

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Faculdade de Farmácia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Leonardo de Paiva Belo

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Ocimum gratissimum* EM ASSOCIAÇÃO COM  
ANTIBIÓTICOS**

**Juiz de Fora  
2015**

**LEONARDO DE PAIVA BELO**

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Ocimum gratissimum* EM ASSOCIAÇÃO COM  
ANTIBIÓTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como pré-requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Hitomi Yamamoto

**Juiz de Fora  
2015**

Dedico a todas as pessoas que acreditaram  
e me apoiaram nesta nova conquista.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar força e tranquilidade para enfrentar este novo desafio.

Aos meus pais, Antônio Couto de Araújo Belo e Maria Marta de Paiva Belo por sempre me apoiarem em todos os momentos me dando serenidade nos momentos difíceis e positividade para vencer os obstáculos da vida.

A minha filha Eloah D. Belo pela alegria, amor e confiança que sempre depositou em mim.

Aos meus irmãos Valéria Belo Franco e Marco Túlio de Paiva Belo pela convivência do lar, amizade e apoio em todos os momentos.

A minha noiva Flávia Costa de Moraes pela virtude de seu companheirismo, dedicação me dando conforto e amor transformando os momentos difíceis em conquistas reais.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora e professores pelo ensinamento e disponibilidade para tornar possível este sonho.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Hitomi Yamamoto, pelo apoio e presteza, disponibilizando o Laboratório de Controle de Qualidade para o desenvolvimento das análises, direcionando com sabedoria e experiência todas as etapas de realização deste projeto.

À Fundação Oswaldo Cruz pela doação das cepas de micro-organismos utilizadas nas análises.

“Eu creio em mim mesmo.  
Creio nos que trabalham comigo,  
creio nos meus amigos e creio na minha família.  
Creio que Deus me emprestará tudo que necessito para triunfar,  
contanto que eu me esforce para alcançar com meios lícitos e honestos.  
Creio nas orações e nunca fecharei meus olhos para dormir,  
sem pedir antes a devida orientação a fim de ser paciente com os outros  
e tolerante com os que não acreditam no que eu acredito.  
Creio que o triunfo é resultado de esforço inteligente,  
que não depende da sorte, da magia, de amigos,  
companheiros duvidosos ou de meu chefe.  
Creio que tirarei da vida exatamente o que nela colocar.  
Serei cauteloso quando tratar os outros, como quero que eles sejam comigo.  
Não caluniarei aqueles que não gosto.  
Não diminuirei meu trabalho por ver que os outros o fazem.  
Prestarei o melhor serviço de que sou capaz, porque jurei  
a mim mesmo triunfar na vida, e sei que o triunfo é sempre resultado  
do esforço consciente e eficaz. Finalmente, perdorei os que me ofendem,  
porque compreendo que às vezes ofendo os outros e necessito de perdão.”

*Mahatma Gandhi*

## RESUMO

A associação de óleos essenciais (OE) com substâncias antibacterianas tem demonstrado relevante eficácia sobre a inibição do crescimento de microorganismos. Neste estudo, foi avaliada a ação inibitória do OE obtido das folhas frescas de *Ocimum gratissimum* (*O. gratissimum*) em associação com discos de teste de sensibilidade a antimicrobianos, frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, empregando o método de difusão em ágar descrito por Oliveira et al (2006). Os antibióticos avaliados foram: ampicilina, amoxicilina-ácido-clavulânico; penicilina-G; oxacilina; cefalotina; cefoxitina; ceftazidima; cefuroxime; cefepime; eritromicina; ciprofloxacino; vancomicina; tetraciclina; cloranfenicol; clindamicina; amicacina; gentamicina; rifampicina; sulfazotrim; meropenem. Os resultados obtidos demonstraram atividade sinérgica de inibição do crescimento microbiano do OE associado a rifampicina, ciprofloxacino e tetraciclina sobre *S. aureus*; e, de cefepime e ciprofloxacino frente a *P. aeruginosa* nas concentrações presentes nos discos. Através da técnica do *Checkerboard* foi quantificada a redução da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ciprofloxacino e tetraciclina associado ao *O. gratissimum*. O ciprofloxacino associado a CIM do OE de *O. gratissimum* apresentou redução da CIM de 0,6 µg/mL para 0,076 µg/mL frente a *S. aureus* e de 0,03 µg/mL para 0,00119 µg/mL frente a *P. aeruginosa*. Enquanto, a tetraciclina em associação apresentou redução da CIM de 0,028 µg/mL para 0,0018 µg/mL para *S.aureus* e de 4 µg/mL para 0,93 µg/mL frente a *P. aeruginosa*. Dessa forma, o OE de *O. gratissimum* demonstrou aumento da atividade antibacteriana dos antibióticos avaliados. No entanto, vale ressaltar que o estudo foi realizado por métodos de ensaios *in vitro*, necessitando a confirmação dos resultados por meio de modelos experimentais *in vivo*, que possibilitem a ratificação dos resultados com maior confiabilidade.

Palavras-chave: *Ocimum gratissimum*, Alfavaca, óleo essencial, sinergismo, antibióticos, método *Checkerboard*

## ABSTRACT

The combination of essential oils (EO) with antibacterial substances has shown significant efficacy for inhibiting the growth of microorganisms. In this research, we evaluated the inhibitory action of EO obtained from fresh leaves of *Ocimum gratissimum* (*O. gratissimum*) in association with antimicrobial *susceptibility testing disks* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, using the agar diffusion method described by Oliveira et al (2006). We evaluated the following antibiotics: ampicillin, amoxicillin clavulanic acid; penicillin G; oxacillin; cephalothin; cefoxitin; ceftazidime; cefuroxime; cefepime; erythromycin; ciprofloxacin; vancomycin; tetracycline; chloramphenicol; clindamycin; amikacin; gentamicin; rifampin; sulfazotrim; meropenem. The obtained results showed synergistic activity of microbial growth inhibition of the EO associated with rifampin, ciprofloxacin and tetracycline against *S. aureus*; and, cefepime and ciprofloxacin against *P. aeruginosa* in these concentrations in discs. Through *Checkerboard* technique it was quantified the reduction of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of ciprofloxacin and tetracycline associated with the *O. gratissimum*. Ciprofloxacin associated with the MIC of EO of *O. gratissimum* decreased the MIC from 0.6 µg/mL to 0.076 µg/mL against *S. aureus* and 0.03 µg/mL to 0.00119 µg/mL against *P. aeruginosa*. While tetracycline in combination decreased the MIC from 0.028 µg/mL to 0.0018 µg/mL for *S. aureus* and from 4 µg/mL to 0.93 µg/mL against *P. aeruginosa*. Thus, the EO of *O. gratissimum* demonstrated increased antibacterial activity of the evaluated antibiotics. However, it is noteworthy that the study was conducted by *in vitro* test methods, requiring confirmation of results from experimental models *in vivo*, enabling the ratification of the results with greater reliability.

Keywords: *Ocimum gratissimum*, Basil, essential oil, synergism, antibiotic, method *Checkerboard*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FOTOGRAFIA DA PLANTA <i>OCIMUM GRATISSIMUM</i> (ALFAVACA-CRAVO) CULTIVADO NO HORTO DA FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA .....	22
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. GRATISSIMUM</i> .....	24
FIGURA 3 - ESQUEMA DA DISTRIBUIÇÃO DOS POÇOS PARA DETERMINAÇÃO DA CIM ATRAVÉS DO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM PLACA DE ELISA.....	34
FIGURA 4 - ESQUEMA DAS DILUIÇÕES SUCESSIVAS NOS POÇOS DAS COLUNAS N <sup>o</sup> 10,11 E 12 NO TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM PLACAS NA ORIENTAÇÃO VERTICAL.....	35
FIGURA 5 - DETERMINAÇÃO DA CIM DO ÓLEO DE <i>O. GRATISSIMUM</i> PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM MICROPLACA CONTRA <i>S. AUREUS</i> , EVIDENCIADO PELO TTC 2% .....	40
FIGURA 6 - DETERMINAÇÃO DA CIM DO ÓLEO DE <i>O. GRATISSIMUM</i> PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM MICROPLACA CONTRA <i>P. AERUGINOSA</i> , EVIDENCIADO PELO TTC 2%.....	40
FIGURA 7 - ANTIBIOGRAMA COM OS HALOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO PARA OS ANTIBIÓTICOS TESTADOS EM MEIO DE CULTURA TSA, INOCULADO COM 1% DA SUSPENSÃO DE <i>S. AUREUS</i> ATCC 6538 .....	43
FIGURA 8 - ANTIBIOGRAMA COM OS HALOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO PARA OS ANTIBIÓTICOS ASSOCIADOS A CIM DO OE DE <i>O. GRATISSIMUM</i> TESTADOS EM MEIO DE CULTURA TSA, INOCULADO COM 1% DA SUSPENSÃO DE <i>S. AUREUS</i> ATCC 6538 .....	43
FIGURA 9 - ANTIBIOGRAMA COM OS HALOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO PARA OS ANTIBIÓTICOS TESTADOS EM MEIO DE CULTURA TSA, INOCULADO COM 1% DA SUSPENSÃO DE <i>P. AERUGINOSA</i> ATCC 25619 .....	45

FIGURA 10 - ANTIBIOGRAMA COM OS HALOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO PARA OS ANTIBIÓTICOS ASSOCIADOS A CIM DO OE DE <i>O. GRATISSIMUM</i> TESTADOS EM MEIO DE CULTURA TSA, INOCULADO COM 1% DA SUSPENSÃO DE <i>P. AERUGINOSA</i> ATCC 25619 .....	45
FIGURA 11 - DETERMINAÇÃO DA FIC DO OE FRENTE A <i>S. AUREUS</i> ATCC 6538 EVIDENCIADO PELO TTC 2 % - DILUIÇÃO DO OE DE <i>O. GRATISSIMUM</i> NA ORIENTAÇÃO HORIZONTAL ASSOCIADO A CIM DO CIPROFLOXACINO (C, D, E) E CIM TETRACICLINA (F, G E H).....	47
FIGURA 12 - DETERMINAÇÃO DA FIC DO OE FRENTE A <i>P. AERUGINOSA</i> ATCC 25619 EVIDENCIADO PELO TTC 2 % - DILUIÇÃO DO OE DE <i>O. GRATISSIMUM</i> NA ORIENTAÇÃO HORIZONTAL ASSOCIADO A CIM DO CIPROFLOXACINO (C, D, E) E CIM TETRACICLINA (F, G E H).....	47
FIGURA 13 - DETERMINAÇÃO DA FIC DOS ANTIBIÓTICOS FRENTE A <i>S. AUREUS</i> ATCC 6538 EVIDENCIADO PELO TTC 2 % - DILUIÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS NA ORIENTAÇÃO HORIZONTAL CIPROFLOXACINO (C, D, E) E CIM TETRACICLINA (F, G E H) ASSOCIADO A CIM DO ÓLEO DE <i>O. GRATISSIMUM</i> .....	49
FIGURA 14 - DETERMINAÇÃO DA FIC DOS ANTIBIÓTICOS FRENTE A <i>P. AERUGINOSA</i> ATCC 25619 EVIDENCIADO PELO TTC 2 % - DILUIÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS NA ORIENTAÇÃO HORIZONTAL CIPROFLOXACINO (C, D, E) E CIM TETRACICLINA (F, G E H) ASSOCIADO A CIM DO ÓLEO DE <i>O. GRATISSIMUM</i> .....	49

