



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



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
MODIFICADORA DA AÇÃO ANTIBIÓTICA DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton ceanothifolius* Baill,
Mikania cordifolia (L.f.) Willd E DO COMPOSTO
LIMONENO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANA CAROLINA JUSTINO DE ARAÚJO

CRATO – CE

2020

ANA CAROLINA JUSTINO DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODIFICADORA DA AÇÃO
ANTIBIÓTICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton ceanothifolius* Baill, *Mikania
cordifolia* (L.f.) Willd E DO COMPOSTO LIMONENO**

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

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Orientador

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino

Coorientador

CRATO - CE

2020

Araújo, Ana Carolina Justino de.
A658a Avaliação da atividade antibacteriana e modificadora da ação antibiótica dos óleos essenciais de *Croton ceanothifolius* Baill, *Mikania cordifolia* (L.) Willd e do composto limoneno/ Ana Carolina Justino de Araújo. – Crato-CE, 2020
58p.; il.

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

1. Antimicrobiano, 2. Asteraceae, 3. Euphorbiaceae, 4. Limoneno, 5. Sinergismo; I. Título.

CDD: 615.32

ANA CAROLINA JUSTINO DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODIFICADORA DA AÇÃO
ANTIBIÓTICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton ceanothifolius* Baill, *Mikania
cordifolia* (L.f.) Willd E DO COMPOSTO LIMONENO**

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

Aprovada em: ____/____/____

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

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

Profa. Dra. Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues - UNILEÃO
(Avaliadora interna - Suplente)

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa - URCA
(Avaliador externo - Suplente)

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

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

CRATO - CE
2020

*“A persistência é o caminho do êxito”
Charles Chaplin*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me conceder força e determinação em todos os momentos.

Aos meus pais, Ronaldo e Zenilda, exemplos de verdadeiro amor, agradeço por todo o afeto, carinho, dedicação e por me ensinarem a procurar sempre ser uma pessoa justa.

A minha irmã Maria Luiza, pelo carinho e amor, por me ensinar que por mais difícil que possa parecer temos que persistir e por me ajudar a ingressar nessa jornada. Amo você.

A minha colega de mestrado Priscilla Ramos, por me aturar durante toda essa jornada, e através do seu jeito meigo e doce de ser conseguiu trazer mais luz e alegria aos dias mais difíceis.

A todos amigos que não fazem parte do ambiente acadêmico, mas que sempre ouviram minhas reclamações e me ajudaram a persistir, em especial, Rakel Olinda, Maria Karollyna e Dayane Aquino.

A todos meus companheiros de testes, Cristina (poderosa chefinha em acessão), Débora (carinha de anjo), Janaína (musa do fluxo), Neto (Coxinha) e Milene (Doquinha). Sem vocês eu não teria conseguido terminar esses experimentos.

A todos os colegas de laboratório. No LMBM somos família, então agradeço pelo acolhimento que recebi. Aqueles que já se despediram e aos que continuam diariamente na labuta.

Aos meus orientadores, Professor Dr. Henrique Douglas e Professor Dr. Saulo Relison por todos os ensinamentos compartilhados até o momento.

As instituições de fomento CAPES, FUNCAPE e CNPQ pela contribuição financeira na realização dos experimentos.

Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.2 <i>Echerichia coli</i>	14
2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.4 Gênero <i>Mikania</i>	18
2.5 Gênero <i>Croton</i>	18
2.6 Óleos essenciais.....	19
2.7 Biodiversidade	18
3 PROCEDIMENTO E RESULTADOS.....	23
Capítulo I: Caracterização e atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>Mikania cordifolia</i> e limoneno frente a cepas MDR	23
1. Introduction	23
2. Methodology.....	25
2.1. <i>Plant Material</i>	25
2.3. <i>Bacterial strains</i>	26
2.4. <i>Preparation of the essential oil and Limonene</i>	27
2.5. <i>Statistical Analysis</i>	28
3. Results and discussion	28
3.1. <i>Chemical profile of the Mikania cordifolia essential oil</i>	29
3.2. <i>Antibacterial Activity of the Mikania cordifolia essential oil and Limonene</i>	31
3.3. <i>Antibiotic-modulating effect of the Mikania cordifolia essential oil</i>	32
3.4. <i>Antibiotic-modulating effect of limonene</i>	33
4. Conclusion	34

References.....	35
Capítulo II: Essential oil of <i>Croton ceanothifolius</i> Baill Potentiates the Effect of Antibiotics Against Multiresistant Bacteria	39
1. Introduction.....	40
2. Results and Discussion	41
3. Materials and Methods	43
3.1. Plant Material.....	43
3.2. Essential Oil Extraction and Analysis.....	44
3.3. Bacterial Strains.....	44
3.4. Preparation of the Essential Oil Solution	45
3.6. Evaluation of the Antibiotic-modulating activity.....	45
3.7. Statistical analysis.....	46
4. Conclusions	46
References	47
5 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
Figura 1: Folhas de <i>Mikania cordifolia</i> se enroscando em tronco de árvore.	18
Figura 2: Ramos terminais e flores de <i>Croton ceanothifolius</i> Baill.	20
3 PROCEDIMENTO E RESULTADOS.....	22
Capítulo I: Caracterização e atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>Mikania cordifolia</i> e limoneno frente a cepas MDR	22
Table 1: Chemical compounds identified in the essential oil of <i>Mikania cordifolia</i> by GC-MS-FID.....	28
Figure 1: Chemical structure of the major compounds found in the EOMc	29
Figure 2: GC-MS Chromatogram of the Essential Oil of <i>Mikania cordifolia</i> (EOMc)	29
Figure 3: Antibiotic-modulating effect of the <i>Mikania cordifolia</i> essential oil (EOMc) against multiresistant bacteria. **** statistically significant value, $p < 0.0001$	31
Figure 4: Antibiotic-modulating effect of limonene against multiresistant bacteria. **** statistically significant value, $p < 0.0001$	32
Capítulo II: Essential oil of <i>Croton ceanothifolius</i> Baill Potentiates the Effect of Antibiotics Against Multiresistant Bacteria	38
Table 1. Chemical constituents identified in the <i>Croton ceanothifolius</i> essential oil.	40
Figure 1. Antibiotic-Modulating effect of <i>Croton ceanothifolius</i> (CcEO) essential oil against multidrug resistant bacteria. *** Statistical Significance $p < 0.0001$	41
Table 2. Resistant profile of the Strains	43

RESUMO

A resistência bacteriana é um problema crescente e muitas vezes devido ao uso errôneo de fármacos antibacterianos. Bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* são consideradas oportunistas pois por declínios do sistema imunológico do hospedeiro, ou até mesmo por uma mudança do local de colonização podem causar doenças. Frequentemente encontradas em ambiente hospitalar e devido a exposição a vários fármacos, são bactérias que facilmente desenvolvem resistência a antibióticos. A utilização de plantas medicinais é uma prática antiga que procura restabelecer a saúde, podendo ser a solução para problemas como a resistência bacteriana. Os gêneros *Mikania* e *Croton* têm espécies que possuem atividade antibacteriana comprovada, porém para *Mikania cordifolia* e *Croton ceanothifolius* não existem relatos de estudos de tal atividade, tornando esse o primeiro registro. Como parte de um projeto para avaliação de bioatividades e composição química de plantas do sul do país, o objetivo do presente estudo foi identificar o perfil químico e potencial modificador da ação antibiótica de *Mikania cordifolia*, *Croton ceanothifolius* e limoneno frente a bactérias multirresistentes. Os óleos essenciais foram obtidos por meio de hidrodestilação e caracterização química realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e os resultados obtidos foram comparados com a literatura. Tanto a avaliação antibacteriana direta, quanto os ensaios associados com antibióticos foram realizados pela metodologia de microdiluição em placa. Os óleos essenciais, o limoneno e os antibióticos, norfloxacino, gentamicina e penicilina, foram diluídos para permanecer em concentração de 1024 µg/mL. Na avaliação química foram identificados limoneno (19,2%) e biciclogermacreno (26,3%) como compostos majoritários de *Mikania cordifolia* e *Croton ceanothifolius*, respectivamente. Quando avaliados isoladamente, os óleos essenciais e o limoneno não apresentaram atividade antibacteriana clinicamente relevante com CIM \geq 1024 µg/mL. Associado aos antibióticos, os compostos demonstraram, em alguns casos, efeitos sinérgicos principalmente com norfloxacino e gentamicina contra bactérias Gram-negativas. Frente a *Escherichia coli* os óleos reverteram o perfil de resistência, de 64 µg/mL para 1 µg/mL com OEMc e 8 µg/mL OECc bactéria quando combinados a norfloxacino. Frente a *Staphylococcus aureus* a CIM de gentamicina passou de 128 µg/mL para aproximadamente 3 µg/mL quando associada ao limoneno, alterando assim seu perfil de resistência. Diante disso, o estudo dessas espécies e limoneno revela seu potencial modificador da ação antibiótica pois reverteu o perfil de resistência a dois antibióticos e desperta o olhar científico para novos estudos de atividades biológicas e o mecanismo pelo qual essas atividades são desempenhadas.

Palavras-Chave: Antimicrobiano. Asteraceae. Euphorbiaceae. Limoneno. Sinergismo.

ABSTRACT

Bacterial resistance is a growing problem and often due to the misuse of antibacterial drugs. Bacteria such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* are considered opportunistic because of declines in the host's immune system, or even a change in the colonization site can cause disease. Often found in a hospital environment and due to exposure to various drugs, they are bacteria that easily develop resistance to antibiotics. The use of medicinal plants is an old practice that seeks to restore health, and may be the solution to problems such as bacterial resistance. The genera *Mikania* and *Croton* have species that have proven antibacterial activity, however for *Mikania cordifolia* and *Croton ceanothifolius* there are no reports of studies of such activity, making this the first record. As part of a project to evaluate bioactivities and chemical composition of plants in the south of the country, the objective of the present study was to identify the chemical profile and potential modifier of the antibiotic action of *Mikania cordifolia*, *Croton ceanothifolius* and limonene against multidrug-resistant bacteria. Essential oils were obtained by means of hydrodistillation and chemical characterization performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry and the results obtained were compared with the literature. Both direct antibacterial assessment and assays associated with antibiotics were performed using the microdilution plate methodology. The essential oils, limonene and antibiotics, norfloxacin, gentamicin and penicillin, were diluted to remain at a concentration of 1024 µg/mL. In the chemical evaluation, limonene (19.2%) and bicyclogermacrene (26.3%) were identified as major compounds of *Mikania cordifolia* and *Croton ceanothifolius*, respectively. When evaluated separately, essential oils and limonene did not show clinically relevant antibacterial activity with MIC > 1024 µg/mL. Associated with antibiotics, the compounds have shown, in some cases, synergistic effects mainly with norfloxacin and gentamicin against Gram-negative bacteria. Against *Escherichia coli*, the oils reversed the resistance profile, from 64 µg/mL to 1 µg/mL with OEMc and 8 µg/mL OECc bacteria when combined with norfloxacin. Facing *Staphylococcus aureus*, gentamicin MIC increased from 128 µg/mL to approximately 3 µg/mL when associated with limonene, thus changing its resistance profile. Therefore, the study of these species and limonene reveals their potential to modify antibiotic action because it reversed the resistance profile to two antibiotics and awakens the scientific eye to new studies of biological activities and the mechanism by which these activities are performed.

Keywords: Antimicrobial. Asteraceae. Euphorbiaceae. Limonene. Synergism.

1 INTRODUÇÃO

Infecções bacterianas são um problema que a humanidade lida continuamente e as bactérias que mais frequentemente ocasionam infecções hospitalares são *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Klebsiella* spp., *E. coli* e *Enterobacter* spp. A descoberta dos antibióticos garantiu o controle temporário desse problema, porém o uso indevido desses medicamentos está proporcionando às bactérias resistência (BRASIL, 2006; VIANA *et al.*, 2011).

A utilização de medicamentos antimicrobianos tornou o tratamento de doenças infecciosas mais eficaz. No entanto, o uso indiscriminado desses medicamentos fez com que algumas bactérias adquirissem resistência dentre estas, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. O surgimento de mecanismos de defesa e sua subsequente disseminação tornou alguns fármacos ineficazes contra muitos patógenos, constituindo uma das principais falhas nos tratamentos antibacterianos na atualidade. A pesquisa de novos medicamentos a partir de espécimes vegetais e o uso correto dos mesmos são medidas essenciais para combater essas novas cepas resistentes (DE BRITO; CORDEIRO, 2012; LANGTON; HENDERSON; HERBERT, 2005; RICE, 2008).

A utilização de plantas e seus derivados na medicina popular é uma prática realizada há muito tempo e no Brasil, por ter seu território com flora abundante, existem inúmeras espécies com potencial terapêutico que foram ou são utilizadas popularmente (VIRGÍNIO *et al.*, 2018; ZENI *et al.*, 2017). Em 1982, o Ministério da Saúde criou o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos (PPPM/Ceme). Este programa tem como objetivo intensificar as pesquisas de atividades biológicas de plantas medicinais a fim de criar medicamentos fitoterápicos. Em 2006, os medicamentos fitoterápicos foram integrados ao Sistema Único de Saúde (SUS), garantindo assim, o direito de acessibilidade dos usuários desse programa a tais medicamentos (BRASIL, 2011; MATOS; VIANA; BANDEIRA, 2001; RATES, 2001).

O gênero *Croton* é o segundo maior, quanto ao número de espécies, família Euphorbiaceae. Esse gênero é composto por mais de 1200 espécies distintas, sendo assim o mais prevalente entre todos os gêneros da subfamília Crotonoideae. *Croton* sp. é utilizado popularmente, através de infusões, para tratar enfermidades como câncer, hipercolesterolemia, dores estomacais, úlceras e malária (BRASIL *et al.*, 2009; LIMA; PIRANI, 2008; RANDAU *et al.*, 2004).

Várias espécies de *Croton* tem atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas como *Streptococcus mutans* e Gram-negativas, como, *Pseudomonas aeruginosa*. Atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonenses* e *Trypanosoma cruzi*, e antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* (CAMPOS *et al.*, 2010; RODRIGUES; COSTA; COUTINHO, 2008; ROSA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2011).

Mikania cordifolia pertence à família Asteraceae, natural do continente americano, que contém mais de 30.000 espécies. Gasparetto *et al.* (2010) constaram que o gênero *Mikania* é composto por mais de 400 espécies distintas, dentre as quais 171 podem ser encontradas na região sudeste do Brasil (DEWAN *et al.*, 2013; RIOS *et al.*, 2014).

