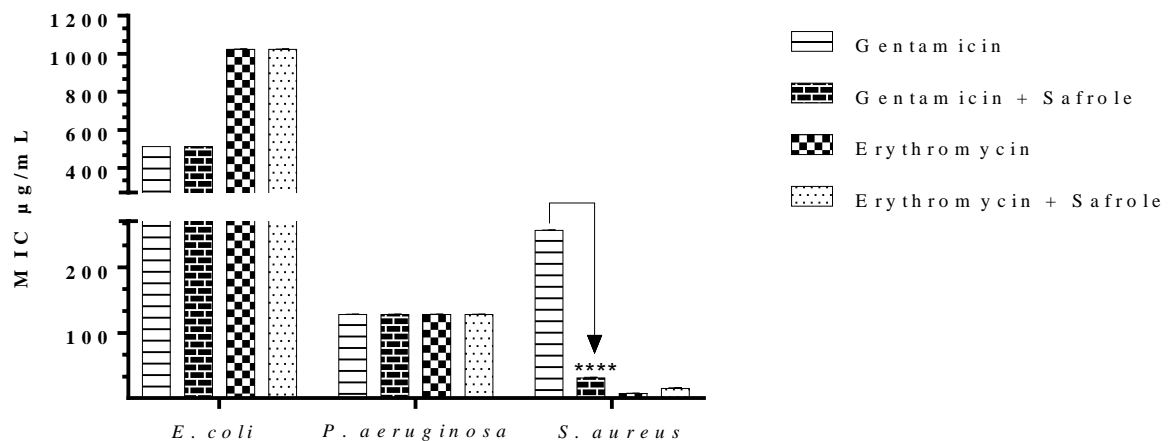


Figure 3. Modulation of antibiotic resistance by safrole in association with gentamicin or erythromycin against MDR *E. coli* 06, *S. aureus* 10 and *P. aeruginosa* 24. **** $p < 0.0001$ indicates significant differences between groups.

3. Discussion

Evidence demonstrates that essential oils represent an important source of active ingredients with the potential to combat bacterial resistance [26-28]. In this context, the chemical composition of these substances was shown to directly influence their pharmacological properties. Importantly, essential oils obtained from the same species, under different conditions of collection and extraction, can undergo significant variation concerning their major components, as demonstrated by analyzes using gas chromatography coupled with mass spectrometry, one of the main methods used in phytochemical analyses [29-32].

The present work evaluated the effects of the *Ocotea odorifera* essential oil on the modulation of bacterial resistance to gentamicin and erythromycin. As in a recent analysis (Almeida et al., 2020)²⁵, we found safrole as the major component of this oil, the activity of this compound was also evaluated. A similar chemical profile was reported by Mossi et al (2013)³³ and Alcoba et al., (2018)³⁴. The later study identified safrole (36.3%), γ -cadinene (6.6%), camphor (6.5%), and α -copaene (6.0%) as major components in the essential oil of *Ocotea odorifera*. However, a study using gas chromatography coupled to a mass spectrometer with a selective detector found significant differences in the composition of an essential oil obtained from the same species, which consisted mostly of methyl-eugenol (81.2%), followed by safrole (10.6%) [35].

The antibacterial analysis revealed that both the EOOO and safrole showed clinically relevant activity only against the Gram-positive strain, although a different phenomenon was observed in the antibiotic resistance modulation tests. Betim and colleagues (2019)³⁶ compared the antibacterial activity of the essential oils obtained from *Ocotea odorifera* and *Ocotea nutans* and concluded that the former was more effective than the later against strains of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli*. Besides, this oil was more effective against the Gram-positive strain, corroborating the data obtained in the present study. Accordingly, Leporatti et al (2014)³⁷ demonstrated that the essential oil of *Ocotea puchury-major* exerted clinically relevant activity against *S. aureus*, while no significant activity was verified against *P. aeruginosa* and *E. coli*. On the other hand, the essential oil of *Ocotea bicolor* presented MIC values greater than 1000 $\mu\text{g/mL}$ against each of the strains evaluated in this study (Damasceno et al., 2017)³⁸, indicating a variation in the pharmacological effect between species of the same genus. Interestingly, Cansian et al (2010)³⁹ demonstrated that the EOOO showed more potent antibacterial activity against Gram-negative strains, which may have occurred due to differences in the chemical composition of the oil as a consequence of seasonal variation.