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS QUIMIOTIPOS DE <i>OCIMUM GRATISSIMUM</i> .....	23
TABELA 2 - MICROBIOTA NORMAL E LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA.....	25
TABELA 3 - MICRO-ORGANISMOS PREVALENTES EM INFECÇÕES NOSOCOMIAIS .....	26
TABELA 4 - MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS .....	27
TABELA 5 - RESULTADOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. GRATISSIMUM</i> E FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS SOBRE <i>S. AUREUS</i> ATCC 6538 .....	42
TABELA 6 - RESULTADOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OE DE <i>O. GRATISSIMUM</i> E FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS SOBRE <i>P. AERUGINOSA</i> ATCC 25619 .....	44
TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA FRACIONADA (FIC) E ÍNDICE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (FICI) DO ÓLEO DE <i>O. GRATISSIMUM</i> COMBINADO COM ANTIBIÓTICOS .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$  – microlitro

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Infusão de Cérebro e Coração

CG-FID – Cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização em chama

CG-MS – Cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas

CIM – concentração inibitória mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FIC – Concentração inibitória fracionada

FICI – Índice da concentração inibitória fracionada

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

mL – mililitro

$^{\circ}\text{C}$  – grau Celsius

OE – Óleo essencial

TSA – ágar triptona de soja

TTC- cloreto de trifenil tretrazólio

UFC – Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
2.1 A importância do uso de plantas medicinais .....	16
2.1.2 Biotransformação do metabolismo secundário de plantas.....	17
2.2 Óleos essenciais de plantas medicinais.....	18
2.2.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais .....	20
2.3 Componentes químicos e atividade biológica do <i>Ocimum gratissimum</i> L.....	21
2.3.1 Composição química do óleo essencial de <i>O. gratissimum</i> .....	23
2.4 Descrição da microbiota normal e infecção oportunista .....	25
2.4.1 Mecanismos de resistência bacteriana .....	26
2.5 Sinergismo da associação de óleos essenciais com antibióticos.....	28
2.6 Métodos <i>in vitro</i> para avaliar ação antimicrobiana da associação entre antibióticos.....	29
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Objetivo geral .....	31
3.2 Objetivos específicos .....	31
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1 Obtenção do óleo essencial .....	32
4.2 Micro-organismos.....	32
4.3 Avaliação da atividade antibacteriana .....	32
4.3.1 Preparo da suspensão bacteriana padronizada .....	32
4.3.2 Preparo da solução estoque do óleo essencial .....	33
4.3.3 Avaliação da interferência do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> sobre o efeito de antibióticos .....	33
4.3.4 Determinação da concentração inibitória mínima.....	33
4.3.4 Estudo da interferência do óleo essencial sobre a atividade inibitória do crescimento microbiano de antibióticos por técnica de difusão em ágar .....	36
4.3.5 Índice da concentração inibitória fracionada .....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>

5.1 Avaliação da interferência do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> sobre o efeito de antibióticos .....	38
5.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de <i>O. gratissimum</i> ...	38
5.1.2 Estudo da interferência do óleo essencial sobre a atividade de antibióticos por técnica de difusão em ágar.....	41
5.1.3 Índice da concentração inibitória fracionada .....	46
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais possuem propriedades terapêuticas sendo extensamente utilizadas nas comunidades com o objetivo de melhorar a saúde (OLIVEIRA et al, 2006). Há um crescente número de pesquisas no intuito de comprovar o uso popular de plantas medicinais, contribuindo para o seu uso seguro (COSTA, 2002; AZEVEDO et al 2014).

A investigação farmacológica de plantas medicinais para o tratamento de doenças tem sido considerada prioridade pela OMS (OLIVEIRA et al, 2013). Nos últimos anos, ocorreu um aumento nas pesquisas de novos fármacos provenientes de plantas medicinais, os estudos têm se concentrado em tratamentos terapêuticos e preventivos para diversas doenças (CARNEIRO et al, 2014).

Um dos fatores que mais contribuiu para a pesquisa do potencial bioativo de plantas é a problemática da resistência dos antibióticos convencionais adquiridas por diversos micro-organismos (FREITAS et al, 2014). A resistência antimicrobiana, ocasionada pelo uso indiscriminado de antibióticos, tornou-se o principal problema de saúde pública no mundo (SANTOS, 2004). A existência de patógenos multirresistentes necessita que novos agentes antimicrobianos sejam investigados, tais como os óleos essenciais (DUARTE et al, 2012, RIBEIRO et al, 2013).

Neste contexto têm se destacado o estudo da atividade antimicrobiana apresentada pelos OE como agentes de inibição do crescimento microbiano, sendo esta atividade muitas vezes atribuída aos terpenóides oxigenados (DUARTE et al, 2007; BASSOLE e JULIANI, 2012). Os óleos essenciais (OE) são produtos naturais de plantas possuindo uma mistura complexa de componentes e, assim, apresentam diversas aplicações terapêuticas.

A associação de antibióticos com OE contra bactérias resistentes pode ampliar o espectro antimicrobiano (YAP et al, 2013). A avaliação do sinergismo entre antibióticos e extratos vegetais têm sido investigada pelos métodos de *Checkerboard*, *Time-Kill Curves* (TKC) e disco difusão (NETTO, 2013; ROZATTO, 2012; MEDEIROS, 2012, DUARTE et al, 2012; MALIK et al, 2011).

O OE da espécie de *Ocimum gratissimum* (*O. gratissimum*), popularmente conhecido como alfavaca cravo, tem sido investigado devido às suas propriedades

farmacológicas destacando-se a atividade antimicrobiana, frente a bactérias e fungos patogênicos (ADJOU et al, 2013; DAMBOLENA et al, 2010; DUBEY et al, 2000; FRANCO et al, 2007).

Matias et al (2011) investigaram a associação de extratos obtidos das folhas de *O. gratissimum* com antibióticos aminoglicosídeos (amicacina, canamicina, gentamicina e neomicina), frente às linhagens multirresistente de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Foi verificado que ocorreu a modificação da resistência bacteriana, reduzindo consideravelmente a concentração inibitória mínima desses antibióticos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a influência na ação antimicrobiana do óleo essencial das folhas frescas de *O. gratissimum* associado com antibióticos sobre as cepas de *S. aureus* ATCC 6538 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619, empregando os métodos difusão em ágar e *Checkerboard*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A importância do uso de plantas medicinais

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática terapêutica da humanidade (JUNIOR et al, 2005). O uso de fitoterápicos com finalidade profilática e curativa passou a ser reconhecido oficialmente em 1978 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (BRASIL, 2006).

No século XIX o empirismo da alquimia foi suplantado pela química experimental, que permitiu a síntese laboratorial de novas substâncias orgânicas. À medida que derivados mais puros se tornaram disponíveis, os médicos passaram a priorizar as drogas sintéticas desconsiderando o papel importante da fitoterapia (FRANÇA et al, 2008).

A fitoterapia constitui uma forma de medicina que vem crescendo visivelmente ao longo dos últimos anos um fator que pode estar contribuindo para este progresso consiste na evolução dos estudos científicos, particularmente os estudos químicos e farmacológicos, que comprovam a eficácia das plantas medicinais (BRASIL, 2006)

Há uma crescente busca por produtos oriundos de plantas medicinais, com o intuito de obter novas substâncias ativas com propriedades farmacológicas relevantes. A atividade biológica de uma planta medicinal pode ser atribuída a constituintes majoritários. Porém, substâncias presentes em menor concentração podem influenciar qualitativamente e quantitativamente a resposta terapêutica (COSTA, 2002).

Estima-se que no Brasil, cerca de 82% da população brasileira utiliza produtos à base de plantas medicinais. A partir da década de 80, diversas ações e programas de fitoterapia foram implantados na rede pública de saúde, destacando a Resolução Ciplan, 1988, que regulamentou a prática da fitoterapia no serviço público (BRASIL, 2015). A Política Nacional traz como objetivo “garantir à população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2011).

As plantas medicinais são utilizadas em várias áreas da saúde como forma alternativa de tratamento (DUARTE et al, 2004). Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico. No entanto, as observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, despertando o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, que enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural (MACIEL et al, 2002).

No Brasil, diretrizes do Ministério da Saúde determinaram prioridades na investigação das plantas medicinais e implantação da fitoterapia como prática oficial da medicina, incentivando à pesquisa, desenvolvimento do uso sustentável da biodiversidade, desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006; SANTOS et al, 2011). Os principais instrumentos norteadores para o desenvolvimento das ações/programas com plantas medicinais e fitoterapia são: a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, com diretrizes e linhas de ação para “Plantas Medicinais e Fitoterapia no SUS”; e a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos”, com abrangência da cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2012).

Para drogas vegetais foi elaborada a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 14/2010 que estabelece sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, estabelece três formas pelas quais devem ser comprovadas a eficácia e a segurança dos medicamentos fitoterápicos: estudos pré-clínicos e clínicos, sustentação na literatura enumerada na Instrução Normativa 05/2010 da ANVISA e tradicionalidade de uso (FIGUEREDO et al, 2014).

### 2.1.2 Biocompostos do metabolismo secundário de plantas

O metabolismo secundário de espécies vegetais, geralmente, está associado a mecanismos de defesa. As substâncias produzidas normalmente não se encontram em estado puro, mas sob a forma de fitocomplexos cujos componentes podem interagir, formando preparados vegetais que podem possuir efeitos medicinais (KANZLER, 2013).

Não se sabe ao certo o que controla a formação dos metabólitos secundários, porém, foi relatado que as condições de estresse, concentração de enzimas e

substrato podem influenciar a produção (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Normalmente, o início do metabolismo secundário é frequentemente ligado ao estágio de desenvolvimento da planta, ocasionando mudanças morfológicas e citológicas (PIETERS e VLIETINCK, 2005). Os biocompostos produzidos são divididos de acordo com a sua estrutura química nos seguintes grupos: alcalóides, fenóis e terpenos.

Os alcalóides são compostos alcalinos que possuem três características importantes: são solúveis em água, possuem um ou mais átomos de nitrogênio e exibem uma forte atividade biológica. Os alcalóides são sintetizados normalmente a partir de aminoácidos comuns, como lisina, tirosina e triptofano (CANHOTO, 2010).

Os compostos fenólicos são produtos naturais que possuem um grupo hidroxila (-OH) ligado diretamente a um anel aromático e, com frequência, são componentes dos óleos essenciais, sendo responsável pelo aroma e sabor. Vários pigmentos comuns nas plantas são derivados fenólicos, facilitando a atração de polinizadores e dispersão de sementes (ATKINS e JONES, 2010; CAREY, 2008). Duas rotas bioquímicas estão implicadas em seu metabolismo, a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido mevalônico (DEWICK, 2002).

Os terpenos e seus derivados formam o grupo mais abundante de metabólitos secundários, são usados como flavorizantes e comumente estão presentes na composição dos óleos essenciais (CAREY, 2008; CANHOTO, 2010). Os terpenóides são sintetizados nas plantas pela junção de, pelo menos, duas unidades moleculares, cada uma com cinco átomos de carbono. Estas unidades são conhecidas como isoprenos. A classificação dos terpenos é baseada no número de unidade de isopreno, assim, os monoterpenos possuem duas unidades de isopreno (10 átomos de carbono), enquanto os sesquiterpenos possuem três unidades de isopreno (15 átomos de carbono) (CANHOTO, 2010).