Segundo Agostini-Costa *et al.* (2016) *Mikania* sp. é utilizada para tratamento de infecções parasitárias e bacterianas, para tratamento de úlceras e tem ação contra inflamação, alergia e broncoconstrição. De acordo com Brasil (2011) as folhas secas de *Mikania glomerata* podem ser preparadas através infusão para obtenção de um chá expectorante. Entretanto, doses acima das recomendadas pela Farmacopeia podem provocar episódios diarreicos e vômitos.

Segundo Morais *et al.* (2005), de plantas em geral podem ser extraídos os óleos essenciais, substâncias lipofílicas de odor agradável, voláteis e de baixo peso molecular, cuja composição química pode ser influenciada por fatores ambientais e genéticos. De acordo com Pierozan *et al.* (2009), óleos essenciais extraídos de algumas espécies de plantas, em baixas concentrações, agem como antibióticos, uma vez que conseguem inibir patógenos como: *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Mycobacterium* sp. e *Escherichia coli* (*E. coli*).

Como o presente estudo é pioneiro na avaliação antibacteriana das espécies de *Croton ceanothifolius*, *Mikania cordifolia* e limoneno, e também visa verificar a composição química e atividade modificadora da ação antibiótica frente a bactérias multirresistentes, a expansão de conhecimentos relacionados a estas plantas torna-se necessária para confirmação de seus efeitos, e assim, contribuir com o desenvolvimento de novas terapias de combate a resistência bacteriana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Staphylococcus aureus*

Pertencendo a família Micrococcae, o gênero *Staphylococcus* tem cerca de 33 espécies. As bactérias pertencentes se organizam em diferentes formas como em cachos, em dupla ou até mesmo isolados. Esse gênero produz a enzima catalase, esta, é capaz de degradar peróxido de hidrogênio, são bactérias imóveis, geralmente não encapsuladas e incapazes de formar esporos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A bactéria *Staphylococcus aureus* foi descrita pela primeira vez em 1880, em um abscesso de ferida operatória, pertence a microbiota normal de aproximadamente 30% da população, podendo colonizar pele, mucosas e vias respiratórias. As infecções causadas por essa bactéria podem variar de simples espinhas e celulites a meningite e septicemia (KONEMAN; ALLEN, 2008; WERTHEIM *et al.*, 2005).

Macroscopicamente, apresenta colônias esféricas que variam da coloração cinza à amarelada. *S. aureus* é a única espécie capaz de produzir a estafiloxantina, pigmento responsável pela coloração amarela de sua colônia. Este fato ajuda na identificação da bactéria, mas também proporciona para a mesma um mecanismo de inativação de espécies reativas de oxigênio de neutrófilos, aumentando sua patogenicidade (LEVINSON, 2016).

A espécie supracitada é produtora de hemolisinas β -hemolíticas, que, quebram moléculas de hemoglobina presente nas hemácias para liberação de ferro que será utilizado para produção de energia. A lise das hemácias pode ser visualizada em placas de ágar sangue pela coloração amarela que aparece ao redor das colônias, indicando ruptura total da hemoglobina do local (SANTOS *et al.*, 2007).

Em seu trabalho, Zafalon *et al.* (2008), verificaram o nível de resistência de uma cepa de *Staphylococcus aureus* isolada de vacas leiteiras. Entre os antibióticos testados, de diferentes classes, o maior nível de resistência observado foi contra penicilina e oxacilina (tipo de penicilina sintética).

Existe uma diferença clara entre β -lactamases e penicilinas. A primeira trata de uma classe de enzimas que atua hidrolisando o anel β -lactâmico dos antibióticos que o possuem, como cefalosporinas, carbapenemas e penicilinas. Penicilinas pertencem a esse grupo enzimático, porém atuam apenas em penicilinas, por tanto, antibióticos derivados da penicilina como oxacilina e meticilina não podem ser inativados por essas enzimas (WHO, 2009).

Penicilinas em geral atuam ligando-se as proteínas de ligação de penicilina (PBP), essas proteínas são, na verdade, enzimas que estabelecem ligações peptídicas para formação do

peptidoglicano, fundamental para estrutura da parede celular bacteriana. Ligada em seu sítio-alvo a penicilina inibe a formação dessa parede (CALIXTO; CAVALHEIRO, 2012). Em 1942, ocorreu o primeiro relato de uma cepa resistente a penicilina. Através de um gene plasmidial adquirido, *S. aureus* produziu penicilinases que degradam o anel β -lactâmico da penicilina, incapacitando assim, a ligação do antibiótico com as PBP então, foram criadas as penicilinas sintéticas resistentes a penicilinases como oxacilina e meticilina (OLIVEIRA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2014).

Poucos anos depois, surgiram as primeiras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (ORSA) que rapidamente se espalharam pelo mundo. A oxacilina é representante de um grupo de antibióticos chamados de PPR (penicilina-penicilinase resistente), essa escolha deve-se a estabilidade e difícil degradação da oxacilina. Fazem parte do PPR antibióticos como: meticilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina e dicloxacilina. Se uma cepa bacteriana for resistente a oxacilina nenhum outro derivado de penicilina terá eficácia (LIMA *et al.*, 2015).

A resistência adquirida a meticilina, penicilina sintética, deve-se a aquisição do gene *mecA*; Este gene faz com que o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) produza uma proteína diferente chamada de PBP2a enfraquecendo a afinidade dos β -lactâmicos pela parede celular (STEFANE *et al.*, 2012). Um estudo avaliou a diferença de mortalidade entre uma cepa de MRSA e outra cepa sensível a esse fármaco, em alguns casos a mortalidade aumentava em mais de 40% quando a infecção era ocasionada pela cepa resistente (KÖCK *et al.*, 2010).

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

Mesmo com o aparecimento de *Staphylococcus aureus* Resistente à Vancomicina (VRSA), à vancomicina continua sendo a melhor opção de tratamento para MRSA. O número de estirpes com resistência intermediária à vancomicina (VISA) cresce rapidamente acompanhada da resistência total à esse fármaco (BHATTACHARYA; BIR; MAJUMDAR, 2015).

2.2 *Echerichia coli*

Em 1885, Theodor Escherich isolou uma bactéria em fezes de indivíduos saudáveis, , que devido à alta prevalência, foi denominada de *Bacterium coli communi*. Como coloniza

naturalmente o intestino grosso de seres humanos e camundongos. Este patógeno foi considerado como comensal. Porém essa bactéria possui a capacidade de se infiltrar nas defesas do corpo e colonizar áreas estéreis do ser humano como sangue e bexiga, assim, pode-se classificar como patógeno oportunista (WANDERLEY, 2015).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família Enterobacteriaceae. No lúmen intestinal, *E. coli* atua na síntese de vitamina K que auxilia, na formação de plaquetas sanguíneas. Tratando-se do intestino humano, a disputa de nutrientes e substâncias produzidas por essa bactéria dificultam a instalação de outros microrganismos (KORB *et al.*, 2013; LIEVIN *et al.*, 2000).

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

Considerada como um patógeno agregador, EPEC tem facilidade em se aderir nas mucosas intestinais e causar danos nesse órgão. Essa facilidade se dá pelo fato desse patótipo de *E. coli* possuir um o gene *eae* que codifica uma proteína facilitadora da adesão entre a bactéria e os enterócitos (MANTHEY *et al.*, 2014; NAKHJAVANI *et al.*, 2013).

Assim como EPEC, a cepa de ETEC ocasiona quadros diarreicos, porém por mecanismos distintos. Por meio de toxinas termo lábeis e adesinas, ETEC estimula um aumento da produção de adenosina e guanosina monofosfato cíclico, respectivamente cAMP e cGMP, que aceleram a motilidade intestinal levando a diarreia (REN *et al.*, 2014).

Devido a sua semelhança com a toxina produzida pela *Shigella* sp., a verotoxina produzida pela bactéria EHEC foi posteriormente denominada SLT (*Shiga-like toxin*). Através de um gene plasmidial, a cepa sintetiza a toxina SLT capaz de destruir células intestinais, causando diarreia que variam de leves a quadros de disenteria. Devido a essa toxina, estão associados esse sorotipo crises de insuficiência renal por meio da destruição de células glomerulares (MURRAY *et al.*, 2014).

Embora sejam menos citados, os outros patótipos de *E. coli* causam infecções frequentes. O EAEC é um patótipo que causa infecções muitas vezes subestimadas, porém, esse patótipo vem adquirindo cada vez mais genes de resistência e evoluindo, onde até sua cepa selvagem porta vários desses mecanismos, inclusive já existem relatos que esse patótipo causa uma síndrome hemolítica-urêmica (LARA *et al.*, 2017). O patótipo EIEC é capaz de causar uma quadro de disenteria, característico pela constatação de leucócitos e sangue em exames, essa variação de *E. coli* penetra nas células intestinais, lá se multiplica e dissemina atingindo

outras células e causando uma destruição da mucosa intestinal (PASQUA *et al.*, 2017). Uma das principais causas de mortalidade infantil continua sendo quadros de diarreia, alguns estudos apontam o patotipo DAEC como o mais frequente a acometer crianças, levando a estados de desnutrição e desidratação pela eliminação de fezes aquosas e por vezes sanguinolentas (ABBASI *et al.*, 2016; SPANO *et al.*, 2017).

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

O estudo de Suárez *et al.* (2014), avaliou o perfil de resistência de cepas de *E. coli*. Tratando-se das cepas hospitalares, os níveis de resistência para antibióticos de parede celular, como ampicilina e amoxicilina com ácido clavulânico foi superior à 80%, enquanto para as cepas adquiridas na comunidade esse nível era de 60% para os mesmos antibióticos.

Com intuito de ordenar os tipos de resistência a antibacterianos que atuam na parede celular, criou-se a classificação AMBLER que divide as beta-lactamases em quatro grupos conforme sua semelhança estrutural. Os grupos foram divididos em letras de A a D, dentro do grupo A estão as enzimas clássicas e β -lactamases de espectro estendido (*Extended Spectrum Beta Lactamase* - ESBL), estas cepas são resistentes a quase todos os tipos de antibióticos que tem na sua formulação um anel β -lactâmico com exceção das cefamicinas e carbapenens (AMBLER *et al.*, 1991; PEREZ *et al.*, 2007).

Um outro mecanismo de resistência, muito frequentemente transmitido por meio de plasmídeo, pode ser encontrado em bactérias Gram-negativas. Fisiologicamente as bombas de efluxo atuam removendo compostos que podem ser tóxicos ao seu metabolismo, substâncias como solventes, metais tóxicos e antibióticos (RAMOS *et al.*, 2002; TINTINO, 2018). Para que a bactéria consiga expelir para meio externo o antibiótico ou qualquer outra substância tóxica, é necessário que se gaste energia para a movimentação de prótons e ativação da bomba, dessa forma a droga não atingirá uma concentração efetiva dentro da bactéria (SANTOS; RIBEIRO, 2016).

2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

A primeira descrição da espécie foi realizada por Gessard 1882, que obteve o isolamento de uma cepa bacteriana produtora de um pigmento esverdeado chamado de piocianina. Devido

a esse fato, foi denominada de *Bacilos pyocyaneus* (SILVA ., 2016). A origem do nome *Pseudomonas* vem do grego e significa “falsa unidade simples” e o nome *aeruginosa* se refere a cor que as colônias crescem em meio de cultura. Existem diferentes tipos de pigmentos produzido por cepas de *Pseudomonas* sp. com; pioverdina (amarelo-esverdeado), piocianina (azul), piorrubina (roxo), piomelanina (marron) (AUSINA RUIZ *et al.*, 2006).

Cepas bacterianas dessa espécie comumente portam um mecanismo de resistência para fluoroquinolonas, que, envolve mudança nos cromossomos que codificam enzimas como topoisomerase IV e girase, e produção de proteínas que diminuem a afinidade desses fármacos ao seu sítio alvo (MELO, 2014).

Pseudomonas aeruginosa frequentemente ocasiona infecções em pacientes imunocomprometidos e pacientes internados em unidades de terapia intensiva. Esse bacilo Gram-negativo tem a capacidade de infectar e colonizar diferentes tecidos humanos e até superfícies de objetos inanimados, como próteses dentárias e cardíacas (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015). Essa bactéria é o principal agente causador de infecções respiratórias em pacientes entubados. Esse fato se deve à capacidade de formação de biofilme sobre a superfícies dos tubos utilizados na ventilação mecânica (GIL-PEROTIN *et al.*, 2012).

O biofilme é uma estrutura organizada, funcional, e benéfica para os microrganismos que a compõem, porém, essa formação dificulta a entrada de fármacos e a identificação de todos os agentes infecciosos, levando à um prognóstico mais difícil e demorado, contribuindo para o aumento dos níveis de morbidade e mortalidade (GIL-PEROTIN *et al.*, 2012). A formação de biofilme é frequentemente praticada por cepas de *P. aeruginosa* como evidenciado no trabalho de Lima *et al.* (2017) onde, 75% das cepas testadas formaram algum grau de biofilme, e desse percentual, 10% foram consideradas fortemente aderidas ao biofilme.

Como principal espécie do gênero, *P. aeruginosa*, ocasiona frequentemente infecções urinárias, sepse, pneumonia e infecções em tecidos moles ou feridas cirúrgicas. Ocasionalmente pode levar a surtos hospitalares em pacientes imunodeprimidos, e está muito associado a fibrose cística (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Pacientes com fibrose cística geralmente adquirem infecções crônicas por *Pseudomonas* sp., podendo chegar a 20 anos portando essa bactéria. Para que isso aconteça esse patógeno se torna menos virulento e citotóxico, perde a capacidade de se mover e liberar toxinas, causa uma mutação nas células mucoides desenvolvendo uma barreira física entre suas colônias e o sistema imune do paciente, construindo assim uma espécie de biofilme (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

P. aeruginosa possui resistência intrínseca há muitos antibióticos de classes distintas como clorofenicol, tetraciclina, cefoxitina e ácido nalidíxico. A membrana dessa bactéria tem

um número reduzido de porinas, o que dificulta a entrada desses fármacos, porta proteínas de bomba de efluxo que confere resistência principalmente as quinolonas e expressa uma grande quantidade de beta-lactamases que hidrolisam o anel β -lactâmico dos antibióticos dessa classe (LISTER.; WOLTER; HANSON, 2009; OPLUSTIL *et al.*, 2010).