Considering the evidence that *O. odorifera* components could modulate antibacterial resistance *in vitro* (Almeida et al., 2020)²⁵, this study evaluated the antibiotic-enhancing activities of the EOOO and safrole against MDR strains treated with standard aminoglycoside (gentamicin) and macrolide (erythromycin) antibiotics. A subinhibitory concentration of the essential oil (MIC \div 8) was found to significantly potentiate the erythromycin against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, as well as the activity of gentamicin against the Gram-positive strain. On the other hand, the isolated compound was shown to enhance the activity of gentamicin against *S. aureus*. However, neither the EOOO nor safrole modulated the activity of the antibiotics tested against *E. coli*. Together, these findings indicate that these compounds differentially modulate antibiotic resistance in MDR strains, suggesting that other constituents of the EOOO might influence its antibiotic-enhancing properties.

While safrole presented little antibiotic-enhancing effect in most conditions analyzed by the present study, it was found to potentiate the activity of norfloxacin against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* (Almeida et al., 2020)²⁵. Thus, further research is required to determine the spectrum of action of this compound as a modulator of antibiotic resistance. The modulation of antibiotic resistance by a given compound is highly influenced by its chemical structure, as well as by the three-dimensional arrangement of the atoms in the molecule. Studies indicate that Gram-positive bacteria are more susceptible to the action of essential oils since their less complex cell wall structure compared to that of Gram-negative bacteria

(Rios and Recio 2005; Cos et al., 2006)[40,41] favors the penetration of chemical constituents that can cause ruptures in the cell membrane [42].

Since gentamicin and erythromycin have intracellular action, the potential action of essential oil components on the bacterial membrane could increase the antibacterial activity of these drugs. With regard to the mechanism of action, both antibiotics act as protein synthesis inhibitors by binding the 30S and 50 S ribosomal subunits, respectively [43].

Studies have shown that resistance to these antibiotics in MDR strains of *S. aureus* and *P. aeruginosa* is significantly associated with the expression of efflux pumps [44,45]. Thus, based on evidence obtained from previous work by our group (Almeida et al., 2020)²⁵, it is suggested that EOOO and safrole may be modulating antibacterial resistance to these antibiotics, at least in part, by directly interfering with drug extrusion mechanisms in these strains.

4. Materials and Methods

4.1. Collection, extraction and analysis of the botanical material

The botanical material was collected, identified, extracted, and analyzed as described by Almeida and collaborators (2020)²⁵. Briefly, the essential oil was extracted from terminal branches and inflorescences of plants collected in a segment of Atlantic Forest in the State of Paraná, Southern Brazil (coordinates: S 25° 19.862' W 49° 48.338'). A voucher specimen was prepared and registered at the Herbarium of "Faculdades Integradas Espirita" (HFIE) (registry number 9.000). Terminal branches and inflorescences were randomly collected from at least 10 individual plants and dried with an electric dryer (Gama Italy IQ perfetto 127V) at 40 °C for 24 h.

The extraction was carried out by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus using 500 g of dry leaves in 1L of distilled water at boiling temperature for 2 h. After extracting the essential oil, it was combined with anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄) and stored under refrigeration (-4 °C). The chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-EM) and compounds were identified by comparing their mass spectra with the standards reported in the literature. The separation of the constituents was obtained in a capillary column HP-5MS (5% -phenyl-95% -dimethylpolysiloxane, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) and using helium as the carrier gas (1.0 mL min⁻¹).



Figure 4: Sample of the plant *Ocotea odorifera*

4.2. Bacterial cultures

The origin and resistance profile of the bacterial strains used in the present study (Bezerra et al., 2017)⁴⁶ is shown in table 1.

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, Azi, Cefa Cef, Cf, Cip, Cla, Clin, Ery, Lev, Mox, Oxa, Pen
<i>E. coli</i> 06	Urine	Asb, Cefa, Cef, Cfo, Cpm, Ctx
<i>P. aeruginosa</i> 24	Nasal discharge	Ami, Cip, Ctz, Imi, Lev, Mer, Ptz

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

All strains were kept on blood agar (Laboratorios Difco Ltda., Brazil) and maintained in Heart Infusion Agar (HIA, Laboratorios Difco Ltda., Brazil) medium 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. The antibiotics erythromycin and gentamicin were obtained from SIGMA Chemical Co. (St. Louis, USA). The EOOO, safrole and both antibiotics were dissolved in DMSO (10 mg/mL) and diluted in distilled water to 1024 µg/mL.