## 2.2 Óleos essenciais de plantas medicinais

Os óleos essenciais são designados como essências devido sua propriedade flavorizante, sendo empregados nas indústrias de perfumaria, medicamentos e cosméticos (COSTA, 2002). Esses metabólitos secundários são importantes na

proteção das plantas, pois podem atuar como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros (SIMÕES et al, 2000).

As essências são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, líquidas, geralmente de aroma agradável e apresentam composição química, característica físico-química e odores bem distintos (SIMÕES et al, 2000). Encontram-se em estruturas especializadas das plantas, nas flores e folhas, sendo menos frequente em raízes e rizomas (CUNHA et al, 2004).

A composição química das essências apresenta grande variação dentro de uma mesma espécie (KANZLER, 2013). Fatores como clima, época de colheita, secagem e métodos extrativos também podem contribuir para a alteração na constituição dos componentes químicos do óleo essencial da mesma espécie (COSTA, 2002).

Os constituintes dos OEs são divididos em duas classes químicas distintas, terpenóides e fenilpropanóides. Embora os terpenos sejam encontrados com maior frequência e abundância na maioria dos óleos, são os fenilpropanóides responsáveis pela propriedade flavorizante.

A análise do OE pode ser realizada através de métodos clássicos e técnicas analíticas modernas. O método clássico é baseado nas características físicas e químicas das essências, como densidade relativa, índice de refração, solubilidade, cor e odor (BRASIL, 2010). O método clássico não tem sido empregado como método independente e deve ser combinado com técnicas de analíticas modernas, especialmente cromatografia gasosa (CG), para a avaliação da autenticidade (COSTA, 2002). A cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS) tem sido amplamente utilizada como técnica analítica para avaliação dos constituintes dos óleos voláteis.

A aplicação terapêutica dos OEs é muito variada e abrange quase todos os sistemas do organismo, o que permite sua aplicação na aromaterapia, prática muito difundida na Europa, especialmente na França e na Inglaterra (KANZLER, 2013). A aromaterapia é usada para aliviar a dor crônica, ansiedade, insônia, depressão, estresse e para tratar alguns distúrbios cognitivos (CECHINEL-FILHO, 2012). Os OEs também apresentam significativa atividade antimicrobiana consistindo em um benefício adicional em sua utilização como tempero em alimentos e utilização antisséptica (HUI, 2007).

### 2.2.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Os fármacos aromáticos são frequentemente utilizados para a destruição de agentes causadores de infecções, como bactérias, fungos, vírus, insetos e parasitas. O uso tópico tem sido empregado para a desinfecção de feridas. Durante a Primeira Guerra Mundial, a essência de niauli serviu como antisséptico de ferimentos produzidos em combate (COSTA, 2002).

O OE tem demonstrado grande potencial antibacteriano, sendo atribuído a pequenos terpenóides e compostos fenólicos (DUARTE et al, 2007). Os monoterpenos podem agir ao comprometer a integridade da função da membrana celular microbiana, permitindo o extravasamento dos componentes intracelulares e inibindo a respiração celular (GREAY e HAMMER, 2011). Os fenilpropanóides possuem um amplo espectro de ação, a atividade antimicrobiana é conferida pelos grupos hidroxilas livres sendo variável pelo número e tipos de substituintes presentes (NAZARRO et al, 2013).

Em um estudo realizado por Devi et al (2013), verificou-se que o eugenol, um fenilpropanóide, apresentou atividade bactericida contra *Proteus mirabilis*, formando poros na membrana celular e assim, alterando a sua permeabilidade, permitindo o extravasamento dos constituintes intracelulares resultando na morte celular.

A atividade antimicrobiana pode ser avaliada através de métodos *in vitro* para investigar a bioatividade dos óleos essenciais, dentre estes destacam os métodos microbiológicos tradicionais, como os métodos de difusão em ágar e diluição em caldo (GREAY e HAMMER, 2011).

As diferenças com respeito às técnicas empregadas para investigação da ação da atividade dos compostos de plantas e a variação encontrada na composição química de algumas preparações vegetais, podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas. Além disso, não existe também um consenso sobre os níveis de inibição aceitáveis para compostos de plantas, quando comparados com antibióticos padrões (DUARTE et al, 2007).

### 2.3 Componentes químicos e atividade biológica do *Ocimum gratissimum* L.

O *Ocimum gratissimum* L. é popularmente conhecido como alfavaca ou manjeriço pertence ao gênero *Ocimum* e à família Lamiaceae, compreende ervas e arbustos nativos das regiões tropicais e sub-tropicais da Ásia, África e América do Sul (HILTUNEN e HOLM, 2005; PADALIA et al, 2013). Há duas variedades de *Ocimum gratissimum* L., descritas como *O. gratissimum* L. var. *gratissimum* e *O. gratissimum* var. *macrophyllum* Briq., porém por apresentarem um complexo polimórfico a diferenciação morfológica é dificultada. Contudo, estudo das variações genéticas dos óleos essenciais obtidos de *O. gratissimum* têm demonstrado a presença de três diferentes quimiotipos: eugenol, timol e citral (BASER e BUCHBAUER, 2010).

O quimiotipo eugenol é facilmente distinguível pelo aroma que lembra o cravo-da-índia, possui as flores e frutículos dispostos em numerosas inflorescências eretas típicas do gênero (FRANCO et al, 2007) (Figura 1). Estudos têm apontado que a concentração de eugenol do óleo essencial é variável com o horário de colheita. Silva et al (1999) verificaram que a concentração de eugenol variou de 90,6 a 98,0 % no óleo essencial quando a coleta das folhas foi realizada entre 11 às 13 horas. Foi demonstrado que o teor de eugenol reduz durante a secagem, entretanto, os teores de trans-bergamoteno, linalol e 1,8-cineol aumentam significativamente (LUZ et al, 2009).



Figura 1- Fotografia da planta *Ocimum gratissimum* (alfavaca-cravo) cultivado no Horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora

Popularmente a alfava cravo tem sido utilizada sob a forma de infusão para tratamento de resfriado, como diurético, desinfetante e inseticida. Na Ásia é utilizado para dores abdominais (DUARTE et al 2007, DAMBOLENA et al, 2010). Estudos demonstraram uma potencial atividade anestésica, antinociceptiva, antioxidante e antimicrobiana contra bactérias e fungos (ADJOU et al, 2013; DAMBOLENA et al, 2010; FRANCO et al 2007; SILVA et al, 2012; NGUEMTCHOUIN et al, 2012) (Tabela 1).

Os extratos obtidos de *O. gratissimum* também tem apresentado atividade biológica significativa. Verificou-se que extrato aquoso das folhas apresentou atividade antiviral *in vitro*, inibindo a replicação dos vírus HIV-1 e HIV-2 (AYISI e NYADEDZOR et al, 2003). O estudo do extrato etanólico e frações demonstrou atividade antioxidante, apresentando maior atividade a fração de acetato de etila (OUYNG et al, 2013). O extrato metanólico apresentou atividade hipoglicemiante em ratos wistar machos com diabetes induzidas por aloxano, reduzindo os níveis de

glicose no sangue em 56% em ratos saudáveis e 69% em diabéticos na dose de 400 mg/ kg intraperitoneal (AGUIYI et al, 2000)

Tabela 1 - Atividade biológica dos quimiotipos de *Ocimum gratissimum*

Quimiotipo	Farmacógeno	Concentração do constituinte majoritário	Atividade biológica	Referência
Eugenol	Folhas	70,1 %	Antifúngico contra <i>Fusarium</i> <i>Verticillioides</i> Antioxidante	DAMBOLENA et al, 2010
	Flores	33,2%		
Eugenol	Folhas	73,6%	Anestésico	SILVA et al, 2012
Eugenol	Folhas	57,0%	Antibacteriano contra <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>E. coli</i> O: 158, <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708	FRANCO et al, 2007
Eugenol	Folhas	67,17%	Antinociceptivo	PAULA-FREIRE et al, 2013
Timol	Folhas	26,9%	Antifúngico contra <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>F. oxysporium</i>	ADJOU et al, 2013
Timol	Folhas	53,9%	Bioinseticida	NGUEMTCOUIN et al, 2012
Citral	Folhas	-	Antifúngico contra <i>C. albicans</i>	ADJOU et al, 2013

### 2.3.1 Composição química do óleo essencial de *O. gratissimum*

O OE de *O. gratissimum* utilizado neste estudo foi avaliado em um estudo anterior por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG-MS) e através de Cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID), tendo sido identificados os constituintes químicos e sua composição percentual, respectivamente (MORAES et al, 2014).

Através da análise do óleo de *O. gratissimum* foram identificados 10 componentes, sendo constituintes majoritários o eugenol (72,56%) e o cis- $\beta$ -ocimeno (18,98%), correspondendo a 91,54% da composição total do óleo (Figura 2). Os dados referentes as análises encontram-se no Apêndice A.

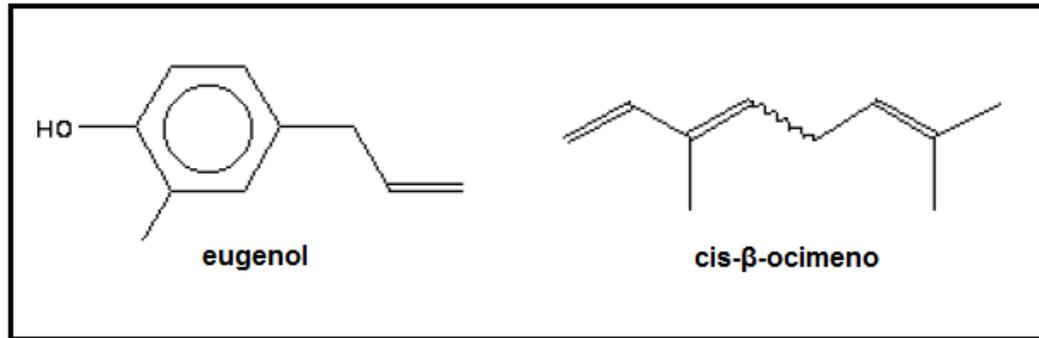


Figura 2- Estrutura química dos constituintes majoritários do óleo essencial de *O. gratissimum*

O estudo da composição química do OE faz-se necessário para a identificação correta da espécie estudada e possível correlação dos constituintes com a atividade biológica. Segundo Matasyoh et al (2006) as espécies do gênero *Ocimum* sofrem abundante polinização cruzada, contribuindo para uma maior diversidade de sub-espécies, que diferem quanto a alterações na composição do OE e características morfológicas.

Verificou-se que no presente estudo a análise do OE de *O. gratissimum* quimiotipo eugenol a maior concentração dos componentes encontrava-se composta por fenilpropanóide, seguida dos monoterpénos. Os dados referentes as análises encontram-se no Apêndice A. Segundo Dewick (2002) muitos óleos podem conter compostos aromáticos e terpênicos, porém geralmente apenas há o predomínio de um grupo.

Os fenilpropanóides apresentam promissora atividade antibacteriana, como a vanilina, safrol, cinamaldeido, eugenol e isoeugenol. Ao passo que, a maioria dos terpenos não possuem atividade antimicrobiana significativa. No entanto, o mecanismo de ação dos OE contra bactérias depende da sua composição química, não podendo a atividade antimicrobiana ser atribuível há um único mecanismo e composto presente, mas a uma cascata de reações que envolve toda a célula bacteriana (NAZZARO et al, 2013).