O mecanismo de ESBL, tipo de β -lactamase, foi originado por meio de uma mutação nas duas famílias de β -lactamases TEM e SHV, essa mutação originou ESBL's clássicas. Como resposta ao mecanismo de espectro estendido, intensificou-se a utilização de carbapenemos, isso levou a criação de carbapenemases que conferem resistência também as cefalosporinas de terceira geração. Essas enzimas foram observadas em cepas de *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), por isso, esse mecanismo foi denominado de KPC que significa *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase. Outras bactérias como *P. aeruginosa* adquiriram esse mecanismo por meio de transferência de plasmídeo (MONIZ *et al.*, 2015).

2.4 Biodiversidade

O Brasil é um dos países com o maior número de espécies vivas. Essa variabilidade, ou seja, essa diversidade de espécies é chamada de biodiversidade. Estima-se que o Brasil tenha 19% de toda a biodiversidade do mundo. A mata atlântica é o bioma que se estende por toda a faixa litorânea brasileira, percorrendo grande parte do território nacional, nesse bioma está contida a maior pluralidade de espécies presentes no país (GIULIETTI *et al.*, 2005). Mesmo contendo toda essa biodiversidade, a mata atlântica brasileira é considerada uma região protegida e ameaçada ao mesmo tempo, boa parte da sua vegetação original e espécies que ali viviam foram extintas, contudo, ainda abriga mais de oito mil espécies vegetais endêmicas e animais (TABARELLI *et al.*, 2005).

O termo bioprospecção, definido em 1993, refere-se à capacidade de utilizar recursos naturais para fins econômicos ou para o desenvolvimento de produtos que derivam da exploração da biodiversidade e com isso, ter um fim lucrativo. Essa atividade tem bases bioquímicas e moleculares, descoberta e estudo de novas espécies com potencial farmacológico e estudos biotecnológicos a fim de revelar as bioatividades dos espécimes. Do ponto de vista acadêmico, a prospecção, ato de descobrir ou investigar algo, da biodiversidade, ou bioprospecção comercializa as informações por meio de artigos publicados e veículos de informação fazendo com que os resultados obtidos por meio de pesquisas científicas atinjam os mais diversos públicos (LAIRD *et al.*, 2002).

Alguns autores pensam que, como se trata de biodiversidade o conceito de bioprospecção é limitado e deveria incluir informações como a interação dos seres vivos com

o ambiente que eles vivem, e não só os metabólitos bioquímicos produzidos por eles, pois o meio se modifica e modifica aquele que o abita. Os ancestrais da raça humana aprenderam a conviver e utilizar da biodiversidade para sua sobrevivência, desde os homens da caverna que utilizavam do couro animal para se aquecer, até os índios que usam plantas medicinais para tratar suas enfermidades (BERLINCK, 2012).

No Brasil, a prospecção de produtos naturais começou com os índios e aumentou demasiadamente com a chegada dos colonizadores que derrubavam o Pau-Brasil para extrair seu pigmento vermelho que possuía uma ótima capacidade de tingimento, sendo comercializado em toda a Europa (DEAN, 2010).

2.5 Óleos essenciais

Plantas medicinais são muito utilizadas por pessoas que não tem acesso a outras formas de tratamento de saúde. Esse uso desencadeou pesquisas que as avaliam em isolado e em conjunto à procura de um efeito modulatório (RIBEIRO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012). Gibbons (2004) aponta que as plantas medicinais vêm sendo utilizadas para dar suporte e ajudar no combate as bactérias, associadas com antibióticos elas vem desempenhando sinergismo e espera-se que isso dificulte o mecanismo de resistência das bactérias.

Como parte do seu ciclo, algumas plantas produzem metabólitos secundários, que tem como função protegê-la de ameaças, variações climáticas e fatores fundamentais para crescimento e maturação celular da planta. Esses metabólitos dão origem aos óleos essenciais (OE). Quando submetidas a altas temperaturas podem ser extraídos óleos essenciais de várias partes da planta como raízes, folhas, flores, caule entre outros. (SANTOS *et al.*, 2011).

A composição química desses óleos geralmente é de moléculas de hidrogênio e principalmente de carbono. A quantidade de carbono existente em cada metabólito vai classificá-lo como um terpeno, quanto menos carbonos mais aromático e volátil será o composto, à medida que quantidade de carbono aumenta, essa molécula se torna mais densa e viscosa. Alguns desses compostos tem ação antibacteriana e atuam em diversos alvos bacterianos até mesmo auxiliando a ação de antibióticos já comercializados (BARBOSA *et al.*, 2015).

Os óleos essenciais são uma mistura de vários compostos, e nesse contexto, uma mesma espécie de planta pode apresentar diferentes composições para cada época do ano, dependendo da estação, clima, níveis de precipitação, horário de coleta do material. O estudo de Silva M. (2016) avaliou a mudança da composição química em diferentes horários do mesmo dia e observou uma inversão no componente que apresentava o maior percentual dentre os outros.

Como exemplo, cita-se, o timol que pela manhã foi identificado como composto majoritário com 34%, ao meio-dia o carvacrol obteve 29%, e ao final do dia o timol voltou a ser a substância encontrada em maior quantidade no óleo essencial.

2.6 O Gênero *Croton*

Considerada como uma família generalista pela quantidade de gêneros e variedade de espécies, a família Euphorbiaceae é de grande importância econômica e social para as regiões de clima tropical e temperado. Apesar de estar representada nesses climas, essa família é a segunda maior presente na Caatinga e em quase todo o território nacional. Com mais de duzentos gêneros e seis mil espécies essa grande família tem muitos indivíduos com várias atividades de uso empírico e outros de atividade comprovada cientificamente (LOPES *et al.*, 2018). O gênero *Croton* é um exemplo dessa família.

Considerado um dos maiores gêneros da Euphorbiaceae por possuir mais de 1300 espécies distribuídas ao redor do mundo. Em território brasileiro existem aproximadamente 250 espécies endêmicas e no total 350 espécies já registradas no país (BRITO *et al.*, 2018). Esse gênero tem grande relevância econômica devido a exploração das atividades dos metabólitos secundários, que tem propriedades medicinais, produzidos por *Croton* sp. Alguns exemplos são flavonoides, alcaloides e terpenos (PAYO *et al.*, 2001).

Várias espécies de *Croton* tem importância econômica. A madeira é utilizada para produção de móveis, construções, inseticida, e *Croton ceanothifolius* e outras espécies desse gênero são utilizadas em fazendas de apicultura para produção de mel (CRUZ, 2016). Plantas do gênero *Croton* são frequentemente utilizadas do ponto de vista etnobiológico, esse uso popular impulsiona a produção de novos estudos científicos para caracterizar as bioatividades dos vários compostos metabolizados por tantas espécies distintas. Com as folhas de *Croton* sp. são realizadas preparações, para diferentes tipos de aplicações, que segundo a medicina popular tem potencial curativo para infecções intestinais, efeito antisséptico, anti-inflamatória e para tratamento de câncer (TAMARIZ *et al.*, 2003).

Para algumas espécies do gênero existem trabalhos que comprovam sua atividade modificadora da ação de antibióticos, como pode ser observado no trabalho de Vidal *et al.* (2016) que verificou esse efeito frente a *Escherichia coli* modificando a ação de gentamicina e oxacilina. Costa *et al.* (2008) mostrou o tanto o efeito modificador da ação dos antibióticos, quanto a atividade antibacteriana isolada do óleo essencial das folhas de *Croton zehntneri* frente a bactérias Gram-negativas.

Considerada uma espécie nativa e endêmica do Brasil, *Croton ceanothifolius* Baill (*C. ceanothifolius*) tem forma de vida de arbusto e cresce no Cerrado. A espécie é macroscopicamente muito semelhante a *Croton pallidulus* Baill. até mesmo no formato das folhas, diferenciando-se apenas pela análise de elementos presentes nas folhas destas espécies. Há relatos que o local em que essas plantas são encontradas diverge, pois, *C. ceanothifolius* era presente apenas no estado de Minas Gerais, porém, devido principalmente à ação antropogênica, essa espécie foi levada ao sul, onde era encontrada apenas *Croton pallidulus* (LIMA; PIRANI, 2008).

Figura 2: Ramos terminais e flores de *Croton ceanothifolius* Baill.



Fonte: W. do Amaral (2019)

2.7 O Gênero *Mikania*

A família Asteraceae possui inúmeras espécies, cuja variedade a tornam a mais prevalente em todo mundo com mais de 30.000 espécies já catalogadas. Geralmente são encontradas em lugares abertos e de vegetação de porte pequeno como campos. Representa no Brasil, uma das maiores famílias em quantidade de espécies, onde dentre esta, uma grande parte é considerada endêmica do país (BFG, 2018; CARDOSO, 2017).

Devido ao volumoso número de espécies, esta família foi dividida em 13 subfamílias e 44 tribos (FUNK *et al.*, 2009). Dentre essas tribos existe a Eupatorieae Cass, a tribo com o maior número de espécies e uma ampla distribuição no hemisfério sul do planeta, principalmente no continente sul-americano. Pertencem a essa tribo 16 gêneros, o maior deles é *Mikania* Willd com aproximadamente 15 espécies e subespécies. Os gêneros *Mikania* e *Baccharis* são os maiores da

família Asteraceae contendo mais que um quarto do volume total de espécies dessa família (LOPES, 2018).

Várias espécies de *Mikania* são conhecidas popularmente como “Guaco”. *Mikania glomerata* é a espécie do gênero que apresenta o maior número de estudos nas mais diversas áreas. Um levantamento etnofarmacológico apontou a utilização dessa espécie como um expectorante natural, com ação comprovada pela farmacopeia brasileira (SASSAKI *et al.*, 2016). O guaco é utilizado empiricamente para tratar infecções, tem efeito anti-inflamatório, broncodilatadora, controla espasmos musculares e úlceras gastrointestinais. *Mikania cordifolia*, considerada como uma erva daninha, tem a capacidade de produzir mel, característica pouco frequente em plantas desse gênero (GASPARETTO *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais de duas espécies desse gênero, *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*, foram testados frente a diferentes cepas de *E. coli* e cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, houve inibição do crescimento dessas bactérias nas concentrações mais baixas e todas as concentrações inibiram a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (DUARTE *et al.* 2007; UENO, 2018).

De origem nativa, porém não endêmica do Brasil, *Mikania cordifolia* Willd é amplamente distribuída em território nacional, excluindo-se apenas dois estados, Acre e Roraima, que, até o momento, não catalogaram nenhum exemplar desta espécie. Considerada como uma erva daninha, e comportamento de planta trepadeira (figura 1), tem a capacidade de produzir mel, característica pouco frequente em plantas desse gênero. (FLORA DO BRASIL 2020; RITTER, MIOTTO, 2005; STEINER *et al.*, 2010)

Figura 1: Folhas de *Mikania cordifolia* (L.F.) Willd se enroscando em tronco de árvore.



Fonte: Ritter, M. R. (2020)

3 PROCEDIMENTO E RESULTADOS

Capítulo I: GC-MS-FID characterization and antibacterial activity of the *Mikania cordifolia* essential oil and limonene against MDR strains

Revista: Food and Chemical Toxicology

Situação: Publicado **Qualis em Biodiversidade:** A2 **Fator de impacto:** 4,679

GC-MS-FID characterization and Antibacterial activity of the *Mikania cordifolia* essential oil and limonene against MDR strains

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

- a- Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri - URCA, Crato, Brazil;
b- Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, Brazil;
c- Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation - IGM-FIOCRUZ/BA, Salvador, Brazil;
d- Post Graduation course of Sustainable Territorial Development, Federal University of Paraná – UFPR, Matinhos, Brazil;
e- Department of Chemical Technology, Federal University of Paraná – UFPR, Curitiba, Brazil;
f- Post Graduation course of Agronomy, Federal University of Paraná – UFPR, Curitiba, Brazil.

ABSTRACT

The present study evaluated the effect of the essential oil of *Mikania cordifolia* (EOMc) and its major constituent limonene alone or associated with antibacterial drugs against Multidrug Resistant Bacteria (MDR). To evaluate the antibacterial activity, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of the oil and limonene against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were determined. The antibiotic-modulating activity was assessed using subinhibitory concentrations (MIC /8) of these substances in combination with conventional antibacterial drugs. Although no relevant antibacterial activity of the natural products was detected, both substances modulated the action of antibiotics against resistant bacteria. The EOMc demonstrated the best modulating effect against *P. aeruginosa*, presenting synergistic effects when associated with gentamicin and norfloxacin. In addition, the oil reduced the MIC of norfloxacin against *E. coli* as well as reduced the MIC of gentamicin against *S. aureus*. On the other hand, the best effect of limonene was obtained against *S. aureus*. Thus, it is concluded that the essential oil *Mikania cordifolia* and the isolated compound limonene do not have clinically significant antibacterial effect, but modulate the action of antibiotics against MDR bacteria.

Keywords: *Mikania cordifolia*. Limonene. Bacterial resistance. Antibiotics. Modulation.

1. Introduction

The products of the secondary metabolism products of plants act as part of their defense system and, as such, have antimicrobial properties that can be harnessed for the development of novel drugs (Gurib-Fakim et al., 2006). Essential oils, including monoterpenes, sesquiterpenes and phenylpropanoids are among the main bioactive secondary metabolites of plants. They are naturally found in plants with strong odor as complex mixtures of volatile compounds. (Franz, 2011). Regarding the biological activities of these substances, earlier studies have shown that they have antimicrobial properties against bacteria, fungi, protozoa and viruses (Ahmad et al., 2011; Perez et al., 2012; Sadekuzzaman et al., 2015).

The genus *Mikania* (L. f.) Willd (Asteraceae) is composed of more than 400 species, 171 of which occur in Brazil (Dalla et al., 2010). *Mikania cordifolia*, popularly known as "guaco", is used in folk medicine as anti-inflammatory, antiasthmatic, antiparasitic and analgesic (Agostini-Costa et al., 2016). These ethnopharmacological data are corroborated by experimental studies proving that this species has anti-inflammatory (Peluso et al., 1995), antiprotozoal (Laurella et al., 2012) and insecticide (Arais et al., 1995) activities. Even with all these activities, studies with *Mikania glomerata* using liver of hypertensive and normotensive rats prove its low toxicity (Sguarezi et al., 2017).