4.3. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined in sterile 96-well microplates by serial dilution. Each bacterial inoculum was prepared by transferring a sample of the bacterial culture to BHI broth, followed by incubation at 37 °C for 24 h. After this period, a 1:10 solution was prepared in test tubes, by adding 100 µL of inoculum and 900 µL of the BHI medium. A total of 100 µL of this solution was transferred to each well of the plate. Then, each well was added with 100 µL of the corresponding treatment serially diluted (1:2) at concentrations ranging from 1024 to 1 µg/mL Positive controls (medium + inoculum) were added in the last well of the plate. The plates were incubated at 35 ± 2 °C for 24 h. All tests were performed in triplicates for greater confidence in the results [47].

Following incubation, each well was added with 20µL of an aqueous solution of sodium resazurin (0.01% w/v, SIGMA, USA) and 1 h later, bacterial growth observed by the change of color from blue to pink due to the reduction resazurin [48,49]. The MIC was defined as the lowest concentration capable of inhibiting bacterial growth.

4.4. Analysis of antibiotic resistance modulation

The analysis of antibiotic resistance modulation was performed by assessing the MICs of gentamicin and erythromycin (aminoglycoside and macrolide, respectively) against *P. aeruginosa* 24, *E. coli* 06 and *S. aureus* 10 were determined in the presence or absence of these natural products at concentrations equivalent to their MIC÷8 (subinhibitory concentration). A reduction in the antibiotic MIC was interpreted as enhanced antibiotic activity (antibiotic resistance modulation) [50]. All tests were performed in triplicate for greater confidence in the results.

4.5. Statistical analysis

Data are expressed as arithmetic means \pm standard error of the mean and were analyzed by analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's post-test. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

5. Conclusions

In conclusion, this study brought new evidence with regard to the action of EOOO and its major compound safrole as modulators of bacterial resistance against MDR strains. EOOO showed a synergistic effect with Erythromycin against the strain of *P. aereginosa* and *S. aureus*. However, it had no significant effect against *E. coli*. Gentamicin associated with EOOO showed activity only against *S. aureus*. Safrole associated with gentamicin showed potentiating activity against *S. aureus*. The differential action observed in the tests with the EOOO and the isolated compound strongly suggests that other compounds present in the essential oil could be contributing to its antibiotic-enhancing properties and therefore, future research using isolated components of this species can bring important contributions in the development of new molecules useful in the combat of bacterial resistance.

Author Contributions: **Author Contributions:** Conceptualization, R.S.A.; methodology, R.S.A., A.C.J.A. and P.R.F.; project administration, M.I. and H.D.M.C.; software, R.S.A.; conceptualization, E.L.S. and S.R.T.; formal analysis, T.F.M. B.A.F and V.A.F.; investigation, J.R.F., A.C.A.S. and L.E.S.; writing—original draft preparation, W.d.A. and C.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors would like to thank Regional University of Cariri