## 2.4 Descrição da microbiota normal e infecção oportunista

A microbiota normal refere-se às bactérias ou leveduras que habitam os indivíduos normais e saudáveis, sem causar doença, fornecendo uma proteção contra patógenos microbianos (JAWETZ et al, 2012). No entanto, sob certas condições do hospedeiro como sistema imunológico debilitado ou ao micro-organismo acessar outras regiões do corpo fora de sua localização anatômica, podem contribuir para que a microbiota possa provocar infecções oportunistas (TORTORA et al, 2010). Os micro-organismos da microbiota normal estão presentes nas superfícies corpóreas expostas ao meio ambiente (Tabela 2) (LEVINSON, 2010).

Tabela 2 - Microbiota normal e localização anatômica

Localização	Micro-organismos prevalentes	Micro-organismos menos frequentes
Pele	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>P. aeruginosa</i> , anaeróbios ( <i>Propionibacterium</i> ), <i>Candida albicans</i>
Nariz	<i>Staphylococcus aureus</i> *	<i>S. epidermidis</i> , <i>Corynebacterium</i> , vários estreptococos
Boca	Estreptococos do grupo viridians	Vários estreptococos, <i>Eikenella corrodens</i>
Placa dental	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>
Garganta	Estreptococos do grupo viridians	Vários estreptococos, espécies de <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus influenza</i>
Cólon	<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	<i>Eubacterium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
Vagina	<i>Lactobacillus</i> , <i>E.coli</i> *	Bacilos Gram-negativos, <i>B. fragilis</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>C. albicans</i>
Uretra	_____	<i>S. epidermidis</i> , <i>Corynebacterium</i> , bacilos Gram-negativos

\*não pertence à microbiota desta localização, porém são importantes colonizadores (adaptado LEVINSON, 2010)

As bactérias que constituem a microbiota humana formam o principal grupo de patógenos que causam infecções hospitalares e, geralmente, os sítios de infecção hospitalar mais frequentemente atingidos são o trato urinário, feridas cirúrgicas e trato respiratório. Os patógenos que apresentam maior prevalência nas infecções hospitalares encontram-se descritos na Tabela 3 (BRASIL, 2004).

Tabela 3- Micro-organismos prevalentes em infecções nosocomiais

<b>Patógeno</b>	<b>Sítios comuns de isolamento do patógeno</b>
<b>Bactérias Gram-negativas</b>	
<i>Escherichia coli</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Pseudomonas sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, queimadura
<i>Klebsiella sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Proteus sp</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas
<i>Enterobacter sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Serratia sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<b>Bactérias Gram-positivas</b>	
<i>Streptococcus sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
<b>Fungi</b>	
<i>Candida albicans</i>	Trato urinário, sangue

(adaptado BRASIL, 2004)

A *E. coli* geralmente é inofensiva enquanto permanece no intestino delgado do hospedeiro, porém ao acessar outras regiões do corpo como o trato urinário, pulmões, medula espinhal ou feridas, pode causar infecções urinárias, infecções pulmonares, meningites ou abscessos (TORTORA et al, 2010).

O *Staphylococcus epidermidis* é um importante causador de infecções em válvulas cardíacas artificiais e próteses articulares. *S. aureus* também está presente na pele, embora seu principal sítio seja o nariz e quando presente em lesões pode causar abscessos na pele e em vários outros órgãos (LEVINSON, 2010).

A *P. aeruginosa* causa diversas infecções nosocomiais graves, com elevada letalidade (FIGUEIREDO et al, 2007).

#### 2.4.1 Mecanismos de resistência bacteriana

A resistência aos fármacos antimicrobianos consiste na capacidade adquirida por um organismo de tornar-se insensível aos efeitos de um agente quimioterápico, ao qual ele é normalmente susceptível. A infecção causada em função da resistência microbiana tornou-se o principal problema de saúde pública no mundo, resultante do uso indiscriminado de antibióticos em humanos e animais, podendo desenvolver-se como uma consequência natural dos micro-organismos se adaptarem (SANTOS, 2004).

Os mecanismos de resistência adquiridos pelos micro-organismos podem ser divididos em diferentes categorias como: o organismo ser desprovido da estrutura inibida pelo quimioterápico; o antibiótico apresentar baixa permeabilidade ao organismo; o antibiótico pode ser modificado a uma forma inativa; ocorrência de mutação alterando o alvo biológico ou desenvolver uma via bioquímica resistente; e, capacidade de bombear para fora um antibiótico que está entrando na célula, um processo denominado efluxo. Na Tabela 4 estão citados os mecanismos de resistência apresentados por bactérias com o uso de antibióticos utilizados clinicamente (MADIGAN et al, 2010).

Tabela 4- Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos

<b>Mecanismo de resistência</b>	<b>Exemplo de antibiótico</b>	<b>Base genética da resistência</b>	<b>Mecanismo presente em</b>
Redução da permeabilidade	Penicilinas	Cromossomal	<i>P. aeruginosa</i> Bactérias entéricas
Inativação do antibiótico	Penicilinas	Plasmidial e cromossomal	<i>S. aureus</i> Bactérias entéricas <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	Cloranfenicol		<i>S. aureus</i> Bactérias entéricas
	Aminoglicosídeo	Plasmidial	<i>S. aureus</i>
Alteração do alvo	Eritromicina	Cromossomal	<i>S. aureus</i>
	Rifamicina		Bactérias entéricas
	Estreptomicina		
	Norfloxacina		<i>S. aureus</i> Bactérias entéricas
Desenvolvimento de uma via bioquímica resistente	Sulfonamidas	Cromossomal	<i>S. aureus</i> Bactérias entéricas
Efluxo	Tetraciclina	Plasmidial	Bactérias entéricas
	Cloranfenicol	Cromossomal	<i>S. aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>
	Eritromicina	Cromossomal	<i>Staphylococcus spp.</i>

Em um estudo realizado por Garcia et al (2013) foi traçado o perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias resistentes a antibióticos, em um hospital no norte de Minas Gerais, encontrando com maior frequência as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Óleos essenciais e extratos de plantas têm sido investigados quanto ao seu potencial como novos antimicrobianos para o tratamento de doenças infecciosas por possuírem propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais. Os OEs em combinação com outros agentes antimicrobianos podem potencializar a eficácia terapêutica (SANTOS e NOVALES, 2012).

## 2.5 Sinergismo da associação de óleos essenciais com antibióticos

Os óleos essenciais apresentam ação sinérgica de medicamentos, como antibióticos (COSTA, 2002). Esta ação tem sido investigada contra patógenos a fim de melhorar o efeito dos antibióticos atualmente disponíveis (DUARTE et al, 2012).

Oliveira et al. (2006) avaliaram a associação dos óleos essenciais de *Conyza bonariensis* L., *Lippia sidoides* Cham, *Plectranthus amboinicus* e *Eucalyptus citriodora* com antibióticos utilizados na clínica. Foi observado a presença de sinergismo principalmente nas interações com ampicilina, cefalotina e tetraciclina, contra as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. A combinação com gentamicina mostrou efeito antagônico na maioria das associações.

Rodrigues et al (2009) verificaram que o óleo essencial das folhas de *Croton zehntneri* associado com gentamicina contribuiu para o aumento da atividade em 42,8% contra *P. aeruginosa* ATCC 15442.

Zago et al (2009) avaliaram as possíveis interações entre os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon citratus*, *Mentha piperita*, *Zingiber officinale*, *Caryophyllus aromaticus* e *Rosmarinus officinalis* associados com drogas antibacterianas contra cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Verificou-se que o *S. aureus* foi o mais susceptível às interações quando comparado com a *E. coli* e que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresentou sinergismo com o maior número de drogas testadas. As drogas que mostraram maior índice de sinergismo com os vários óleos testados foram gentamicina, tetraciclina e ciprofloxacina, nos ensaios com *S. aureus* e cefepime nos ensaios com *E. coli*.

Malik et al (2011) verificaram um efeito sinérgico entre ciprofloxacina e o óleo essencial de *Pelargonium graveolens* contra os uropatógenos, *Klebsiella pneumoniae* KT2, *Proteus mirabilis* PRT3 e *S. aureus* ST2 implicados em infecções do trato urinário.

Duarte et al (2012) verificaram que o óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. apresentou melhora da eficácia antimicrobiana de ciprofloxacina, gentamicina, tetraciclina e cloranfenicol contra *Acinetobacter baumannii*.

A interação dos óleos essenciais com antibióticos usados na clínica possui a capacidade de exercer uma maior ou menor ação interferente sobre a atividade antibacteriana, seja através de um efeito sinérgico ou antagônico (OLIVEIRA et al, 2006). No entanto, ao exercerem uma atividade sinérgica podem constituir uma nova fonte terapêutica contra bactérias patogênicas resistentes.

Matias et al (2011) avaliaram a associação dos extratos metanólico e hexânico de *O. gratissimum* com aminoglicosídeos (amicacina, canamicina, gentamicina e neomicina), frente às linhagens multirresistente de *E. coli* e *S. aureus*. Em todos os casos ocorreu a modificação da resistência bacteriana com consequente redução da concentração desses antibióticos, destacando melhor sinergismo com o extrato hexânico.

## 2.6 Métodos *in vitro* para avaliar ação antimicrobiana da associação entre antibióticos

A terapia de combinação com antibióticos (ATBs) pode apresentar um efeito sinérgico além de melhorar a eficácia, proporcionam uma terapia de amplo espectro e previne o aparecimento de micro-organismos resistentes (DRAGO et al., 2007). Além disto, podem possibilitar a redução significativa da dose utilizada, contribuindo para a redução da toxicidade de alguns ATBs.

Para a avaliação *in vitro* da associação de agentes antimicrobianos, há três metodologias empregadas: Método de *E-test* (episilométrico), *Time-Kill Curves* (TKC) e Método de *Checkerboard*. Os métodos TKC e o *Checkerboard* são os mais utilizados para avaliar o sinergismo, têm sido aplicados para quantificar o efeito de combinações de agentes antimicrobianos no crescimento bacteriano, embora sejam mais trabalhosos e demorados (NETTO, 2013).

O método *Time-Kill* comprova o tempo em que a substância - teste leva para matar as células microbianas. É um ensaio que avalia o sinergismo de dois ou mais antimicrobianos que inibe o crescimento bacteriano dependente da concentração ou do tempo, avaliando desta forma a atividade bactericida. Os resultados são

expressos em log de UFC/mL. O sinergismo é definido como a diminuição da contagem de colônias em 24 horas comparado a combinação do agente isolado mais ativo (NETTO, 2013; ROZATTO, 2012; MEDEIROS, 2012).

O método de *Checkerboard* também conhecido como Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI), possibilita a avaliar o efeito da substância teste em combinação com um antimicrobiano, através da técnica de microdiluição. Para isto, é necessário obter a CIM (Concentração Inibitória Mínima) dos antibacterianos sozinhos e combinados, a partir destes dados são realizados cálculos para avaliar se houve sinergismo, antagonismo ou indiferença (DUARTE et al, 2007; DUARTE et al, 2012; MALIK et al, 2011; PALANIAPPAN e HOLLEY, 2010).

O método episilométrico tem sido empregado para avaliar a combinação sinérgica de ATB's, sendo semelhante à técnica de disco difusão. Este ensaio consiste em sobrepor, de forma entrecruzada fitas plásticas (E-test) impregnadas com concentrações crescentes dos antibióticos, na superfície de uma placa de ágar previamente inoculada com o micro-organismo teste. O efeito sinérgico é observado pela diminuição da CIM de ambos os antibióticos na zona da interseção de ambas as fitas (MEDEIROS, 2012).