Bacterial infections are among the major problems in public health today. In this context, *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Klebsiella spp*, *Escherichia coli* and *Enterobacter spp* are considered the main causative agents of hospital infections (Lima et al., 2015). Historically, bacterial infections represent some of the leading causes of diseases in mankind. However, the development of antibiotics caused a real revolution in this scenario, since non-treatable bacterial infections were practically eradicated (Silva, Hertel, 2014).

As a result, the indiscriminate use of antibiotics over the years has created a selective pressure environment that has stimulated the emergence of resistant microorganisms, such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* (De Brito, Cordeiro, 2012).

Bacterial resistance is considered as a major public health problem because several bacterial strains have become unsusceptible to the currently available antibiotics (Da Costa, Junior, 2017). The main mechanisms involved in this phenomenon include: enzymatic modification of the antibiotic; reduction of cellular permeability or presence of antibiotic efflux pumps (avoiding the intracellular accumulation of the antibiotic); structural modification of target molecules making antibiotic binding impossible (Medina, Machado, Machado, 2015).

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacillus that causes opportunistic infections, mainly in immunodeficient patients (Lee, Zhang, 2015). It has a wide range of virulence and cell signaling mechanisms that favor its escape from the immune system of the host (Balasubramanian et al., 2013; Reinhart, Sherrouse, 2016), in addition to antibacterial resistance mechanisms (e.g. enzymes and efflux systems) against the main classes of antibiotics (Rincón et al., 2014).

Despite the importance of *Mikania cordifolia* in the context of folk medicine, the antibacterial effects of the essential oil of this species remain to be investigated. Therefore, the objective of the present study is to evaluate the antibacterial activity and the antibiotic-modulating effect of the *Mikania cordifolia* essential oil.

2. Methodology

2.1. Plant Material

The essential oil was extracted from terminal branches and / or inflorescences collected in the Private Reserve of Natural Patrimony (RPPN), a segment of the Atlantic Forest in the State of Paraná, Southern Brazil, It is located at 25°20.884'S and 049° 47.258' W with altitudes ranging from 985 to 1.145 m. with annual average temperatures around 17 °C, frequent frosts, and an average annual rainfall of 1,200 mm/y. The collection was performed in 28/02/16, dried

specimens were herborized and deposited in the Herbarium of *Faculdades Integradas Espirita* (HFIE) under the number HFIE 8.325.

2.2. *Essential oil extraction and analysis*

The essential was extracted by hydrodistillation in Clevenger type apparatus, using 50 g of dry material in 1 L of distilled water. The chemical constituents of the essential oil were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS). The mass spectra were compared to those of the library (Linstron, Mallard, 2013) and the linear retention indices were calculated from the injection of a homologous series of hydrocarbons (C7 - C26) and compared with data in the literature (Adams, 2007). Only peaks with relative area greater than 1% in CG/MS were considered for quantification and identification. The mass detector was operated in electron ionization mode (70 eV) at a rate of 3.15 min⁻¹ scan and mass range of 40 to 450 u. The transfer line was maintained at 260 °C, the ion source at 230° C and the quadrupole analyzer at 150 °C. Diluted samples were injected into an Agilent 7890A chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID), operated at 280 °C for quantification. The same column and analytical conditions described above were employed, except for the carrier gas, which was hydrogen used at a flow rate of 1.5 mL min⁻¹. The percentage composition was obtained by electronic integration of the FID signal by dividing the area of each component by the total area (area %). The constituents were identified by comparing their mass spectra with those of the Wiley library and NIST and also with their linear retention indices which were calculated from injection of a homologous series of hydrocarbons (C7 - C26) and compared with literature data. Limonene was purchased from Sigma Aldrich.

2.3. *Bacterial strains*

The resistance profile of *Staphylococcus aureus* 10, *Pseudomonas aeruginosa* 24 e *Escherichia coli* 06 is described in the work of Bezerra et al., (2017) that used the same strains.

2.4. Preparation of the essential oil and Limonene

Prior to the experiments, 10 mg of each substance were weighed and placed in individualized tubes and diluted in 0.5 ml of DMSO. This solution was transferred to a larger tube and added with 9.265 mL of sterile distilled water resulting in a 1024 µg / mL solutions of the oil or limonene, which were used in the tests.

Preparation of inocula and antibiotics

Bacterial cultures were seeded in Petri dishes containing Heart Agar Infusion (HIA) and maintained for growth in the oven at 37 ° C for 24 h. After this period, a trawl of each microbial culture was diluted in test tubes containing sterile saline solution in triplicate. After this procedure, the turbidity of the solution was compared to the control of 0.5 of the McFarland scale. The antibiotics used in the tests were norfloxacin, penicillin and gentamicin at an initial concentration of 1024 µg / mL.

Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

In the MIC determination assay, 900µL of 10% liquid BHI medium and 100µL of the inoculum (corresponding to 10% of the total solution) were added to a tube (NCCLS, 2003). A 100µL aliquot of this solution was transferred to each well of a 96-well plate and then serial dilution was performed by adding 100µL of the essential oil or limonene in concentrations ranging from 512 to 8µg / mL. The plates were incubated at 35 ± 2 ° C for 24 h and after that

period the MIC of the substances was determined. To this end, resazurin sodium (20 µg) was added in each well. Interpretation of the results was made by ocular analysis of the color change of resazurin after 1 h of reaction (Coutinho et al., 2008; Javadpour et al., 1996). In the positive controls, no treatments were added and in the negative controls bacterial inocula were not used. The tests were performed in triplicate

Evaluation of the antibiotic-modulating activity

The antibiotic-modulating activity of the oil and its major constituent limonene was analyzed by the method proposed by Coutinho et al. (2008). In Eppendorf tubes, 1,350 µL of a solution containing the treatments at a subinhibitory concentration (MIC / 8) and 10% BHI was prepared. To this solution, 150 µL of the bacterial suspension was added, resulting in a final volume of 1.5mL. As a control, eppendorf tubes were prepared with 1.5mL of a solution containing 1,350µL of BHI (10%) and 150µL of bacterial suspension. The plate was filled numerically by adding 100µL of the final solution into each well. Subsequently, serial microdilutions were performed by using 100µL of each antibiotic at concentrations ranging from 512 – 0,5µg /µL. The plates were incubated at 37 ° C for 24 h and the readings were performed as described above.

2.5. Statistical Analysis

The results were expressed as mean ± standard deviation and differences were evaluated through analysis of variance (ANOVA) followed by *Bonferroni's* post-test using the GraphPad Prism software. The differences with a $p < 0.05$ were considered as significant.

3. Results and discussion

3.1. Chemical profile of the *Mikania cordifolia* essential oil

The essential oil of *Mikania cordifolia* showed a yield of 0.26%, which is expected for species of the genus, such as *Mikania glomerata*, whose essential oil presented yields of 0.12% to 0.76% according to chemotype (Bolina et al., 2009). The present study is a pioneer in the study of the essential oil of the species *Mikania cordifolia* (L.f.) Willd. In this context, a phytochemical analysis revealed the presence of 13 compounds (Table 1), including Limonene (19.2%) β -pinene (17.8%) and α -pinene (16%) as major compounds (Fig. 1 and Fig. 2).

Table 1: Chemical compounds identified in the essential oil of *Mikania cordifolia* by GC-MS-FID

RI calculated	Composition	%
937	α -pinene	16,0
976	Sabinene	2,5
979	β -pinene	17,8
991	Myrcene	13,3
1031	Limonene	19,2
1050	(<i>E</i>)- β -ocimene	3,0
1390	β -elemene	3,2
1451	α -humulene	2,8
1478	γ -muurolene	3,3
1493	bicyclogermacrene	8,8
1501	germacrene A	2,6
1531	(<i>E</i>)- γ -bisabolene	5,4
1575	Spathulenol	1,9

Figure 1: Chemical structure of the major compounds found in the EOMc

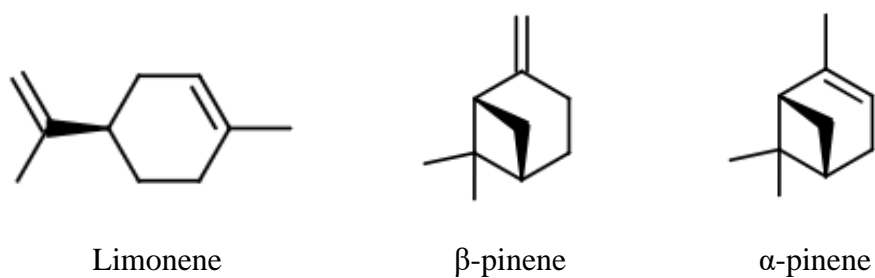
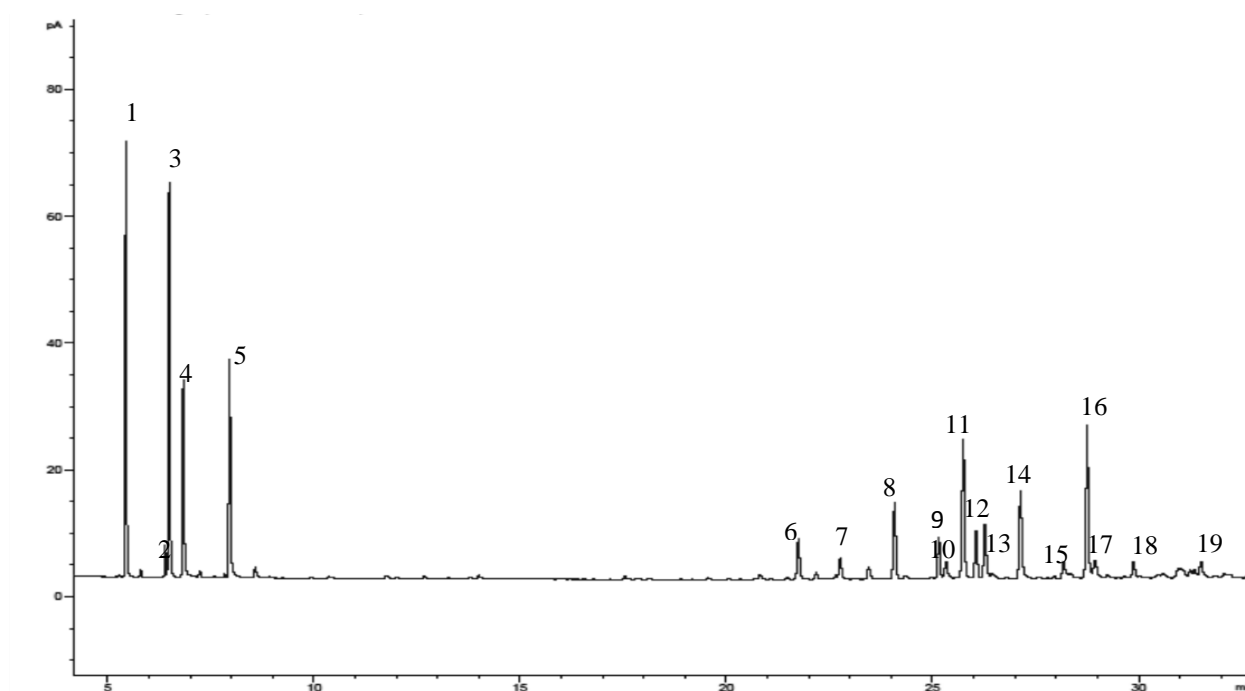


Figure 2: GC-MS Chromatogram of the Essential Oil of *Mikania cordifolia* (EOMc)



1: α -pinene; 2:sabinene; 3: β -pinene; 4: myrcene; 5: limonene; 6: (*E*)- β -ocimene; 7: β -elemene; 8:(*E*)-caryophyllene; 9: α -humulene; 10: γ -muurolene; 11: *ar*- curcumene; 12:bicyclogermacrene; 13: germacrene A; 14: β -bisabolene; 15: (*E*)- γ -bisabolene; 16: elemicin; 17:spatulenol; 18: caryophyllene oxide; 19:humulene epoxide II.

The phytochemical analysis of the EOMc indicates a similarity between this oil and the essential oil of *M. glomerata*, since there are five common constituents in the oils of these two species, including D-limonene, which was found as the major compound and in similar concentrations (19.2 and 19.5%) in both species, corroborating with the data from the current study (Silva-Junior et al., 2015). However, *Mikania glomerata* oil has coumarin, a compound derived from o-coumaric acid, which was not identified in *M. cordifolia* oil. This metabolite is synthesized more frequently in end shoots and young leaves and can be induced by successive

collections (Czelusniak et al., 2012). In addition, this compound was identified as one of the major constituents of a *Mikania* species from the interior of São Paulo (Taleb-Contini et al. 2006). These differences, however, may be due to factors such as: collection time, component of the plant analyzed, light intensity and precipitation. In fact, these factors directly influence the synthesis of secondary metabolites of any plant (Czelusniak et al., 2012).

Some species of genus *Mikania* were evaluated to verify their toxicological activity as in the study by Gasparetto et al. (2010) who evaluated *Mikania* sp administered as syrup, infusions and extracts in rats to evaluate their liver and spermatogenic toxicity evidencing its low toxicity and in some cases was considered non-toxic. A study evaluated the possible toxicity of a drug developed from six phytotherapeutic plants including *Mikania glomerata*. Blood tests showed no signs of toxicity. Adverse effects were reported in both the placebo and medication groups (Viana et al., 2018).

3.2. Antibacterial Activity of the *Mikania cordifolia* essential oil and Limonene

The antibacterial activity of the *Mikania cordifolia* essential oil was tested against three multiresistant strains: *Staphylococcus aureus* 10, *Pseudomonas aeruginosa* 24 and *Escherichia coli* 06. However, the products did not inhibit bacterial growth at any of the concentrations tested, indicating that they do not have antibacterial activity when tested alone. These results are important especially in the context of traditional medicine, since many species of the genus *Mikania* are used empirically for the treatment of diseases of the respiratory tract. In addition, although studies indicate that plants of this genus have antibacterial, anti-inflammatory and antiparasitic activities (Oliveira et al., 2007; Rufatto et al., 2012), the biological effects of *M. cordifolia* need to be better investigated

3.3. Antibiotic-modulating effect of the *Mikania cordifolia* essential oil

As shown in Figure 2, penicillin did not inhibit bacterial growth even at the highest concentration tested (1024µg / mL). In addition, the association with subinhibitory concentrations of the oil did not alter the MIC of this antibiotic, indicating that the EOMc does not modulate the activity of penicillin against resistant bacteria.