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

References

1. Sartoratto A.; Machado, A.L.M.; Delarmelina, C.; Figueira, G.M.; Duarte, M.C.T.; Rehder, V.L.G. Composição e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas utilizadas no Brasil. *Rev Bras Microbiol.* **2004**, *4*, 275-280.
2. Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, Plantarum, 2002.
3. Franz CM. Essential oil research: past, present and future. *Flavour Frag J.* **2010**, *25*, 112-113.
4. Salas-Oropeza, J.; Jimenez-Estrada, M.; Perez-Torres, A.; Castell-Rodriguez, A.E.; Becerril-Millan, R.; Rodriguez-Monroy, M.A.; Canales-Martinez, M.M. Wound Healing Activity of the Essential Oil of *Bursera morelensis*, in Mice. *Molecules*, **2020**, *25*, 8.
5. Poma, P.; Labbozzetta, M. Notarbartolo, M.; Bruno, M.; Maggio, A.; Rosselli, S.; Sajeve, M.; Zito, P. Chemical composition, in vitro antitumor and pro-oxidant activities of *Glandora rosmarinifolia* (Boraginaceae) essential oil. *Molecules*. **2018**, *13*, 5.
6. Pandini, J.A.; Pinto, F.G.S.; Scur, M.C.; Santana, C.B.; Costa, W.F.; Temponi, L.G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of the essential oil of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Braz J Biol.* **2017**, *1*, 53-60.
7. Lordello, A.L.L.; Cavaleiro, A.J.; Yoshida, M.; Gottlieb, O.R. Phenylpropanoids, sterols and sesquiterpene from wood of *Ocotea odorifera* Lauraceae. *Revista Latinoamericana de Química.* **2000**, *1*, 35-39.
8. Alcoba, A.E.T.; Melo, D.C.; Andrade, P.M.; Dias, H.J.; Pagotti, M.C.; Magalhães, L.G.; Júnior, W.G.F.; Crotti, A.E.M.; Miranda, M.L.D. Chemical composition and in vitro antileishmanial and cytotoxic activities of the essential oils of *Ocotea dispersa* (Nees) Mez and *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer (Lauraceae). *Nat Prod Res.* **2018**, *23*, 2865-2868.
9. Costa, P.R.R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. *Química Nova.* **2000**, *23*, 357-360.
10. Khayyat, A.S.; Al-Zahrani, S.H. Thermal, photosynthesis and antibacterial studies of bioactive safrole derivative as precursor for natural flavor and fragrance. *Arab J Chem.* **2014**, *7*, 800-804.
11. Barbosa, Q.P.S.; Câmara, C.A.G.; Ramos, C.S.; Nascimento, D.C.O.; Lima-Filho, J.V.; Guimarães, E.F. Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. *Quím Nova.* **2012**, 35.
12. Mossi, A.J.; Zanella, C.A.; Kubiak, G.; Lerin, L.A.; Cansian, R.L.; Frandoloso, F.S.; Dal-Prá, V.; Mazutti, M.A.; Costa, J.A.V.; Treichel, H. Essential oil of *Ocotea odorifera*: an alternative against *Sitophilus zeamais*. *Renew Agr Food Syst.* **2013**, *2*, 161-166.
13. Boucher, H.W.; Talbot, G.H.; Bradley, J.S. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis.* **2009**, *48*, 1-12.
14. Nathan, C.; Cars, O. Antibiotic resistance — problems, progress, and prospects. *N Engl J Med.* **2014**, *371*, 1761-1763.
15. Prabhavathi, F. Antibacterial discovery and development—the failure of success? *Nat Biotechnol.* **2006**, *24*, 1497-1503.
16. Foster, T.J.; Geoghegan, J.A.; Ganesh, V.K.; Höök, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Ver Microbiol.* **2014**, *12*, 49-62.
17. Klevens, R.M. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA.* **2007**, *298*, 1763.
18. Liu, S.J.; Ueng, S.W.; Chan, E.C. *In vitro* elution of vancomycin from biodegradable beads. *J Biomed Mater Res.* **1999**, *48*, 613-620.
19. Domínguez, E.; Zarazaga, M.; Sáenz, Y.; Briñas, L.; Torres, C. Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from healthy children in Spain. *Microb Drug Resist.* **2002**, *4*, 321-327.
20. Pop-Vicas, A.; Opal, S.M. The clinical impact of multidrug-resistant gram-negative bacilli in the management of septic shock. *Virulence.* **2014**, *1*, 206-212.
21. De LaCruz, V.C.; Mamani, N.V.; Gonzales, T.H.; Chanca, R.P.; Lizana, E.H.; Peña, J.L.H. Resistencia antibiótica de *Salmonella sp*, *Escherichia coli* aisladas de alpacas (*Vicugna pacus*) con y sin diarrea. *LA GRANJA: Revista de Ciencias de la Vida.* **2020**, *1*, 98-109.
22. Luna, R.A.; Millecker, L.A.; Webb, C.R.; Mason, S.K.; Whaley, E.M.; Starke, J.R.; Hiatt, P.W.; Versalovic, J. Molecular epidemiological Surveillance of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Pediatric Population of Patients with Cystic Fibrosis and Determination of Risk factors for Infection with the Houston-1 Strain. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *4*, 1237-1240.