O método de disco difusão modificado tem sido uma alternativa ao método episilométrico, constituindo também um método de fácil execução, contudo tem possibilitado a avaliação da interação de antibióticos e extratos ou óleos voláteis de plantas medicinais, permitindo estabelecer o efeito resultante em sinérgico, indiferente ou antagônico. Neste método são utilizados discos de papel de filtro contendo uma concentração fixa do antibiótico embebido com a CIM do extrato vegetal. Os discos são colocados em uma placa de *Petri* contendo o micro-organismo teste. Após o período de incubação das placas, o resultado é mensurado comparando os halos de inibição do crescimento microbiano do antibiótico isolado e do antibiótico associado à CIM do extrato ou óleo essencial (OLIVEIRA et al, 2006; ZAGO et al, 2009; RODRIGUES et al, 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Avaliar a influência da associação do óleo essencial das folhas frescas de *Ocimum gratissimum* com antibióticos sobre a ação inibitória do crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de *O. gratissimum* frente *S. aureus* e *P. aeruginosa*
- Verificar a interferência da associação do óleo essencial com antibióticos pelo método de difusão em ágar;
- Avaliar a interferência da associação do óleo essencial com antibióticos pelo método índice da concentração inibitória fracionada (FICI).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do óleo essencial

O óleo foi extraído das folhas frescas de *O. gratissimum*, em aparelho tipo Clevenger modificado, a coleta foi realizada às 11h, no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora no dia 23 de janeiro de 2014. A composição química do óleo obtido foi analisada por CG-MS e Cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização em chama (CG-FID), no Laboratório de Análise de Aromas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, o resultado da análise encontra-se no Anexo A.

### 4.2 Micro-organismos

Para os testes de atividade antibacteriana foram utilizadas as cepas de *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 25619, cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz.

### 4.3 Avaliação da atividade antibacteriana

Os ensaios da atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade da Universidade Federal de Juiz de Fora.

#### 4.3.1 Preparo da suspensão bacteriana padronizada

A suspensão do inóculo foi padronizada após a realização de um repique do micro-organismo em tubo de ensaio contendo ágar Triptona de soja (TSA), inclinado. O tubo foi incubado por cerca de 20 horas em estufa a  $35 \pm 2$  °C. Após o período de incubação, as células foram suspensas em solução fisiológica estéril, adicionando

uma quantidade suficiente para obter uma transmitância de 25% a 580 nm medida em espectrofotômetro.

A partir da suspensão bacteriana foram realizadas diluições decimais seriadas utilizando solução fisiológica estéril como diluente, até a diluição  $10^{-7}$ . Das três últimas diluições, ou seja,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , foi transferido 1 mL para placa de *Petri* e em seguida adicionado 20 mL do meio de cultura TSA. O procedimento foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas por cerca de 24 horas a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e após este período, foi realizada a contagem do número de colônias em cada placa, sendo determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL da suspensão microbiana. Desta maneira determinou-se a diluição que continha a concentração de  $10^8$  UFC/mL, empregada para a realização dos testes de atividade antibacteriana.

#### 4.3.2 Preparo da solução estoque do óleo essencial

Em um balão volumétrico de 10 mL foi realizado uma prévia diluição do óleo em caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI) contendo 0,02 % de polissorbato 80, obtendo uma solução estoque com concentração inicial de 30 mg/mL.

#### 4.3.3 Avaliação da interferência do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* sobre o efeito de antibióticos

Para realizar o estudo da interferência do OE de *O. gratissimum* inicialmente foi determinado a CIM do OE frente as bactérias testadas. Em seguida verificou-se a interferência do óleo através dos métodos – difusão em meio sólido e cálculo do índice concentração inibitória fracionada (FICI).

#### 4.3.4 Determinação da concentração inibitória mínima

A CIM do óleo essencial de *O. gratissimum* foi determinada pelo método de microdiluição descrito pela Norma M7-A6 do Clinical and Laboratory Standards

Institute (CLSI), de 2006. Em uma placa de ELISA de 96 poços, com fundo em U: as colunas 1 e 2 foram destinadas ao controle de esterilidade do caldo BHI; as colunas 4 e 5 foram destinadas ao controle de crescimento do micro-organismo; 7 e 8 verificou-se a possível interferência do crescimento bacteriano na presença de polissorbato 80 a 0,02%; e, para a obtenção da CIM a análise foi realizada em triplicata sendo destinadas para o teste as colunas 10, 11 e 12 (Figura 3).

Inicialmente, para determinação da CIM, foram distribuídos nos poços das fileiras teste 100  $\mu$ L de BHI e, em seguida, foram realizadas diluições sucessivas a partir da solução estoque de *O. gratissimum*, na orientação vertical, obtendo concentrações do óleo de 15.000  $\mu$ g/mL a 117,2  $\mu$ g/mL. Para a realização das diluições, foram transferidos 100  $\mu$ L da solução estoque de *O. gratissimum* para os poços da fileira A (A10-A12). Depois de homogeneizar a solução estoque com o caldo BHI, retirou-se 100  $\mu$ L e transferiu-se para o poço da fileira B, e assim sucessivamente, até o poço da fileira H, onde foram descartados os 100  $\mu$ L restantes, Figura 4.

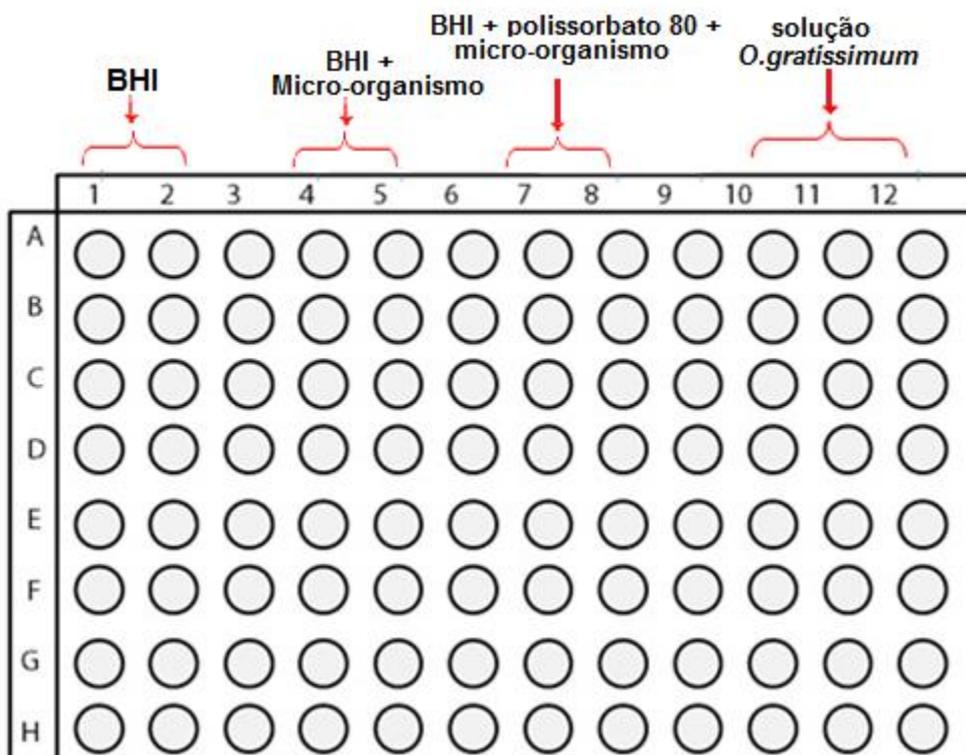


Figura 3 – Esquema da distribuição dos poços para determinação da CIM através do método de microdiluição em placa de Elisa

Após realizar as diluições, foram acrescentados em todos os poços 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de inóculo contendo cerca de  $2 \times 10^6$  UFC com exceção das colunas 1 e 2, desta maneira a concentração final do óleo variou entre 7500 a 58,6  $\mu\text{g/mL}$ . As placas foram incubadas por 24 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após o período de incubação a inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela adição de 20  $\mu\text{L}$  de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (2% v/v em água destilada) e em seguida, as placas foram novamente incubadas por 30 minutos. Os poços com alteração da coloração para vermelho foram indicativos de crescimento bacteriano. Os poços em que não houve alteração da cor corresponderam a ausência de crescimento microbiano.

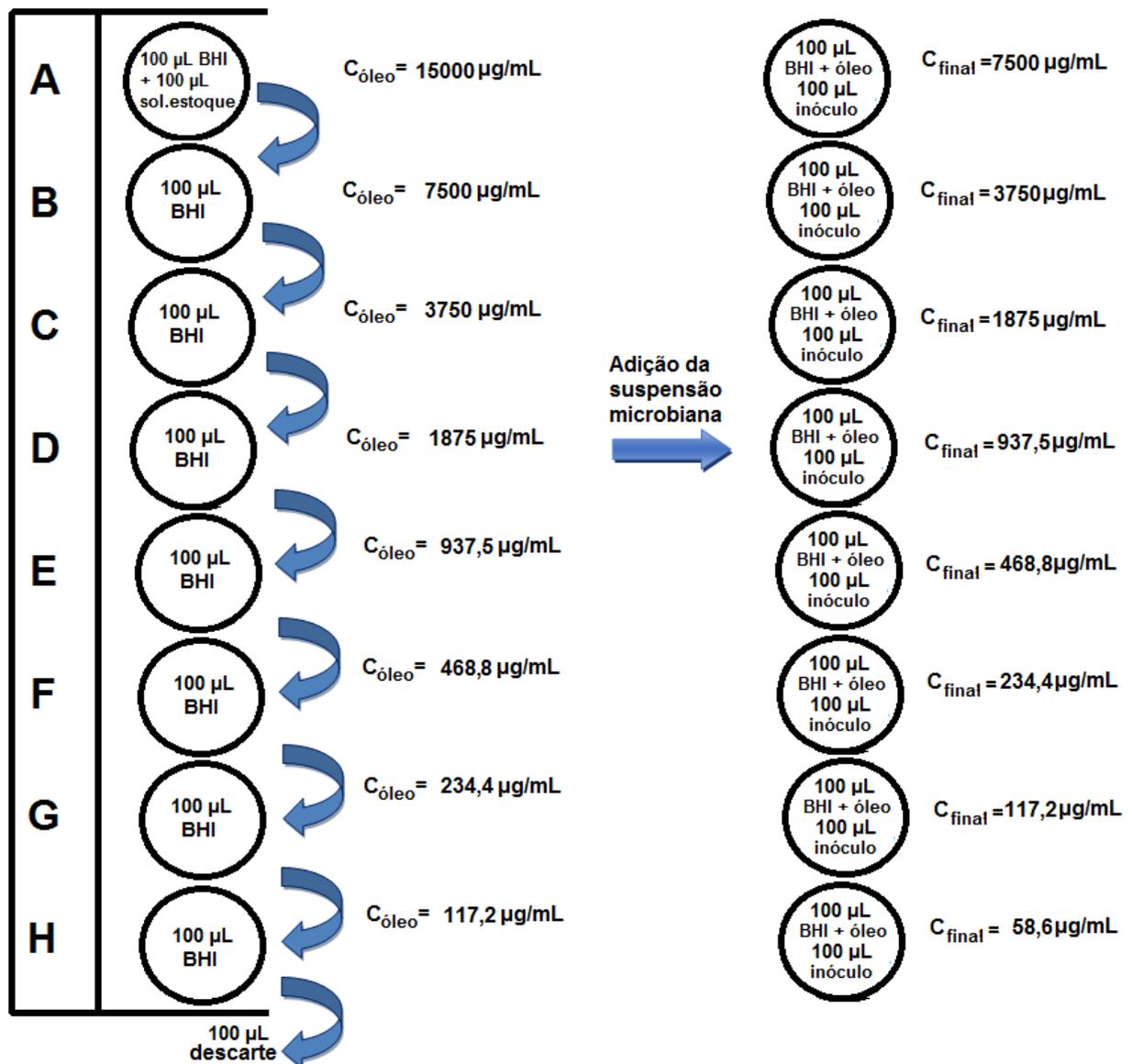


Figura 4- Esquema das diluições sucessivas nos poços das colunas n<sup>o</sup> 10,11 e 12 no teste de microdiluição em placas na orientação vertical