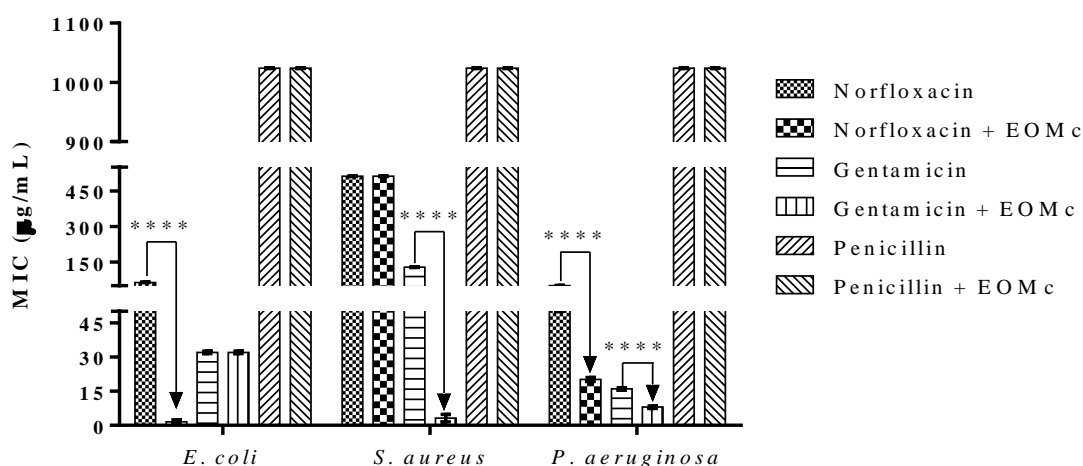


Figure 3: Antibiotic-modulating effect of the *Mikania cordifolia* essential oil (EOMc) against multiresistant bacteria. **** statistically significant value, $p < 0.0001$

On the other hand, the association between norfloxacin and the *M. cordifolia* essential oil presented synergism against *P. aeruginosa* and *E. coli*, with consequent reduction of the MICs of this antibiotic. This indicates that the EOMc reversed the resistance profile of the bacterium to the drug and, therefore, acts as an antibiotic modulator. However, the oil did not affect the action of this antibiotic on *S. aureus*, indicating that the modulating effect varies depending on the bacterial strain. In addition, this effect may vary according to the plant material used (Li et al., 2013).

The association of the oil with the aminoglycoside gentamicin significantly reduced the MIC of the antibiotic against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, but not against *E. coli*. It is worth mentioning that the results with the Gram-positive bacteria suggest that there was a reversal of

resistance, since the MIC of gentamicin MIC decreased from 128 to 3 $\mu\text{g} / \text{mL}$. In general, the antibiotic-modulating effect of the *Mikania cordifolia* essential oil was more evident against *P. aeruginosa* compared to the other strains tested. However, studies suggest that essential oils are more effective against Gram-positive bacteria, because the lipopolysaccharides (LPS) found in the cell membranes of Gram-negative bacteria hinder the intracellular absorption and dissemination of oils (Barbosa et al., 2015).

3.4. Antibiotic-modulating effect of limonene

Limonene is a cyclic monoterpene found in several plant species and used mainly in the fragrances industry (Ali et al., 2011).

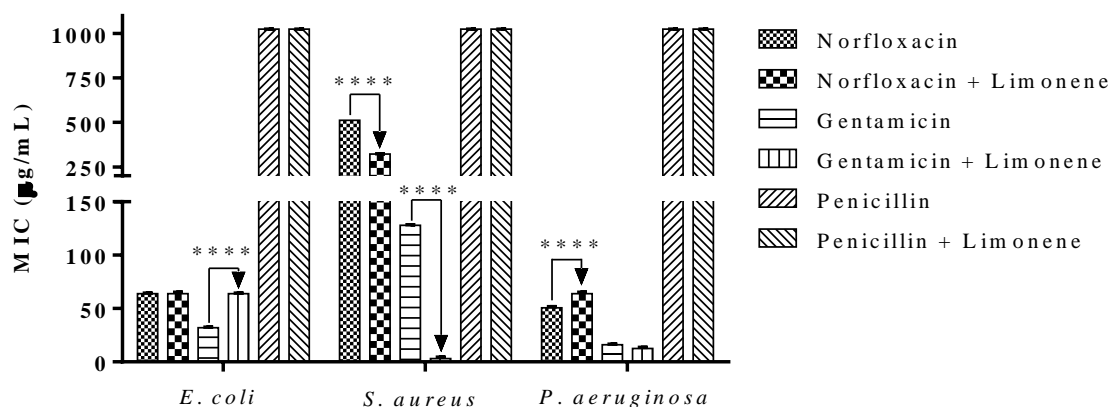


Figure 4: Antibiotic-modulating effect of limonene against multiresistant bacteria. **** statistically significant value, $p < 0.0001$

Like the EOMc, limonene was unable to modulate penicillin activity against resistant bacterial strains. The main mechanism of resistance to Penicillin is the synthesis of β -lactamases. These enzymes hydrolyze the β -lactam ring, which has an antibacterial effect due to inhibition of cell wall synthesis (Zeng, Lin, 2013). Thus, even if the substances tested increase the permeability of the antibiotic, β -lactamases destroy the drug before it can bind to its target.

The association of norfloxacin with limonene did not affect the MIC of the antibiotic against *E. coli*, but potentiated and antagonized the effect of the antibiotic against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, respectively. Finally, by analyzing the association of limonene with gentamicin against *P. aeruginosa*, it is possible to observe a small reduction in the MIC of the antibiotic, but the differences were not statistically significant. The same association potentiated and antagonized the effect of the antibiotic against *S. aureus* and *E. coli*, respectively. These data demonstrate that the modulating effect of limonene in combination with different antibiotics is dependent on the intrinsic resistance characteristics of each strain (Figure 3).

Essential oils containing limonene as a major component have proven antibacterial activity against resistant strains of *S. aureus* and some strains of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*, as shown in the study by Settanni et al. (2012). In general, the cell wall of Gram-positive bacteria is simpler than that of Gram-negative bacteria, which makes them more susceptible to the action of essential oils. Thus, due to its lipophilic characteristics, it is possible that limonene crosses the cell wall, altering bacterial cell membrane permeability (Maia et al., 2014; Obidi et al., 2013).

4. Conclusion

The data of the present study indicate that the essential oil of *Mikania cordifolia* does not have significant antibacterial activity, but it is able to modulate the action of antibiotics, reversing some patterns of bacterial resistance. On the other hand, the antibiotic-modulating action of limonene seems to be strongly influenced by the intrinsic resistance characteristics of each strain, although promising results have been obtained against *S. aureus*.

These data suggest that the modulating activity of *M. cordifolia* is dependent on the isolated or synergistic action of other components present in the oil. However, further studies

are needed to characterize the antibacterial and antibiotic-modulating properties of different constituents of the essential oil obtained from this species.

References

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

Agostini-Costa, T.S., Gomes, I.S., Fonseca, M.C.M., Alonso, A.M., Pereira, R.C.A., Montanari-Junior I, Silva, J.P., Pereira, A.M.S., Vieira, R., Vaz, A.P.A., 2016. Effect of accessions and environment conditions on coumarin, o-coumaric and kaurenoic acids levels of *Mikania laevigata*. *Plant med.* 82, 1431–1437.

Ahmad, A., Khan, A., Kumar, P., Bhatt, R.P., Manzoor, N., 2011. Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Yeast.* 28, 611–617.

Ali, M.S., Islam, M.S., Rahman, M.M., Islam, M.R., Sayeed, M.A., et al., 2011. Antibacterial and cytotoxic activity of ethanol extract of *Mikania cordata* (Burm. F.) BL Robinson leaves. *Journal of basic and clinical pharmacy.* 2, 103.

Arias, A.R., Ferro, E., Inchausti, A., Ascurra, M., Acosta, N., Rodriguez, E., Fournet, A., 1995. Mutagenicity, insecticidal and trypanomicidal activity of some Paraguayan Asteraceae. *J Ethnopharmacol.* 45, 35-41.

Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H., Mathee, K., 2013. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res.* 41, 1–20.

Barbosa, L.N., Silva-Probst, I., Andrade, B.F.M.T., Alves, F.C.B., Albano, M., et al., 2015. In vitro antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. *Journal of oleo science.* 64, 289-298.

Bezerra, C.F. et al. 2017 A vanilina modula seletivamente a ação dos antibióticos contra bactérias resistentes. *Patogênese microbiana*, 113, 265-268.

Bolina, R.C., Garcia, E.F., Duarte, M.G.R., 2009. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. *Rev Bras Farmacogn*, 19, 294-298.

Coutinho, H.D.M., Costa, J.G., Lima, E.O., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P., 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine *Chemother.* 54, 328–330.

Czelusniak, K.E., Brocco, A., Pereira, D.F., Freitas, G.B.L., 2012. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.* 14, 400-409.

- Dalla, N.G., Pastori, T., Laughinghouse, H.D., Canto-Dorow, S.T., Tedesco, S.B., 2010. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). *Biocell*. 34.
- De Brito, M.A., Cordeiro, B.C., 2012. Necessidade de novos antibióticos. *J Bras Patol Med Lab*. 48, 247-249.
- Da Costa, A. L. P., Junior, A. C. S. S. 2017. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (UNIFAP)*, 7, 45-57.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S., 2007. *Diagnostic microbiology*. 12th ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier.
- Franz, C.M., 2011. Essential oil research: past, present and future. *Flavour Fragr J*. 25, 112-113.
- Gasparetto, J.C., Campos, F.R., Budel, J.M., Pontarolo, R. 2010. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, anatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e seu uso em programas de fitoterapia no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 627-640.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med*. 27,1-93.
- Hawkey, P.M., 1998. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ*. 317, 657-660.
- Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.S., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Mann, C.M., Markhan, J.L., 1996. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Appl Microbiol*. 84, 538-544.
- Laurella, L.C., Frank, F.M., Sarquiz, A., Alonso, M.R., Giberti, G., Cavallaro, L., Catalán, C.A., Cazorla, S.I., Malchiodi, E., Martino, V.S., Sulsen, V.P., 2012. In Vitro Evaluation of Antiprotozoal and Antiviral Activities of Extracts from Argentinean *Mikania* Species. *Sci World J*. 58, 639-646.
- Lee, J., Zhang, L. 2015. Rede de detecção de quorum de hierarquia em *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteína e célula*, 6, 26-41.
- Lima, M. F. P. et al. 2015. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares—Revisão de Literatura. *Revista Uningá Review*, 21.
- Li, Y., Li, J., Wang, X. X., Cao, A. C., 2013. Antimicrobial Constituents of the Leaves of *Mikania micrantha* HB K. *Plos one*. 76725.
- Linstron, P.J., Mallard, W.G., 2013. NIST Chemistry Webbook, Eds. <http://webbook.nist.gov> (accessed in September 2013).
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect*. 2,1051-106.

- Maia, A. J., Schwan- Estada, K.R.F., Faria, C.M.D.R., Oliveira, J.S.B., Jardimetti, V.A., et al., 2014. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 49, 330-339.
- Medina, D.A.M., Machado, M.E.D, Machado, A.J.E. 2015. Resistencia a antibióticos, una crisis global. *Revista Médica de Risaralda*, 21, 74-74.
- NCCLS. 2003. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. USA.
- Obidi, O.F., Adelowotan, A.O., Ayoola, G.A., Johnson, O.O., Hassan, M.O., et al., 2013. Antimicrobial activity of orange oil on selected pathogens. *The International Journal of Biotechnology*. 2, 113-122.
- Oliveira, P.A., Gregorio, L.E., Oliveira, D.C.R., 2007. Comparative analysis of sesquiterpene lactones from *Mikania cordifolia* collected from three diferente-locations. *Chemistry of Natural Compounds*. 43, 140-142.
- Peluso, G., Feo, V., Simone, F., Bresciano, E., Vuotto, M.L., 1995. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. *J Nat Prod*. 58, 639-649.
- Perez, S.G., Lopez, M.A.R., Miranda, E.S., Fresan-Orozco, M.C., Perez-Ramos, J., 2012. Antiprotozoa activity of some essential oils. *J Med Plants Res*. 6, 2901–2908.
- Reinhart, A.A., Sherrouse, A.G.O., 2016. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Distinct Iron Sources. *Genes (Basel)*. 7.
- Rincón, S. et al. 2014. Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 34, 188-191.
- Rufatto, L.C., Gower, A., Schwambach, J., Moura, S., 2012. Genus *Mikania*: chemical composition and phytotherapeutical activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 22, 1384-1403.
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M.F.R., Ha, S.D., 2015. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comp Rev Food Sci Food Saf*. 14, 491–509.
- Settanni, L., Alazzolo, E., Guarrasi, V., Aleo, A., Mammìna, C., et al., 2012. Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus cultivated in Sicily. *Food Control*. 6, 326-330.
- Silva, A., Hertel, V. L. 2014. Perfil epidemiológico de crianças hospitalizadas em uso de antibióticos. *Revista eletrônica de enfermagem do Vale do Paraíba*, 1.
- Silva-Junior, A.A., Ritter, M.R., Zambonim, F.M., Deschamps, F.C., Tcacenco, F.A., et al., 2015. Um novo ecótipo de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) rico em óleo essencial no sul do Brasil. *Revista Fitos*. 9, 19-28.

Sguarezi, J.G.D., Gonçalves, V.F., Rocha, T., Murakami, D.Y., Uzuelle, M.A., et al., 2017. Fitoterápicos na Rede Pública de Saúde (SUS) no Brasil: Um estudo toxicológico de Mikania glomerata em fetos de ratas Wistar. 10, 460-468.

Taleb-Contini, S.H., Santos, P.A., Veneziani, R., Pereira, A.M.S., França, S.C., et al., 2006. Differences in secondary metabolites from leaf extracts of Mikania glomerata Sprengel obtained by micropropagation and cuttings. Revista Brasileira de Farmacognosia. 16, 596-598.

Viana, I.O.L., de Moraes, M.E.A., de Moraes Filho, M.O., Bezerra, F.A. F., et al., 2018. Avaliação da toxicologia clínica do xarope Melagrião® em voluntários sadios. Revista Biociências, 23, 15-35.

Zeng, X., Lin, J., 2013. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. Frontiers in microbiology. 4, 128-132.

Zowalaty, M.E., Thani, A.A., Webster, T.J., Zowalaty, A.E., Schweizer, H.P., Nasrallah, G.K., Marei, H.E., Ashour, H.M., 2015. Future Microbiol. 10, 1683-706. Future Microbiol. 10, 1683-706.