23. Morita, Y.; Tomida, J.; Kawamura, Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol.* **2014**, *4*, 422.
24. Reinhart, A.A.; Oglesby-Sherrouse, A.G. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Distinct Iron Sources. *Genes (Basel).* **2016**, *12*, 126.
25. Almeida, R. A.; Freitas, P.R.; Araujo, A.C.J.; Menezes, I.R.A.; Santos, E.L.; Tintino, S.R.; Moura, T.F.; Ribeiro-Filho, J.; Ferreira, V.A.; Silva, A.C.A.; Silva, L.E.; Amaral, W., 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.* **2020**, *9*, 247. doi:10.3390/antibiotics9050247.
26. FALEIRO, M.L. et al. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology.* **2003**, *29*, 130-135.
27. SHIN, S.; PYUN, M. Anti-Candida effects of estragole in 208 Rev. Bras. Pl. Med. **2011**, *13*, 2, 203-208.
28. Priscilla, R. F.; Ana Carolina, I. A.; Cristina, R. S. B.; Débora, F. M.; Silva, A. C. A.; Rocha, J. E.; Oliveira-Tintino, C. D. M.; Ribeiro-Filho, J.; Silva, L. E.; Camila Confortin, C. et al. GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. And α -pinene. *Industrial Crops & Products.* **2020**, 145. DOI.org/10.1016/j.indcrop.2020.112106
29. Silva, J.K.; Trindade, R.; Moreira, E.C.; Maia, J.G.S.; Dosoky, N.S.; Miller, R.S.; Cseke, L.J.; Setzer, W.N. Chemical diversity, biological activity, and genetic aspects of three *Ocotea* species from the amazona. *International journal of molecular sciences.* **2017**, *18*, 1081. doi:10.3390/ijms18051081
30. Bahmani, M.; Schmidt, O. Plant essential oils for environment-friendly protection of wood objects against fungi. *Maderas. Ciencia y tecnologia.* **2018**, *20*, 325 – 332. DOI.org/10.4067/S0718-221 × 201800500330
31. Souza, L. M.; Fonseca, F. S. A.; Silva, J. C. R. L.; Silva, A. M.; Silva, J. R.; Martins, E. R. Essential oil composition in natural population of *Lippia organoides* (Verbenaceae) during dry and rainy seasons. *Revista de Biologia Tropical.* **2019**, *67*, 278-285. doi.org/10.15517/rbt.v67i1.31407
32. Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food. *Química Nova.* **2008**, *31*, 3, 623-636.
33. Mossi, J. A.; Zanella, C. A.; Kubiak, G. B.; Lerin, L. A.; Cansian, R. L.; Frandoloso, F. S.; Prá, V. D.; Mazutti, M. A.; Costa, J. A. V.; Treichel, H. Essential oil of *Ocotea odorifera*: An alternative against *Sitophilus zeamais*. *Renewable Agriculture and Food Systems.* **2014**, 1-6. DOI:10.1017/S1742170513000045
34. Alcoba, A. E.T.; Melo, D. C.; Andrade, P. M.; Dias, H. J.; Pagotti, M. C.; Magalhães, L. L.; Júnior, W. G. F.; Crotti, A. E. M.; Miranda, M. L. D. Chemical Composition and *in vitro* Antileishmanial and Cytotoxic Activities of the Essential Oils of *Ocotea dispersa* (Nees) Mez and *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer (Lauraceae). *Natural Product Research.* **2018**, *32*, 23, 2865-2868. 10.1080/14786419.2017.1385007
35. Lima, R. K.; Cardoso, M. G.; Moraes, J. C.; Carvalho, S. M. Melo, B. A.; Vieira, S. S. Chemical composition and toxicity of essential oils to the green-aphid *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852). *Arq. Inst. Biol.* **2014**, *81*, 1, 22-29. doi.org/10.1590/S1808-16572014000100005
36. Betim, F. C. M.; Souza, A. M.; Szabo, E. M.; Zanin, S. M. W.; Miguel, O. G.; Miguel, M. D.; Dias, J. F. G. *Ocotea nutans* (Nees) Mez (LAURACEAE): Chemical composition, antioxidante capacity and biological properties of essential oil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* **2019**, *55*, 1-10. DOI.org/10.1590/s2175-97902019000118284
37. Leporatti, M.C.; Pintore, G.; Foddai, M.; Chessa, M.; Piana, A.; Petretto, G.L.; Masia, M.D.; Mangano, G.; Nicoletti, M. Chemical, biological, morphoanatomical and antimicrobial study of *Ocotea puchury*-major Mart. *Natural product research.* **2014**, *28*, 5, 294-300. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2013.858338>
38. Damascemo, C. S. B.; de Oliveira, L. F.; Szabo, E. M.; Souza, A. M.; Dias, J. F. G.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G. Chemical composition, antioxidant and biological activity of *Ocotea odorifera* Vattimo-Gil (LAURACEAE) essential oil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* **2017**, *53*, 4, 1-8. DOI.org/10.1590/s2175-902017000417298
39. Cansian, R. L.; Mossi, A. J.; Paroul, N.; Toniazzo, G.; Zboralski, F.; Prichoa, F. C.; Kubiak, G. B.; Lerin, L. A. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (VELL) Rowher). *PERSPECTIVA, Erechim.* **2010**, *34*, 127, 123-133.
40. Rios, J.L.; Recio, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 2005, *100*, 80–84
41. Cos, P.; Vlietinck, A.J.; Berghe, D.V.; Maes L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol.* **2006**, *106*, 290–302.