#### 4.3.4 Estudo da interferência do óleo essencial sobre a atividade inibitória do crescimento microbiano de antibióticos por técnica de difusão em ágar

O estudo da associação dos OE sobre a efetividade dos antibióticos foi realizado de acordo com a metodologia de Oliveira et al (2006) com algumas adaptações. Placas de Petri com 150 mm de diâmetro e 20 mm de altura, foram preparadas com duas camadas distintas de TSA, a camada inferior possuindo 36 mL de ágar estéril e a superior contendo 12 mL de ágar inoculado com 1% do inóculo contendo  $10^8$  UFC/mL. Sobre a superfície do meio inoculado foi inserido discos contendo os antibióticos nas suas respectivas concentrações, embebidos com 10 $\mu$ L da CIM do OE. O mesmo procedimento foi realizado com os discos contendo apenas o antibiótico.

As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas e os halos de inibição do crescimento bacteriano foram mensurados com o auxílio de um paquímetro, sendo observada a interferência da CIM do OE associado aos antibióticos sobre as cepas bacterianas ensaiadas.

#### 4.3.5 Índice da concentração inibitória fracionada

A partir dos resultados obtidos no estudo da interferência do OE sobre a atividade inibitória do crescimento microbiano de antibióticos por técnica de difusão em ágar, foram selecionados os antibióticos que apresentaram melhores resultados quando associados ao óleo de *O. gratissimum*. Para determinar o FICI foi necessário determinar previamente a CIM dos antibióticos promissores.

Para a análise do FICI foram utilizadas duas microplacas para cada cepa bacteriana. A primeira microplaca foi preparada com diluições sucessivas do OE de *O. gratissimum*, nesta placa adicionou-se previamente 50  $\mu$ L de BHI em todos os poços. A fileira A foi reservada para controle negativo e a fileira B para controle positivo. Nas fileiras C a H foram realizadas diluições seriadas da solução estoque do OE de *O. gratissimum* na orientação horizontal. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L da CIM do ciprofloxacino aos poços das fileiras C a E. Nas fileiras F a H adicionou-se 50  $\mu$ L da CIM da tetraciclina. A partir desta diluição foi possível verificar a CIM do OE em combinação com os antibióticos.

Na segunda placa, realizou-se diluições sucessivas do ciprofloxacino (fileiras C a E) e tetraciclina (fileiras F a H) na orientação horizontal, nesta placa foram adicionados 50 µL de BHI em todo os poços. A fileira A foi reservada para controle negativo e a fileira B para controle positivo. Após realizar as diluições dos antibióticos foram acrescentados 50 µL da CIM do óleo de *O. gratissimum* nos poços das fileiras C a H. Sendo o resultado obtido expresso como a CIM do antibiótico em combinação com o *O. gratissimum*.

Após as placas terem sido preparadas adicionou-se 100 µL da suspensão do inóculo contendo cerca de  $2 \times 10^6$  UFC, em seguida as placas foram incubadas por 24 horas e o crescimento bacteriano foi evidenciado pela adição de 20 µL de TTC 2%.

O efeito da combinação será obtido através do cálculo do FICI usando as seguintes fórmulas (MALIK et al, 2011):

$$FIC_{\text{óleo essencial}} = \frac{\text{CIM do óleo essencial em combinação}}{\text{CIM do óleo essencial}}$$

$$FIC_{\text{antibiótico}} = \frac{\text{CIM do antibiótico em combinação}}{\text{CIM do antibiótico}}$$

$$FIC \text{ índice (FICI)} = FIC_{\text{óleo essencial}} + FIC_{\text{antibiótico}}$$

Interpretou-se o resultado como: efeito sinérgico quando FICI  $\leq 0,5$ ; efeito aditivo ou indiferente quando FICI for  $> 0,5$  e  $< 1$ ; e efeito antagonista quando FICI  $> 1$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da interferência do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* sobre o efeito de antibióticos

Com a finalidade de avaliar a associação do OE de *O. gratissimum* com antibióticos. Inicialmente, foi determinada a CIM do óleo frente as cepas bacterianas a serem testadas, após obtenção da CIM foi avaliada a associação do óleo com antibióticos através do método de difusão em ágar, os antibióticos que apresentaram sinergismo quando associados ao OE foram avaliados pelo método FICI.

#### 5.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *O. gratissimum*

Considerando a natureza lipofílica do OE, foi necessário realizar uma prévia diluição do óleo em caldo BHI contendo 0,02% de polissorbato 80. A fim de verificar a interferência do polissorbato no crescimento bacteriano no ensaio, foi avaliado a associação do emulsificador diluído com caldo BHI, nas colunas 7 e 8, e comparado as colunas 4 e 5 contendo apenas caldo BHI, verificando-se que não ocorreu interferência da concentração de polissorbato no crescimento de nenhum dos micro-organismos testados.

O teste de microdiluição foi realizado em triplicata evidenciando a atividade antibacteriana do OE frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*. O crescimento bacteriano foi evidenciado pela adição de TTC a 2%, como revelador. O TTC é um corante de oxi-redução utilizado para detectar o crescimento microbiano, apresenta-se incolor na forma oxidada, indicando ausência de micro-organismo, e na presença de micro-organismo, é reduzido formando o trifetil formazan, assumindo uma coloração avermelhada.

Segundo a CLSI, deve-se ler o ponto final na concentração em que haja uma redução de 80% ou mais do crescimento, quando comparado com o controle. Desta maneira, o OE de *O. gratissimum* apresentou CIM 468,8 µg/mL frente a *S. aureus* e a *P. aeruginosa*, Figuras 5 e 6.

Em um estudo realizado por ALIGIANIS et al (2001) foi considerado a atividade antimicrobiana dos OE conforme CIM obtida, sendo caracterizada como extremamente forte (CIM= 280–1270  $\mu\text{g/mL}$ ) e fraca (CIM= 1810–8850  $\mu\text{g/m.L}$ ). Desta maneira, verificou-se que o óleo de *O. gratissimum* apresentou forte atividade antibacteriana frente as cepas testadas.

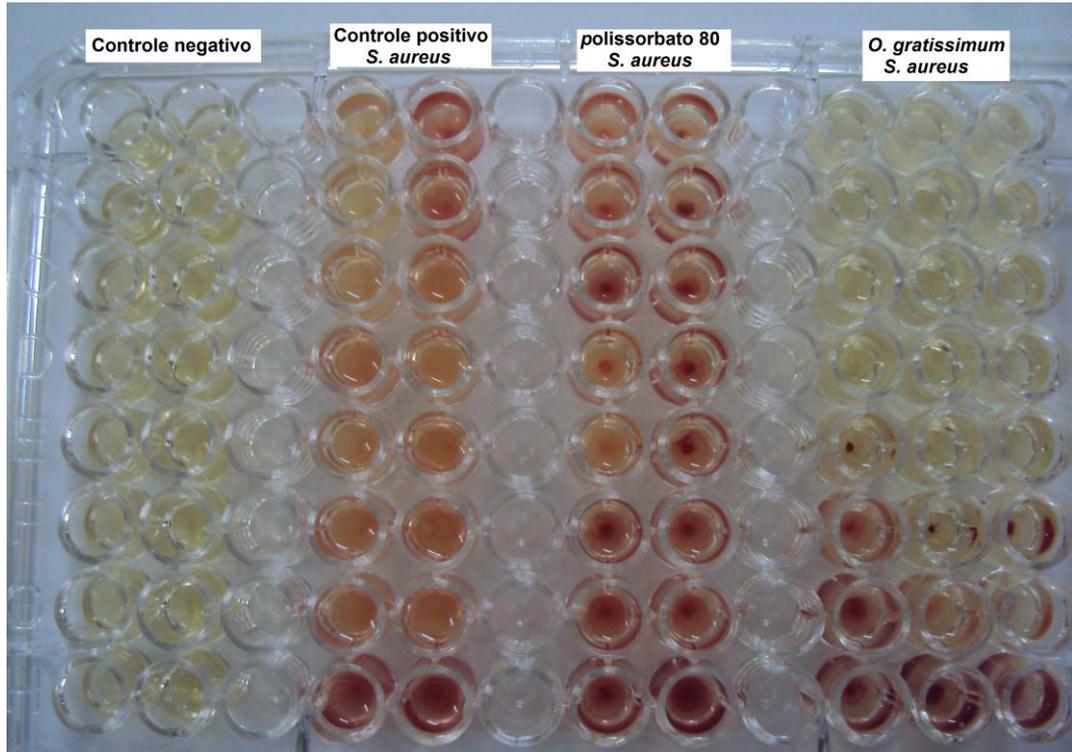


Figura 5 – Determinação da CIM do óleo de *O. gratissimum* pelo método de microdiluição em microplaca contra *S. aureus*, evidenciado pelo TTC 2%

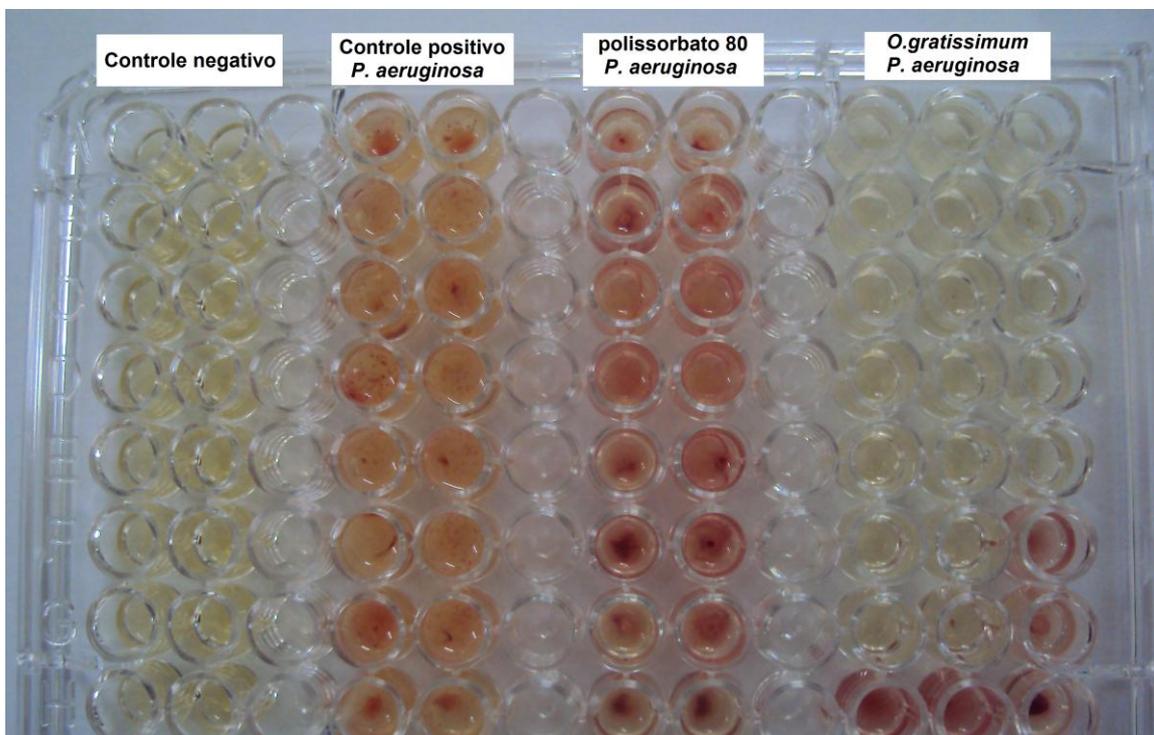


Figura 6- Determinação da CIM do óleo de *O. gratissimum* pelo método de microdiluição em microplaca contra *P. aeruginosa*, evidenciado pelo TTC 2%