Capítulo II: Essential oil of *Croton ceanothifolius* Baill Potentiates the Effect of Antibiotics Against Multiresistant Bacteria

Revista: Antibiotics

Situação: Publicado **Classificação novo Qualis:** A1 **Fator de impacto:** 3,893

Essential oil of *Croton ceanothifolius* Baill Potentiates the Effect of Antibiotics Against Multiresistant Bacteria

Ana C. J. de Araújo¹, Priscilla R. Freitas¹, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa¹, Débora F. Muniz¹, Janaína Esmeraldo Rocha¹, José B. de Araújo Neto¹, Maria M. C. da Silva¹, Talysson F. Moura¹, Rimundo L. S. Pereira¹, Jaime Ribeiro-Filho², Luiz E. da Silva³, Wanderlei do Amaral³, Cícero Deschamps³, Saulo R. Tintino¹, Marcello Iriti⁴, Sara Vitalini^{4*}, Henrique D. Melo Coutinho¹

¹ Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato 63105-000, Brazil;

² Gonçalo Moniz Institute, Fundação Oswaldo Cruz (IGM-FIOCRUZ/BA), Salvador, Bahia, Brazil;

³ Setor Litoral, Federal University of Paraná, Curitiba 80.060-000, Brazil;

⁴ Department of Agricultural and Environmental Sciences, Milan State University, via G. Celoria 2, 20133 Milan, Italy.

Abstract

This study is a pioneer in reporting the antibacterial properties of the species *Croton ceanothifolius* Baill. The genus *Croton* belongs to the family Euphorbiaceae composed of numerous species with documented biological activities. However, the pharmacological properties of *C. ceanothifolius* remain poorly understood. The leaves of this plant were submitted to hydrodistillation for essential oil (CcEO) extraction and the phytochemical characterization of the oil was performed by GC/MS. The minimum inhibitory concentration of the CcEO was determined for the evaluation of antibacterial activity against multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The antibiotic-modulating activity of the oil, in combination with antibiotics, was also evaluated. The combination of the CcEO with penicillin, norfloxacin and gentamicin presented a synergistic effect. This effect was more significant for the association with antibiotics of the quinolone and aminoglycoside classes against *Escherichia coli*. The association of oil with gentamicin showed better results with regard to the Gram-positive strain. The association of the oil with norfloxacin against *P. aeruginosa* also showed synergism, but the association with penicillin did not change the effect of this antibiotic. Thus, it is concluded that *C. ceanothifolius* essential oil selectively potentiates the action of antibiotics against multiresistant strains.

Keywords: antibiotics; bacterial resistance; *Croton ceanothifolius*; essential oils

1. Introduction

The use of plants therapeutic purposes is an ancient practice. The therapeutic properties of medicinal plants have been attributed to the presence of secondary metabolites [1], which besides playing critical physiological roles in these organisms, interfere with pharmacological targets in humans and many other species. Therefore, medicinal plants are relevant sources of new molecules with potential for use in drug development [2].

The family Euphorbiaceae consists of a great diversity of widely distributed species. There are about 7600 species and approximately 300 genera in this family, which, due to biological diversity, has aroused the interest of researchers worldwide [3,4]. The genus *Croton* stands out for presenting a large number of species in tropical and subtropical regions [5] and for its extensive use in traditional medicine in communities of Asia, Africa, and South America [6]. In Brazil, *Croton* species have been used empirically mainly to treat inflammatory [7] and infectious [8,9] diseases.

The popular use of this genre led to the development of scientific research to validate its actions. Some species of the genus *Croton* have been tested against multiresistant bacteria and both their direct antibacterial activity of their essential oil and the modifying activity of antibiotic action have been proven [10,21].

Staphylococcus aureus has been reported as one of the most common causative agents of nosocomial infections. Although commonly found in the skin and nasopharynx of healthy individuals, this microorganism can cause serious illness in immunocompromised individuals. In addition, the raise of cases of antibiotic resistance involving *S. aureus* highlights its importance in the context of multidrug resistance [10].

Resistance to antibacterial drugs has become an alarming public health problem. Recent studies have shown a growing number of infections caused by resistant bacteria, which cause infections in hospitals and communities [11]. A study by Da Silva et al. [12] analyzing more than 300 samples showed that half of them contained multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*.

Therefore, given the importance of developing novel drugs to treat infections caused by multiresistant bacteria and considering the therapeutic potential of the genus *Croton*, this study aimed to evaluate the antibacterial and modulatory activities of *Croton ceanothifolius* Baill. A phytochemical characterization was also carried out to identify the major secondary metabolites and direct future studies with isolated constituents of this species.

2. Results and Discussion

C. ceanothifolius essential oil yielded 0.23% of the total weight of dried leaves. After analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS) 25 constituents were identified, including bicyclogermacrene (26.3%), germacrene D (14.7%), and E-caryophyllene (11.7%) as major components (Table 1).

Table 1. Chemical constituents identified in the *Croton ceanothifolius* essential oil.

RIa	RIb	Constituent	%
932	937	alpha-pinene	2.8
974	979	beta-pinene	0.8
988	992	Myrcene	0.8
1030	1034	1,8-cineole	0.9
1050	1050	(E)-beta-ocimene	0.8
1095	1100	Linalool	1.7
1174	1178	terpinen-4-ol	0.9
1374	1375	alpha-copaene	1.4
1389	1390	beta-elemene	4.2
1417	1417	(E)- caryophyllene	11.7
1439	1432	alpha-guaiene	0.9
1452	1451	alpha-humulene	2.4
1458	1458	allo-aromadendrene	1.6
1485	1479	germacrene D	14.7
1494	1493	Bicyclogermacrene	26.3
1508	1501	germacrene A	4.7
1522	1521	delta-cadinene	1.3
1577	1574	Spatulenol	2.7
1582	1580	caryophyllene oxide	2.7
1592	1587	Viridiflorol	1.3
1600	1598	Rosifoliol	1.3
1618	1611	1,10-di-epi-cubebol	7.4
1638	1638	epi-alpha-cadinol	2.9
1652	1652	alpha-cadinol	2.9
1770	1761	Squamulosone	0.9
TOTAL (%)			100

RIa: Literature retention index, RIb: Calculated retention index.

Compared with literature data, these results suggest that species of the genus *Croton* may have similar chemical compositions. Studies with *C. pallidulus*, *C. isabelli*, *C. ericoides* [13], *C. argyrophylloides*, and *C. sincorensis* [14] showed a predominance of sesquiterpenes as found in *C. ceanothifolius* essential oil. Moreover, these species presented the same major components, indicating that the relative

composition of the constituents can also be conserved among the species of this genus. Importantly, Souza et al. [14] proved that climate variation affects the production of secondary metabolites since the concentration of specific metabolites varied as a function of seasonality. The genus *Croton* has been widely investigated in several areas of biology. However, the species *C. ceanothifolius* remains poorly studied. Thus, this study is a pioneer in the chemical characterization and identification of the pharmacological activity of this species.

Essential oils are volatile, aromatic, low molecular weight lipophilic substances. Studies have shown that, at low concentrations, these substances have antibacterial activity [15,16], besides presenting the potential to modulate antibiotic resistance. Therefore, the present study evaluated the antibacterial and modulating potential of *C. ceanothifolius* essential oil. Analyzing the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of CcEO against multidrug resistant bacteria, we found values greater than 1024 $\mu\text{g/mL}$ against all strains evaluated, indicating that the oil did not present clinically relevant antibacterial activity. A similar result was obtained by Leite et al. [17], studying the antibacterial activity of *Croton limae* essential oil.

Studies show that natural products without antibacterial activity can potentiate the effect of certain antibiotics, which is known as synergism [18]. The *C. ceanothifolius* essential oil is characterized by the presence of bicyclogermacrene, germacrene D and caryophyllene sesquiterpenes as major compounds (Table 1). Earlier studies using the disk diffusion method showed that caryophyllene inhibited the growth of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli* [19].

Sesquiterpenes are known to have a direct action on the bacterial outer membrane, causing direct lysis or modifying its selective permeability. Our data, however, suggest that CcEO does not act directly, which raises the hypothesis that it may alter the membrane permeability by enhancing the effect of antibiotics [20]. As shown in Figure 1, CcEO showed an antibiotic-modulating activity that varied according to bacterial strain and type of drug.

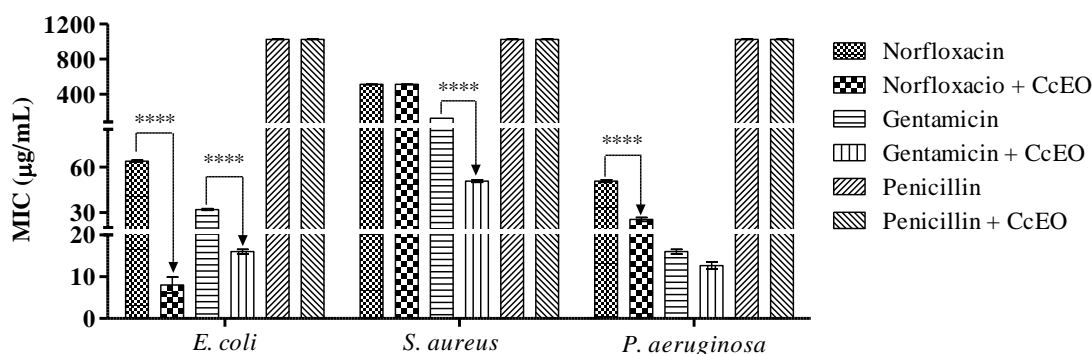


Figure 1. Antibiotic-Modulating effect of *Croton ceanothifolius* (CcEO) essential oil against multidrug resistant bacteria. **** Statistical Significance $p < 0.0001$

The association of 188 μL of the essential oil with gentamicin caused a synergistic effect against all strains tested. The MIC of this antibiotic was reduced from 128 to 50 $\mu\text{g/mL}$ against *S. aureus* and

from 32 to 16 µg/mL against *E. coli* tests. In tests with *P. aeruginosa* CcEO decreased gentamicin MIC from 16 µg/mL to 12 µg/mL, but in this case, there was no statistical difference. Accordingly, Vidal et al. [21] demonstrated that *C. rhamnifolioides* essential oil reduced gentamicin MIC against multidrug-resistant *S. aureus* and *E. coli* strains. In addition, Da costa et al. [9] found that *C. rhamnifolioides* essential oil exhibits antibacterial activity against Gram-positive strains. *C. zehntneri* also showed modifying the effect of antibiotic action against strains of *S. aureus* and *E. coli* [22]. These studies corroborate the data obtained in the present research and highlight the genus *Croton* for its antibacterial potential.

Following the characterization of the antibiotic-modulating activity, the CcEO was tested against two Gram-negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*) and one Gram-positive strain (*S. aureus*). Our data indicate that the oil has stronger activity against Gram-negative bacteria. Interestingly, these strains have a natural drug resistance profile due to the lipopolysaccharide layer, which hinders the permeability of these substances. Our tests demonstrated that the CcEO potentiated the action of gentamicin and norfloxacin, which act within the bacterial cell, suggesting that *C. ceanothifolius* essential oil facilitated the permeability of these drugs to the bacterial cytoplasm [23].

On the other hand, CcEO failed to modulate penicillin activity under all conditions tested, suggesting an effect that is related to the mechanism of action of this antibiotic. In this case, bacterial resistance is caused by the action of β -lactamases, enzymes that hydrolyze the functional component of penicillin-class drugs. Many bacteria today have acquired this resistance mechanism mainly due to the indiscriminate use of these antibiotics [24]. Here, we suggest that while CcEO has facilitated drug entry (due to increased permeability), penicillinases continue to degrade its β -lactam ring, causing enzymatic inactivation.

3. Materials and Methods

3.1. Plant Material

Leaves of *Croton* specimens were collected in the Butugua Private Natural Heritage Reserve (RPPN) in the municipality of Palmeira, PR, located at 25° 20.884 'S and 049°47.258' W. This region has altitudes ranging from 985 to 1,145 m, with predominantly Litossol and Cambisol soils [25]. According to the Köppen classification, the climate is Cfb type, temperate, with mild summer, annual average temperatures of 17 °C, with severe and frequent frosts and an average rainfall of 1,200 mm per year.

The collection and transportation of the plant material were carried out under a license issued by the Paraná Environmental Institute under registration number 284/11. In the collection area, the coordinates were recorded, and a voucher specimen prepared for botanical identification and photographic registration. The voucher specimen was transported to the "Faculdades Integradas Espíritas" Herbarium and registered under protocol number HFIE 8.288.

3.2. Essential Oil Extraction and Analysis

The essential oil of the leaves was extracted by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus. Briefly, the dried leaves (50 g) were crushed and placed in a 5.0 L glass flask containing 1L of distilled water, with three repetitions. This material was extracted at boiling temperature for 2.5 hours. After extraction, the oil was collected with a precision pipette and stored under refrigeration until testing.

The chemical composition of the oil was analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS) in a Shimadzu apparatus. The essential oil was diluted in dichloromethane at a rate of 1% and 1.0 µL of the solution was injected, with 1:20 flow division in an Agilent 6890 (Palo Alto, CA) chromatograph coupled to an Agilent 5973N selective mass detector. The injector was kept at 250 ° C. The separation of the constituents was obtained by HP-5MS capillary column (5% -phenyl-95% -dimethylpolysiloxane, 30 mx 0.25 mm x 0.25 µm) and using helium as carrier gas (1.0 mL min⁻¹). The oven temperature was set at 60 to 240 ° C at a rate of 3 ° C min⁻¹. The mass detector was operated in electronic ionization mode (70 eV) at a rate of 3.15 scan⁻¹ and mass range from 40 to 450 u. The transfer line was maintained at 260° C, the ion source at 230° C and the analyzer (quadrupole) at 150° C.

For quantification, the diluted sample was injected into an Agilent 7890A chromatograph equipped with a flame ionization detector (DIC), operated at 280 ° C. Employed the same column and analytical conditions described above, except for the carrier gas used, which was hydrogen, at a flow rate of 1.5 mL min⁻¹. The percentage composition was obtained by the electronic integration of the DIC signal by dividing the area of each component by the total area (area%). Identification of components was performed by comparing their mass spectra with the standards reported in the literature [26].

3.3. Bacterial Strains

Multiresistant strains of *S. aureus* 10, *P. aeruginosa* 24 e *E. coli* 06, were used throughout this study (Table 2).