42. Dahham, S.; Tabana, Y.; Iqbal, M.; Ahamed, M.; Ezzat, M.; Majid, A.; Majid, A. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*. **2015**, *20*, 11808–11829.
43. Guimarães, D.O.; Momesso, L.S.; Pupo, M.T. Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents. *Química nova*. **2010**, *33*, 3, 667-679.
44. Guimarães, G.; França, C.A.; Krug, F.S.; Peixoto, R.M.; Krewer, C.C.; Lazzari, A.M.; Costa, M.M. Phenotypic characterization, bio_ilm production and antimicrobial resistance of *Staphylococcus spp.* Isolates from cattle and buffaloes mastites. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. **2012**, *32*, 12, 1219-1224.
45. Caneiras, C.; Marcos, C.; Ferreira, T.; Hanscheid, T.; Melo-Cristino, J.; Duarte, A. *Pseudomonas aeruginosa* efflux pumps clinical relevance on therapy. *RPDI*. **2010**, *6*, 2, 66-71.
46. Bezerra, C.M.; Camilo, C.J.; Silva, M.K.N.; Freitas, T.S.; Ribeiro-Filho, J.; Coutinho, H.D.M. Vanillin selectively modulates the action of antibiotics against resistant bacteria. *Microbial Pathogenesis*. **2017**, *113*, 265-268. doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.052
47. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; TwentyThird Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, **2013**.
48. Mann, C.M.; Markham, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*. **1998**, *84*, 538- 544. [DOI.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00379.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00379.x)
49. Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, H.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: imple and unexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2002**, *46*, 2720-2722. DOI: 10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002
50. Coutinho, H. D. M.; Costa, J. G.; Lima, E. O.; Falcão-Silva, V. S.; Siqueira-Júnior, J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*. **2008**, *54*, 4, 328-330. DOI: 10.1159/000151267



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5. CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.2 Conclusões gerais

Em conclusão, este estudo trouxe novas evidências no que diz respeito à ação do EOOO e seu principal composto safrol. Tanto o EOOO como o safrol, apresentou atividade direta sobre a cepa de *S. aureus*, porém não apresentou o mesmo para as cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*. Também foi possível verificar os efeitos como moduladores da resistência bacteriana contra cepas MDR.

A norfloxacinina teve seu efeito potencializado com todas as cepas testadas tanto com o EOOO como também o composto majoritário safrol. EOOO mostrou um efeito sinérgico com Eritromicina contra a cepa de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. No entanto, não teve efeito significativo contra *E. coli*. A gentamicina associada ao EOOO e também ao safrol mostrou atividade apenas contra *S. aureus*. A ação diferencial observada nos testes com o EOOO e o composto isolado sugere fortemente que outros compostos presentes no óleo essencial podem estar contribuindo para suas propriedades potencializadoras de antibióticos e, portanto, pesquisas futuras utilizando componentes isolados desta espécie podem trazer contribuições importantes no desenvolvimento de novas moléculas úteis no combate à resistência bacteriana.

Safrol potencializa a resistência aos antibióticos nas cepas *S. aureus* SA1119B e K2068, possivelmente por meio da inibição direta das bombas de efluxo NorA e MepA, respectivamente. Por fim, o OEOO e seu composto majoritário safrol apresentam propriedades antibacterianas e potencializadoras de antibióticos promissoras, que devem ser exploradas no desenvolvimento de drogas para combater a resistência antibacteriana, especialmente em cepas portadoras de genes que codificam proteínas de efluxo.

5.3 Perspectivas de investigações futuras

As investigações futuras serão realizadas na área de biologia molecular e modificação química do safrol. É esperado a avaliação da atuação do safrol na parede celular bacteriana e verificada através do microscópio eletrônico de varredura (MEV), além de avaliação da expressão gênica e como safrol atua nesse mecanismo. Será verificado também o comportamento do *Cis*-safrol e o *trans*-safrol em bombas de efluxos de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. As modificações químicas do safrol também será utilizada para avaliação de interferência nos mecanismos de resistência bacteriana e também o seu efeito potencializador de antibióticos utilizados na clínica dos quais os microrganismos citados acima são resistentes.