### 5.1.2 Estudo da interferência do óleo essencial sobre a atividade de antibióticos por técnica de difusão em ágar

A avaliação da associação do OE com drogas antimicrobianas foi realizada por meio da técnica de difusão em ágar, utilizando discos de sensibilidade para bactérias gram-positivas: cefepime; ciprofloxacino; cloranfenicol; clindamicina; eritromicina; gentamicina; oxacilina; penicilina-G; rifampicina; sulfazotrim; tetraciclina; vancomicina. E, discos de sensibilidade para bactérias gram-negativas: ampicilina; amicacina; amoxicilina-ácido clavulânico; ceftazidima; cefalotina; cefepime; cefoxitina, cefuroxime; ciprofloxacino; gentamicina; meropenem; sulfazotrim.

Os discos contendo antibióticos nas suas respectivas concentrações foram embebidos com 10 µL da CIM do OE (468,8 µg/mL), sendo, em seguida, colocados em placas de Petri estéreis contendo TSA inoculado com 1% das suspensões bacterianas. Após a incubação das placas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por cerca de 24 horas. Os tamanhos dos halos de inibição formados foram mensurados e os resultados analisados, comparando-os com o antibiograma controle. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Segundo Oliveira et al. (2006) o resultado da associação de antibióticos com OE pode ser considerado como: efeito sinérgico, quando o halo de inibição do antibiótico combinado com o óleo apresentar diâmetro  $\geq$  que 2mm, quando comparado ao antibiótico isolado; efeito antagônico quando o halo de inibição formado for menor que o do antibiótico isolado; efeito indiferente quando o halo de inibição for igual com o antibiótico combinado ou isolado.

A *S. aureus* apresentou sensibilidade a todos os antibióticos testados, sendo verificado que ao serem associados com a CIM do OE apresentou: efeito sinérgico com rifampicina, tetraciclina e ciprofloxacino; efeito antagônico com cefepime e penicilina G; e, efeito indiferente com os demais antibióticos testados, Figura 7 e Figura 8.

Na Tabela 5 encontram-se as medidas dos halos de inibição do crescimento obtidos dos antibióticos isolados e em combinação com óleo de *O. gratissimum* frente a *S.aureus*

Tabela 5- Resultados da associação entre óleo essencial de *O. gratissimum* e fármacos antimicrobianos sobre *S. aureus* ATCC 6538

<b>Diâmetro dos halos de inibição (mm)</b>			
	Antibiótico	Antibiótico + óleo essencial	Resultado da associação
Cefepime	31,5 ± 2,12	30,0 ± 2,83	A
Oxacilina	23,5 ± 2,12	24,5 ± 0,7	I
Penicilina G	43,5 ± 2,12	42,5 ± 0,7	A
Eritromicina	21,5 ± 0,71	21,5 ± 0,7	I
Clindamicina	24,5 ± 0,71	24,5 ± 0,7	I
Vancomicina	18,0 ± 0,0	18,5 ± 0,7	I
<b>Rifampicina</b>	<b>33,5 ± 0,71</b>	<b>35,5 ± 0,7</b>	<b>S</b>
<b>Tetraciclina</b>	<b>28,0 ± 0,0</b>	<b>31,0 ± 0,0</b>	<b>S</b>
Sulfazotrin	20,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0	I
<b>Ciprofloxacino</b>	<b>23,5 ± 2,12</b>	<b>28,5 ± 0,7</b>	<b>S</b>
Gentamicina	13,5 ± 0,7	14,5 ± 0,7	I
Cloranfenicol	25,0 ± 0,0	25,5 ± 0,7	I

Os valores representam a média do diâmetro dos halos de inibição de crescimento (mm) ± SD (desvio padrão). S: efeito sinérgico; A: efeito antagônico; I: efeito indiferente

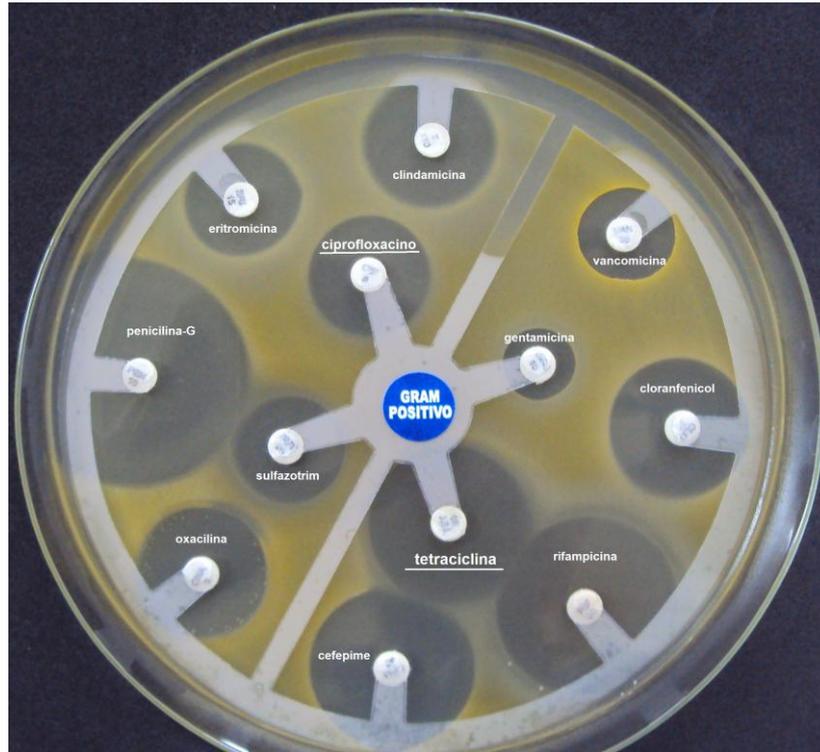


Figura 7- Antibiograma com os halos de inibição de crescimento para os antibióticos testados em meio de cultura TSA, inoculado com 1% da suspensão de *S. aureus* ATCC 6538



Antibióticos  
associados  
com óleo  
essencial

Figura 8 – Antibiograma com os halos de inibição de crescimento para os antibióticos associados a CIM do OE de *O. gratissimum* testados em meio de cultura TSA, inoculado com 1% da suspensão de *S. aureus* ATCC 6538

As *Pseudomonas* consistem em um gênero de bactérias gram-negativas na forma de bastonetes, possuem resistência à maioria dos antibióticos. Esta resistência provavelmente, esta relacionada com as porinas presentes na parede celular (LEVINSON, 2010; TORTORA et al, 2012). No teste de difusão verificou-se que a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 25619 apresentou resistência: a penicilinas (ampicilina e amoxicilina+ clavulanato) e as cefalosporinas de primeira e segunda geração, cefalotina e cefoxitima, respectivamente. A CIM do OE apresentou: efeito sinérgico com cefepime e ciprofloxacino; e efeito indiferente com os demais antibióticos testados, Figura 9 e Figura 10.

Na Tabela 6 encontra-se os halos obtidos dos antibióticos isolados e em combinação com óleo de *O. gratissimum* frente a *P. aeruginosa*

Tabela 6- Resultados da associação entre OE de *O.gratissimum* e fármacos antimicrobianos sobre *P. aeruginosa* ATCC 25619

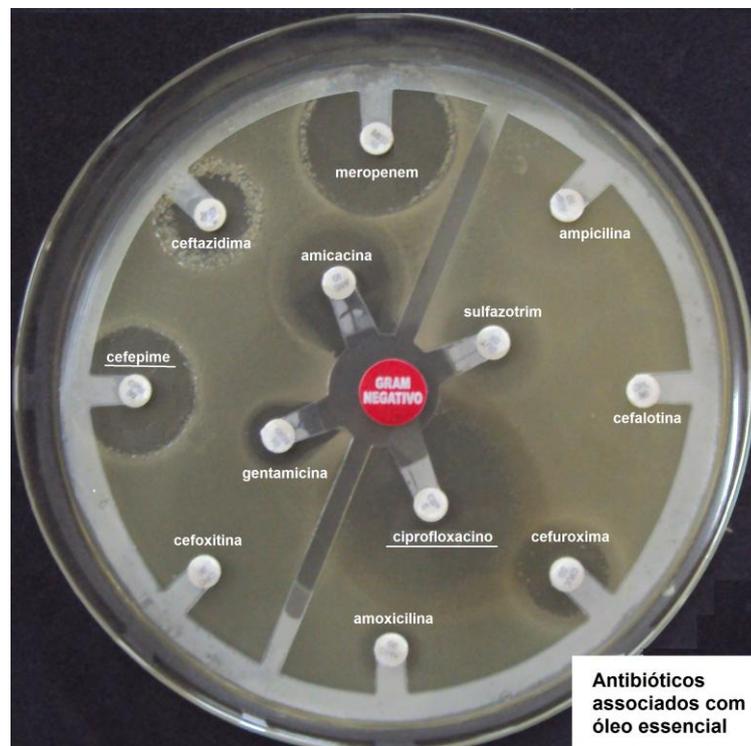
<b>Diâmetro dos halos de inibição (mm)</b>			
	Antibiótico	Antibiótico + óleo essencial	Resultado da associação
Ampicilina	*	-	I
Amicacina	17,5	18,5	I
Amox+Ác. Clav.	*	0,95	I
Ceftazidima	13,5	14,5	I
Cefalotina	*	-	I
<b>Cefepime</b>	<b>21,0</b>	<b>23,5</b>	<b>S</b>
Cefoxitina	*	-	I
Cefuroxima	17,5	17,5	I
<b>Ciprofloxacina</b>	<b>32,0</b>	<b>34,5</b>	<b>S</b>
Gentamicina	13,5	13,5	I
Meropenem	27,0	28,0	I
Sulfazotrim	16,0	15,0	I

Os valores representam a média do diâmetro dos halos de inibição de crescimento (mm)  $\pm$  SD (desvio padrão). S: efeito sinérgico; A: efeito antagônico; I: efeito indiferente;

\* cepa resistente ao antibiótico.