Table 2. Resistant profile of the Strains

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

Subtitle: Amc- Amoxicillin + Clavulanic acid, Ami- Amikacin, Amox– Amoxicillin, Amp –Ampicillin, Asb - Ampicillin + Sulbactam, Azi – Azithromycin, Ca - Cefadroxil; Cef – Cephalexin, Cfo- Cefoxitin,

Cip – Ciprofloxacin, Cla – Clarithromycin, Clin – Clindamycin, Cmp- Cefepime, Cro- Ceftriaxone, Ctz-Ceftazidime, Eri – Erythromycin, Imi- Imipenem, Lev- Levofloxacin, Mer- Meropenem, Mox – Moxifloxacin, Oxa – Oxacillin, Pen – Penicillin e Ptz- Piperacillin

3.4. Preparation of the Essential Oil Solution

An aliquot of 10 mg of *Croton ceanothifolius* essential oil was dissolved in 1 mL DMSO. Soon after the first dilution, this solution was transferred to a falcon tube and an additional 8.765mL of sterile distilled water added, making a total of 9.765mL of solution to a concentration of 1024 µg/mL. This solution was used for minimum inhibitory concentration (MIC) tests and evaluation of the antibiotic-modulating activity in association with Norfloxacin (quinolone), Penicillin (penicillin) and Gentamycin (aminoglycoside) at an initial concentration of 1024 µg/mL.

3.5. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Bacterial strains were seeded in Petri dishes containing Heart Infusion Agar (HIA) and kept in the oven at 37 °C for 24h for growth. After this time, an aliquot of the culture was diluted in test tubes containing sterile saline in triplicate to obtain inocula. The turbidity of the solution was compared to a 0.5 McFarland scale control. A volume of 100 µL of each inoculum (corresponding to 10% of the total solution) was added to a tube containing 900 µL of 10% Brain Heart Infusion (BHI) [27] and then, 100 µL of these solutions were transferred to 96-well plates. The volume of each well was supplemented with 100 µL of the essential oil added after serial dilution at concentrations ranging from 512 µg/mL to 8 µg/mL. All treatments were performed in triplicate.

The plates were incubated at 35 ± 2 °C for 24 h and bacterial growth revealed by the addition of resazurin at 20 µg/mL for 1h at room temperature. The MIC was visually determined as the lowest concentration capable of inhibiting microbial growth, as attested by the change in color to red [28].

3.6. Evaluation of the Antibiotic-modulating activity

Volumes of 100 µl of each antibiotic at a concentration of 1024 µg/mL were serially diluted in wells containing 10% BHI and suspensions of the multidrug resistant inocula and essential oil at a subinhibitory concentration (MIC / 8) [29]. Controls were prepared by using 1350 µL of 10% BHI medium and 150 µL of the inoculum. Each well of a microdilution plate was filled with 100 µL of the oil or control solution. Following this procedure, serial dilutions with 100 µL the antibiotics at concentrations ranging between 512 and 0.5 µg/mL were carried out. The plates were incubated in an oven at 35 °C for 24 h, and then, the MIC of these antibiotics in the presence of the essential oil was

determined by the addition of resazurin and interpreted as described above.

3.7. Statistical analysis

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

4. Conclusions

C. ceanothifolius essential oil does not have a clinically relevant antibacterial activity but has a significant modifying effect on the antibacterial action of some drugs, potentiating their effects against multiresistant bacteria. This is the first study to report the pharmacological properties of this species and, therefore, further studies are fundamental to determine the constituents as well as the mechanisms involved in modulating antibiotic resistance exerted by *C. ceanothifolius* essential oil.

Author Contributions: Conceptualization, Wanderlei do Amaral, Cícero Deschamps, Marcello Iriti, Sara Vitalini and Henrique Douglas Melo Coutinho; Formal analysis, Ana Carolina Justino de Araújo, Priscilla Ramos Freitas, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa, D.F. Muniz, Janaína Esmeraldo Rocha, J.B.A Neto, Maria Milene Costa da Silva, R.L.S. Pereira, Jaime Ribeiro-Filho and Saulo Tintino; Funding acquisition, Talysson Felismino Moura, Marcello Iriti, Sara Vitalini and Henrique Douglas Melo Coutinho; Investigation, Ana Carolina Justino de Araújo, Priscilla Ramos Freitas, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa, D.F. Muniz, Janaína Esmeraldo Rocha, J.B.A Neto, Maria Milene Costa da Silva, Talysson Felismino Moura, R.L.S. Pereira, Jaime Ribeiro-Filho and Luiz E. da Silva; Project administration, Henrique Douglas Melo Coutinho; Resources, Wanderlei do Amaral, Cícero Deschamps and Henrique Douglas Melo Coutinho; Supervision, Wanderlei do Amaral, Cícero Deschamps, Marcello Iriti and Henrique Douglas Melo Coutinho; Validation, Talysson Felismino Moura, R.L.S. Pereira, Jaime Ribeiro-Filho and Saulo Tintino; Visualization, Luiz E. da Silva, Saulo Tintino, Marcello Iriti and Sara Vitalini; Writing – original draft, Ana Carolina Justino de Araújo, Priscilla Ramos Freitas, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa, Janaína Esmeraldo Rocha, Maria Milene Costa da Silva and Luiz E. da Silva; Writing – review & editing, Wanderlei do Amaral, Cícero Deschamps, Marcello Iriti, Sara Vitalini and Henrique Douglas Melo Coutinho.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Oliveira, C.F. de; Morey, A.T.; Biasi-Garbin, R.P.; Perugini, M.R.E.; Yamauchi, L.M.; Yamada-Ogatta, S.F. Emergência de *Staphylococcus aureus* resistentes aos antimicrobianos: um desafio contínuo. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.* **2015**, *13*, 242-247.
2. Almeida Neto, J.R.; De Barros, R.F.M.; Silva, P.R.R. Uso de plantas medicinais em comunidades rurais da Serra do Passa-Tempo, estado do Piauí, Nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Bioci.* **2015**, *13*, 165-175.
3. Randau, K.P. Pharmacognostic study of *Croton rhamnifolius* HBK and *Croton rhamnifolioides* Pax & K.Hoffm.(Euphorbiaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* **2004**, *14*, 89-96.
4. Mwine, J.T.; Van Damme, P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 652-662.
5. Salatino, A.; Salatino, M.L.F.; Negri, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 11-33.
6. Canelo, L.I. Chemical constituents of a population of *Croton gratissimus* Euphorbiaceae. *Quím. Nova* **2017**, *40*, 1035-1038.
7. Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Veiga, J.V.; Grynberg, N.F.; Echevarria, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím. nova* **2002**, *25*, 429-438.
8. Girondi, C.M.; Oliveira, A.B; Prado, J.A; Koga-ito, C.Y.; Borges, A.C.; Delbem, A.C.B.; Pereira, D.F.A.; Salvador, M.J.; Brighenti, F.L. Screening of plants with antimicrobial activity against enterobacteria, *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus* spp. *Future microbiol.* **2017**, *12*, 671-681.
9. Da Costa, A.C.V.; do Amarante Melo, G.F.; Madruga, M.S.; da Costa, J.G.M.; Junior, F.G.; Neto, V.Q. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of a *Croton rhamnifolioides* leaves Pax & Hoffm. *Semin. Ciênc. Agrár.* **2013**, *34*, 2853-2863.
10. Costa, J.G.M. da; Rodrigues, F.F.; Angélico, E.C.; Pereira, C.K.; Souza, E.O.D.; Caldas, G.F.; Silva, M.R.; Santos, N.K.A. Mota, M.L.; Santos, P.F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). *Rev. Braz. Farmacognosia.* **2008**, *18*, 583-586.
11. Viegas, V.; Amaral, L.; Matos, C.; Nascimento, O. Infecção por *Staphylococcus aureus*. *Acta Ped. Portugal Soc. Portugal Ped.* **2010**, *41*, 79-81.
12. Gopalakrishnan, R.; Sureshkumar, D. Mudanças nas tendências de suscetibilidade a antimicrobianos e infecções adquiridas em hospitais por um período de 8 anos em um hospital terciário em relação à introdução de um programa de controle de infecções. *J Assoc Physicians Índia* **2010**, *58*, 25-31.
13. Da Silva, G. V. T. R. Gonçalves, T.G.; Júnior, J.D.C.; Paniágua, N.C.; Teles, C.B.G. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **2013**, *34*, 117-123.
14. Vunda, S.L.L.; Sauter, I.P.; Cibulski, S.P.; Roehe, P.M.; Bordignon, S.A.L.; Rott, M.B. Apel, M.A; Poser, G.L. Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. *Parasitol. Res.* **2012**, *111*, 961-966.
15. Souza, A.V.V.; Britto, D.; Santos, U.S.; Bispo, L.P.; Turatti, I.C.C.; Lopes, N.P. Influência da estação do ano, temperatura de secagem e tempo de extração na produção e composição química do óleo essencial de 'marmeleiro' (*Croton sonderianus*). *Rev. Ess. Oil Res.* **2017**, *29*, 76-84.
16. Pierozan, M.K.; Pauletti, G.F.; Rota, L.; dos Santos, A.; Lerini, L.A.; Di Luccio, M. et al. Caracterização química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies de *Sálvia* L. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2009**, *29*, 764-770.

17. Morais, S.M.; Dantas, J.D.A.P.; da Silva, A.R.A.; Magalhães, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 169-177.
18. Leite, T.R.; Silva, M.A.P.; Santos, A.C.B.; Coutinho, H.D.M.; Duarte, A.E.; Costa, J.G.M. Análise antimicrobiana, modulatória e química do óleo de *Croton limae* *Pharm. Biol.* **2015**, *55*, 2015-2019.
19. Figueredo, F.G.; Ferreira, E.O.; Lucena, B.F.; Torres, C.M.; Lucetti, D.L.; Lucetti, E.C.P.; Silva, J.M.F.L.; Santos, F.A.V.; Medeiros, C.R.; Oliveira, G.M.M.; Colares, A.V.; Costa, J.G.M.; Coutinho, H.D.M.; Menezes, I.R.A.; Silva, J.C.F.; Kerntopf, M.R.; Figueiredo, P.R.L.; Matias, E.F.F. Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* A.C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 640682.
20. 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.
21. Stojanović-radić, Z.; Čomić, L.; Radulović, N.; Blagojević, P.; Denić, M.; Milojević, A.; Rajković, J.; Mihajilov-Krstev, T. Antistaphylococcal activity of *Inula helenium* L. root essential oil: eudesmane sesquiterpene lactones induce cell membrane damage. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *31*, 1015-1025.
22. Vidal, C.S.; Oliveira-Tintino, C.D.M.; Tintino, S.R.; Galvão, H.B.F.; da Costa, J.G.M.; Coutinho, H.D.M.; de Menezes, I.R.A. Chemical composition, antibacterial and modulatory action of the essential oil of *Croton rhamnifolioides* leaves Pax and Hoffman. *Biosci. J.* **2016**, *32*, 1632-1643.
23. Sarto, M.P.M.; Junior, G.Z. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. *Uningá Rev.* **2014**, *20*, 98-102.
24. Coutinho, H.D.M.; Matias, E.F.F.; Santos, K.K.A.; Tintino, S.R.; Souza, C.E.S.; Guedes, G.M.M.; Santos, F.A.D.; Costa, J.G.M.; Falcão-Silva, V.S.; Siqueira-Júnior, J.P. Enhancement of the norfloxacin antibiotic activity by gaseous contact with the essential oil of *Croton zehntneri*. *J. Young Pharm.* **2010**, *2*, 362-364.
25. Tortora, G.J.; Case, C.L.; Funke, B.R. *Microbiologia*, 12th ed.; Artmed Editora: Porto Alegre, Brazil, 2016.
26. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Sistema brasileiro de classificação de solos*, 2nd ed.; Embrapa/Centro Nacional de Pesquisa de Solos: Rio de Janeiro, Brazil, 2006.
27. Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*, 4th ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 2007.
28. Coutinho, H.D.M.; Matias, E.F.; Santos, K.K.; Santos, F.A.; Morais-Braga, M.F.B.; Souza, T.M. et al. Modulação da resistência à norfloxacin em *Staphylococcus aureus* por *Croton campestris* A. e *Ocimum gratissimum* L. *Biomédica* **2011**, *31*, 608-612.
29. Salvat, A.; Antonnacci, L.; Fortunato, R.H.; Suárez, E.Y.; Godoy, H.M. Screening of some plants from North Argentina for their antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* **2001**, *32*, 293-297.
30. 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.

5 CONCLUSÃO

Na análise química das espécies estudadas foi observado uma maior prevalência de terpenos, na sua maioria mono e sesquiterpenos. Como resultado da avaliação química do óleo essencial de *Mikania cordifolia* (OEMc) foram identificadas 13 substâncias onde o composto mais prevalente foi o limoneno. A avaliação química do óleo essencial de *Croton ceanothifolius* (OECc), 25 componentes foram constatados, entre eles o biciclogermacreno, considerado o composto majoritário.

Na análise da atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente as bactérias multirresistentes, tanto o OEMc quanto OECc não mostraram efeito inibitório em nenhuma das concentrações testadas. Este é o primeiro estudo que se propôs a mostra o potencial antibacteriano e modificadora da ação antibiótica das duas espécies.

Nos ensaios com os antibióticos pode ser identificado um sinergismo entre norfloxacino e os óleos essenciais de ambas as plantas frente a *P. aeruginosa* e, frente a *Staphylococcus aureus* os óleos reduziram a CIM de gentamicina. Frente a *Escherichia coli* os óleos essenciais de *M. cordifolia* e *C. ceanothifolius* reduziram a concentração inibitória mínima de gentamicina e norfloxacino. Com o último fármaco mencionado, a redução foi significativa ao ponto de reverter o perfil de resistência desse antibiótico diante de *Escherichia coli*.

Os óleos essenciais associados a gentamicina aumentaram seu potencial de inibição de crescimento bacteriano frente a de *Pseudomonas aeruginosa*. Também associado à gentamicina, o OECc obteve efeito sinérgico reduzindo sua concentração inibitória mínima quando avaliado contra *Staphylococcus aureus*.

O composto majoritário de *M. cordifolia*, limoneno, reverteu o perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* à gentamicina, reduziu também a CIM de norfloxacino diante dessa bactéria. Perante as bactérias Gram-negativas houve um antagonismo, tratando-se de limoneno e norfloxacino o efeito aconteceu contra *P. aeruginosa*, e com gentamicina frente a *E. coli*.

A maior parte dos efeitos modificadores de ação antibiótica foi observado frente as bactérias Gram-negativas. Esses resultados são importantes principalmente por que essas bactérias têm resistência intrínseca a alguns fármacos devido à sua membrana extra de lipopolissacarídeos, dessa forma essas substâncias podem auxiliar futuramente na terapêutica de pacientes infectados por estas bactérias.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, P. *et al.* Detecção molecular de cepas de *Escherichia coli* difusamente aderentes associadas à diarreia em Shiraz, Irã. **Arquivos de Doenças Infecciosas Pediátricas**, v. 5, n. 2, 2016.
- AGOSTINI-COSTA, T. da S. *et al.* Effect of accessions and environment conditions on coumarin, o-coumaric and kaurenoic acids levels of *Mikania laevigata*. **Planta Medica**, v. 82, n. 1, p. 1431–1437, 2016.
- AMBLER, RP *et al.* Um esquema de numeração padrão para os beta-lactamases de classe A. **Revista Bioquímica**, v. 276, n. 1, p. 269, 1991.
- AUSINA RUIZ, V. *et al.* **Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. Buenos Aires. 2006.
- BARBOSA, L. N. *et al.* Propriedades antibacterianas e químicas in vitro de óleos essenciais, incluindo plantas nativas do Brasil, contra bactérias patogênicas e resistentes. **Journal of oleo Science**, v. 64, n. 3, p. 289-298, 2015.
- BERLINCK, R. G. de S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 27-30, 2012.
- BHATTACHARYA, S.; BIR, R.; MAJUMDAR, T. Avaliação do *Staphylococcus aureus* resistente a múltiplas drogas e sua associação com a produção de biofilme em um hospital de atendimento terciário, Tripura, nordeste da Índia. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 9, n. 9, p. 1-4. 2015.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. **Brasília: ANVISA**, p. 126, 2011.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Pediatria: prevenção e controle de infecção hospitalar. **Brasília: ANVISA**, p. 116, 2006.
- BRASIL, D. do S. B. *et al.* Essential Oil Composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from North Brazil. **Jornal Brazilian de Chemical**, v. 20, n. 3, p. 1188-1192, 2009.
- BRASIL, The Brazil Flora Group - BFG. Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, v. 69, p. 1519-1527, 2018.
- BRITO, S. S. da S. *et al.* *Croton argyrophyllus* Kunth e *Croton heliotropiifolius* Kunth: caracterização fitoquímica e propriedades bioativas. **Culturas e Produtos Industriais**, v. 113, p. 308-315, 2018.
- CALIXTO, C. M. F.; CAVALHEIRO, É. T. G. Penicilina: efeito do acaso e momento histórico no desenvolvimento científico. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 3, p. 118-123, 2012.
- CAMPOS, M. C. O. *et al.* *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1193- 1204, 2010.

- CARDOSO, A. G. *Mikania (asteraceae, eupatorieae) no estado da Bahia*. 2017. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2017.
- CORDEIRO, I. S. *et al.* *Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Acesso em: 31 de março de 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB35787>>.
- COSTA, J. G. M. da *et al.* Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 583-586, 2008.
- COUTINHO, H. D. M. *et al.* Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.
- CRUZ, R. C. D. **Avaliação do potencial inseticida das folhas de *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) sobre o *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e toxicológica sobre *Mus musculus* (Rodentia: Muridae)**. 2016. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Itapetinga, 2016.
- DE BRITO, M. A.; CORDEIRO, B. C. Necessidade de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 4, p. 247-249, 2012.
- DE MORAES, I. C.; VILLARROEL, S. L.; PEREIRA, V. C. Detecção de resistência à metecilina e aos macrolídeo em *Staphylococcus aureus* isolados de jaleco: **Colloquium Vitae**. v. 10, n. 3, p. 31-41. 2018.
- DEWAN, S. M. R. *et al.* Investigation of analgesic potential and in vitro antioxidant activity of two plants of Asteraceae family growing in Bangladesh. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 6, p. 599-603, 2013.
- DEAN, W. **A ferro e fogo – a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira**. Companhia das Letras, São Paulo, 2010.
- DUARTE, M. C. T. *et al.* Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197–201, 2007.
- FUNK, V. A. *et al.* **Sistemática, evolução e biogeografia de Compositae**. Associação Internacional de Taxonomia Vegetal, p. 171-189, 2009.
- GASPARETTO, J. C. *et al.* *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: agronomic, genetic, anatomical, chemical, pharmacological, toxicological studies and its use in herbal therapy programs in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 627-640, 2010.
- GELLATLY, S. L.; HANCOCK, E. W. R. *Pseudomonas aeruginosa*: novas idéias sobre patogênese e defesas do hospedeiro, **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p.159–173, 2013.
- GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Products Reports**, v. 21, n. 2, p. 263-277, 2004.

- GIL-PEROTIN, S. *et al.* Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. **Critical Care**, v. 16, n. 3, p. 93, 2012.
- GIULIETTI, A. M. *et al.* Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Magadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.
- KÖCK, R. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. 2010. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19688>>. Acesso em: 07 de outubro de 2019.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. **Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto y Atlas en Color/Text and Color Atlas**. 6ª ed. Buenos Aires. Médica Panamericana, 2008.
- KORB, A. *et al.* Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 13, p. 72-79, 2013.
- LAIRD, S. A. *et al.* **Biodiversity and Traditional Knowledge** – equitable partnerships in practice. Earthscan Publications Ltd., London & Sterling (USA), p. xxii. 2002.
- LANGTON, K. P.; HENDERSON, P. J. F.; HERBERT, R. B. Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism?. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 4, p. 439-451, 2005.
- LARA, F. *et al.* Marcadores de virulência e análise filogenética de cepas de *Escherichia coli* com genótipos híbridos EAEC / UPEC recuperados de casos esporádicos de infecções extra-intestinais. **Fronteiras em Microbiologia**, v. 8, p. 146, 2017.
- LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13ª ed. Porto Alegre. AMGH, McGraw Hill, 2016.
- LIEVIN, V. *et al.* Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. **Gut**, v. 47, n. 5, p. 646-652, 2000.
- LIMA, J. L. C. *et al.* Análise da produção de biofilme por isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, n. 3, p. 310-316, 2017.
- LIMA, L.R.; PIRANI, J.R. Taxonomic revision of *Croton* sect. *Lamprocroton* Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropical**, v.8, n. 2, p. 177-232, 2008.
- 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.
- LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial resistant *P. aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, n.4, p.582-610, 2009.

- LOPES, P. M. *et al.* Análise da frequência e do perfil de sensibilidade da *Escherichia coli* como agente causador de infecções do trato urinário na microrregião de viçosa, MG. **Anais Simpac**, v. 2, n. 1, p. 21-28, 2015.
- LOPES, I. T. de F. V. *et al.* **A tribo Eupatorieae Cass. (Asteraceae) no Parque Nacional do Caparaó, Espírito Santo/Minas Gerais, Brasil.** 2018. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.
- MANTHEY, C. F. *et al.* Os oligossacarídeos do leite humano protegem contra a ligação enteropatogênica de *Escherichia coli* in vitro e a colonização por EPEC em camundongos lactantes. **Revista de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica**, v. 58, n. 2, p. 165-168, 2014.
- MATHEWS, A. A. *et al.* Evaluation and comparison of tests to detect methicillin resistant *S. aureus*. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 79, 2010.
- MATOS, F. J.de A.; VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M. Guia fitoterápico. **Secretaria de Saúde do Ceará**, 2001.
- MELO, L. C. de. **Microbiota comensal de animais de companhia como reservatório de genes codificadores de b-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR).** 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2014.
- Mikania* in **Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB5451>>. Acesso em: 30 Mar. 2020
- MONIZ, S. B. *et al.* Prevalência de β -Lactamases de espectro estendido (ESBL) e Carbapenemases (KPC) em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* no Laboratório BMAC- Análise retrospectiva de 2011 a 2015. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 5, n. 1, p. 45-51, 2016.
- MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. *P. aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Front Cell Infect Microbiol**, v.7, p.39, 2017.
- MORAIS, S. M. *et al.* Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 2, p. 169-177, 2005.
- MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia Médica.** 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014, 888p.
- NAKHJAVANI, F. A. *et al.* Análise molecular de *Escherichia coli* enteropatogênica típica e atípica (EPEC) isolada de crianças com diarreia. **Jornal de Microbiologia Médica**, v. 62, n.2, p.191-195, 2013.
- OLIVEIRA, C. F. de *et al.* Emergência de *Staphylococcus aureus* resistentes aos antimicrobianos: um desafio contínuo. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 2, p. 242-247, 2015.
- OPLUSTIL C. P. *et al.* **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.** 3ª ed., São Paulo: Sarier, 2010.

- PASQUA, M. *et al.* A intrigante jornada evolutiva de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) em direção à patogenicidade. **Fronteiras em Microbiologia**, v. 8, p. 2390, 2017.
- PAYO, A. H. *et al.* Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Croton* L. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 35, n. 3, p. 203-206, 2001.
- PEREZ, F. *et al.* The continuing challenge of ESBLs. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, n. 5, p. 459-469, 2007.
- PIEROZAN, M. *et al.* Caracterização química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies de *Sálvia* L. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 764-770, 2009.
- POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Resistência emergente de amplo espectro em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*: mecanismos e epidemiologia. **Revista internacional de Agentes Antimicrobianos**, v. 45, n. 6, p. 568-585, 2015.
- RANDAU, K. P. *et al.* Pharmacognostic study of *Croton rhamnifolius* HBK and *Croton rhamnifolioides* pax & hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 89-96, 2004.
- RATES, S. M. K. **Toxicon: Plants as source of drugs**. 1. ed. Editora Elsevier. 2001.
- RAMOS, J. L. *et al.* Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, p. 743-768, 2002.
- REN, W. *et al.* Respostas imunes inatas intestinais de camundongos alteradas pela infecção enterotoxigênica de *Escherichia coli* (ETEC). **Micróbios e Infecção**, v. 16, n. 11, p. 954-961, 2014.
- RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 8, p. 1079-1081, 2008.
- RIOS, E. V. *et al.* Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha* and *Mikania cordifolia* and their cytotoxic and anti-inflammatory evaluation. **Fitoterapia**, v. 94, p. 155-163, 2014.
- RODRIGUES, F. F. G; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 1052-1055, 2009.
- RITTER, M.R., MIOTTO, S.T.S. Taxonomia de *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v. 32, n. 3, p. 309-359, 2005.
- RIBEIRO, D. S. *et al.* Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Seminário Ciências Agrárias**, v. 1, n. 1, p. 687-696, 2012.
- ROSA, M. do S. *et al.* Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.
- SILVA, L. B. da. **Incidência de infecções associadas a *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes internados em unidade de terapia intensiva**. 2016. (Especialização em

Microbiologia) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Biociência, Cuiabá, 2016.

SILVA, M. S. P. *et al.* Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: Contribution to the control of microorganisms. **Evid-Based Complement Alternat Medicine**, v. 2012, n. 1, p. 6, 2012.

SILVA, J. J. da *et al.* In vitro screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linne and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 333-340, 2014.

SILVA, V. A., *et al.* Antimicrobial efficacy of the extract of *Croton sonderianus* Mull. On bacteria that cause dental caries. **Revista de Odontologia UNESP**, v. 40, n. 2, p. 69-72, 2011.

SILVA, M. M. da *et al.* **Estudo da composição Química do óleo essencial de *Lippia microphylla* CHAM em três anos diferentes e atividade antioxidante.** 2016. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Roraima. 2016.

SILVEIRA, L.; MARQUES, A.; MACHADO, J. Patotipos de *Escherichia coli* associados a infecções entéricas entre 2002-2012. **Instituto Nacional de Saúde**. n. 8, p. 20-22, 2013.

SANTOS, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, M. C; RIBEIRO, M. Bactérias de relevância clínica e seus mecanismos de resistência no contexto das infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS). **Revista Científica UMC**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2016.

SANTOS, G. G. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjerição frente a bactérias de carnes bovinas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 4, p. 529-536, 2011.

SPANO, L. C. *et al.* Alta prevalência de *Escherichia coli* diarreio gênica com genes codificadores de toxinas isolados de crianças e adultos no sudeste do Brasil. **Doenças infecciosas de BMC**, v. 17, n. 1, pág. 773, 2017.

SUÁREZ, B. T. *et al.* Susceptibilidad antimicrobiana y mecanismos de resistencia de *Escherichia coli* aisladas a partir de urocultivos en un hospital de tercer nivel. **Revista Cubana de Medicina**, v. 53, n. 1, p. 3-13, 2014.

STEINER, J. *et al.* Bees and melittophilous plants of secondary Atlantic forest habitats at Santa Catarina Island, southern Brazil. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 16-39, 2010.

STEFANI, S. *et al.* Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 4, p. 273-282, 2012.

TABARELLI, M. *et al.* Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 132-138, 2005.

TAMARIZ, J. H. O. *et al.* Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. **Revista Medica Herediana**, v. 14, n. 2, p. 81-88, 2003.

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

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ªed. São Paulo. Atheneu, 2008.

VIANA, A. P. P. *et al.* Incidência bacteriana em hemoculturas de recém-nascidos e perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos. **Revista Biologia e Farmacologia**, v. 5, n. 1, p. 102-110, 2011.

VIDAL, C. S. *et al.* Chemical composition, antibacterial and modulatory action of the essential oil of *Croton rhamnifolioides* leaves Pax and Hoffman. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 6, 2016.

VIRGÍNIO, T. B. *et al.* Utilização de plantas medicinais por pacientes hipertensos e diabéticos: estudo transversal no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 31, n. 4, 2018.

UENO, V. A. *et al.* **Comparação dos compostos voláteis de duas espécies de guaco (*Mikania glomerata* Sprenguel e *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker) e os potenciais biológicos de seus óleos essenciais.** 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo, 2018.

WANDERLEY, M. C. P. **Ocorrência de *Escherichia coli* resistente a antimicrobianos em diferentes sítios corporais em uma população diversa de gatos saudáveis.** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2015.

WERTHEIM, H. F. L. *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet infectious diseases**, v. 5, n. 12, p. 751-762, 2005.

WHO, World Health Organization. **WHO Model Formulary 2008.** World Health Organization, Geneva, 2009.

ZAFALON, L. F. *et al.* Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, n. 67, v. 2, p.118-125, 2008.

ZENI, A. L. B. *et al.* Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 2703-2712, 2017.