Figura 9 – Antibiograma com os halos de inibição de crescimento para os antibióticos testados em meio de cultura TSA, inoculado com 1% da suspensão de *P. aeruginosa* ATCC 25619



Antibióticos  
associados com  
óleo essencial

Figura 10 - Antibiograma com os halos de inibição de crescimento para os antibióticos associados a CIM do OE de *O. gratissimum* testados em meio de cultura TSA, inoculado com 1% da suspensão de *P. aeruginosa* ATCC 25619

### 5.1.3 Índice da concentração inibitória fracionada

A partir dos resultados obtidos no estudo para avaliar a interferência do OE sobre a atividade de antibióticos através do método de difusão em ágar frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*, foram selecionados os antibióticos que apresentaram melhores resultados quando associados ao óleo de *O. gratissimum*. Desta maneira o FICI foi testado com tetraciclina e ciprofloxacino.

Para obter o FICI foi necessário determinar a CIM de cada antibiótico frente as cepas analisadas. O ciprofloxacino apresentou CIM de 0,6 e 0,03 µg/mL, para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente. A CIM da tetraciclina foi de 0,028 µg/mL para *S. aureus*, enquanto para *P. aeruginosa* apresentou 4 µg/mL.

O FICI foi empregado para avaliar a redução da CIM do OE de *O. gratissimum* combinado com a tetraciclina e o ciprofloxacino. As concentrações testadas foram: ciprofloxacino 1,21 a 0,00059 µg/mL; tetraciclina 3,7 a 0,0018 µg/mL; óleo de *O. gratissimum* 3750 a 1,8 µg/mL.

O óleo de *O. gratissimum* apresentou redução da CIM frente as bactérias testadas ao ser combinado com ciprofloxacino e tetraciclina. Desta maneira para o cálculo da Concentração Inibitória Fracionada (FIC) foi utilizado o menor valor da diluição testada em que não foi visualizado crescimento bacteriano de 3,5 µg/mL, Figura 11 e 12.

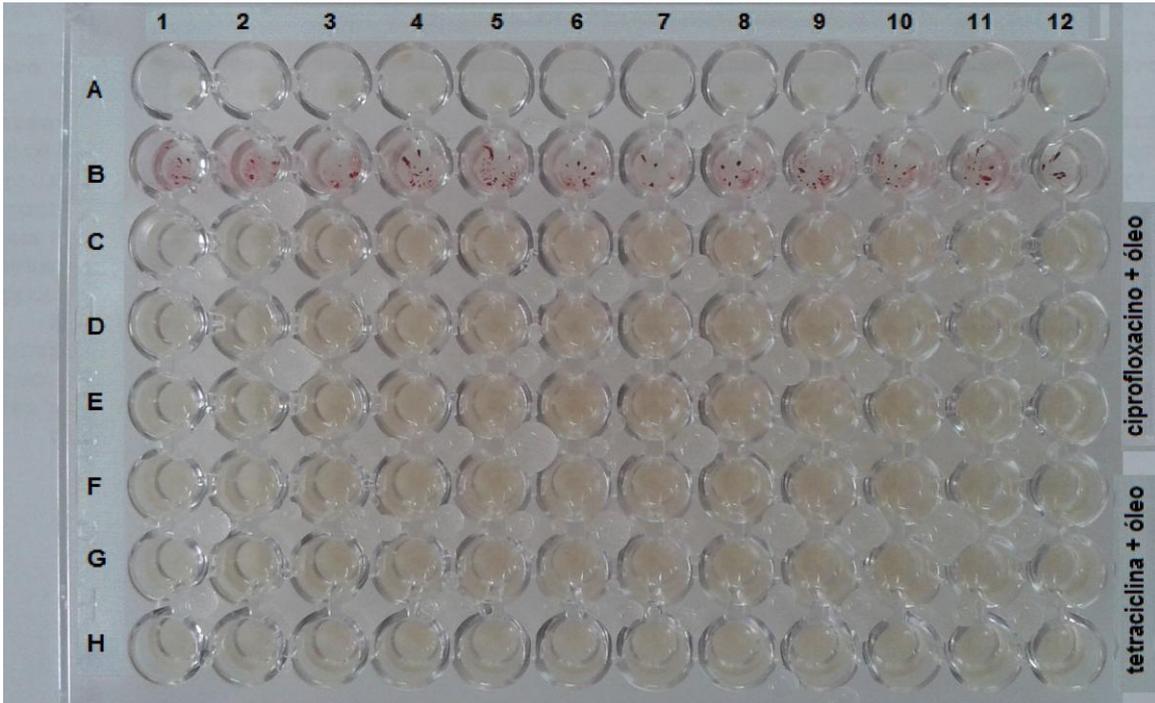


Figura 11 – Determinação da FIC do OE frente a *S. aureus* ATCC 6538 evidenciado pelo TTC 2 % - diluição do OE de *O. gratissimum* na orientação horizontal associado a CIM do ciprofloxacino (C, D, E) e CIM tetraciclina (F, G e H)

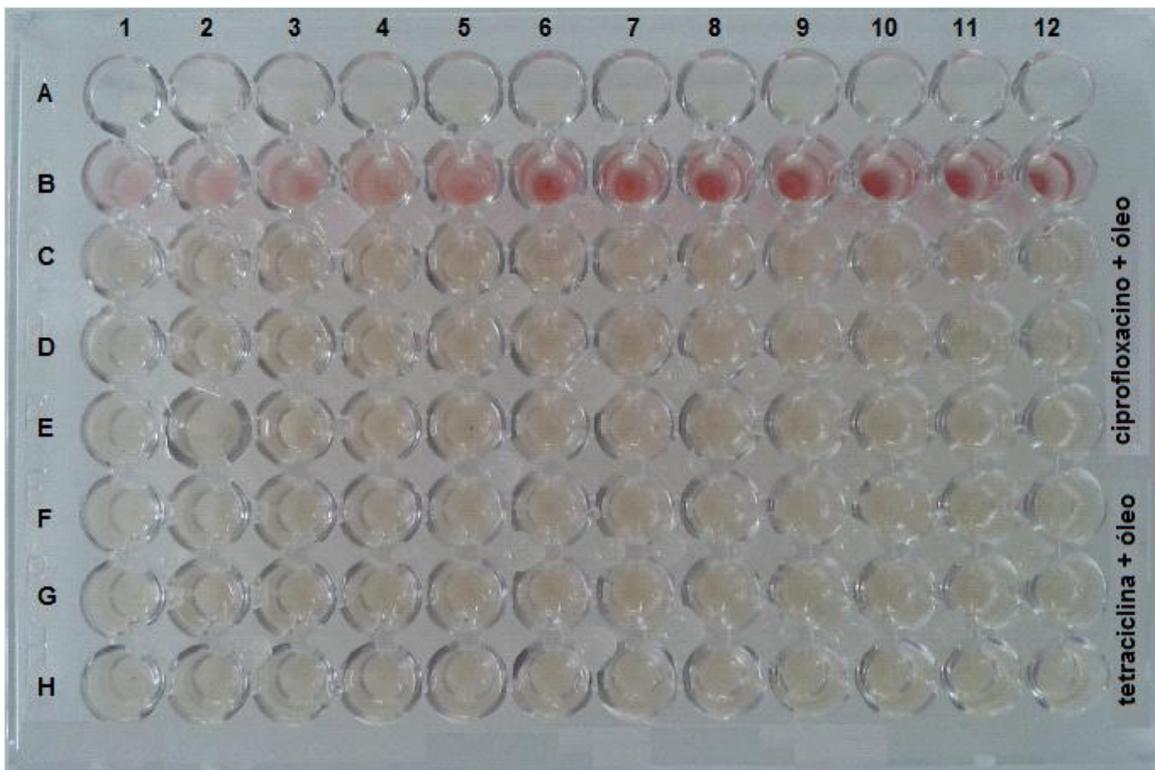


Figura 12 – Determinação da FIC do OE frente a *P. aeruginosa* ATCC 25619 evidenciado pelo TTC 2 % - diluição do OE de *O. gratissimum* na orientação horizontal associado a CIM do ciprofloxacino (C, D, E) e CIM tetraciclina (F, G e H)

Neste estudo a CIM do ciprofloxacino frente a *P. aeruginosa* ATCC 25619, apresentou valor de 0,03 µg/mL, ao ser associado ao OE de *O. gratissimum* não ocorrendo redução da CIM. O efeito sinérgico foi verificado frente a *S. aureus* ATCC 6538 apresentando uma redução da CIM para 0,076 µg/mL. Em relação à avaliação da interferência do óleo associado a tetraciclina foi verificado efeito sinérgico frente ambas as bactérias testadas com redução da CIM.

Ao comparar as diluições dos antibióticos associados a CIM do OE de *O. gratissimum* verificou-se uma melhor atividade frente a *S. aureus*, Figuras 13 e 14.

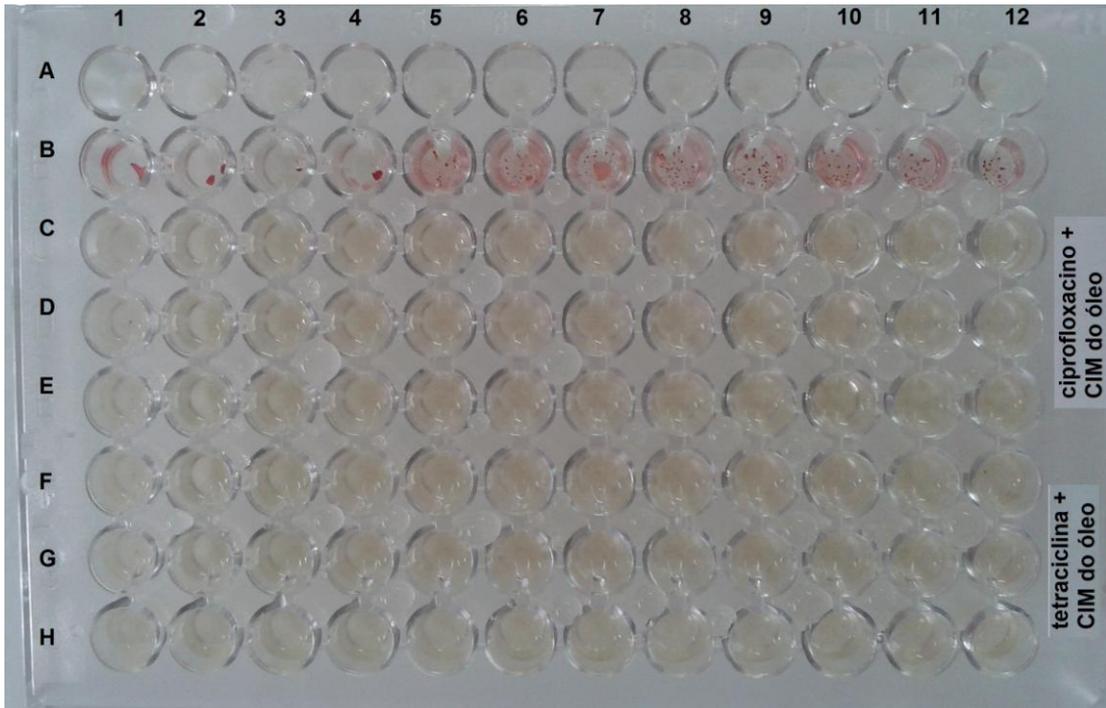


Figura 13 – Determinação da FIC dos antibióticos frente a *S. aureus* ATCC 6538 evidenciado pelo TTC 2 % - diluição dos antibióticos na orientação horizontal ciprofloxacino (C, D, E) e CIM tetraciclina (F, G e H) associado a CIM do óleo de *O. gratissimum*

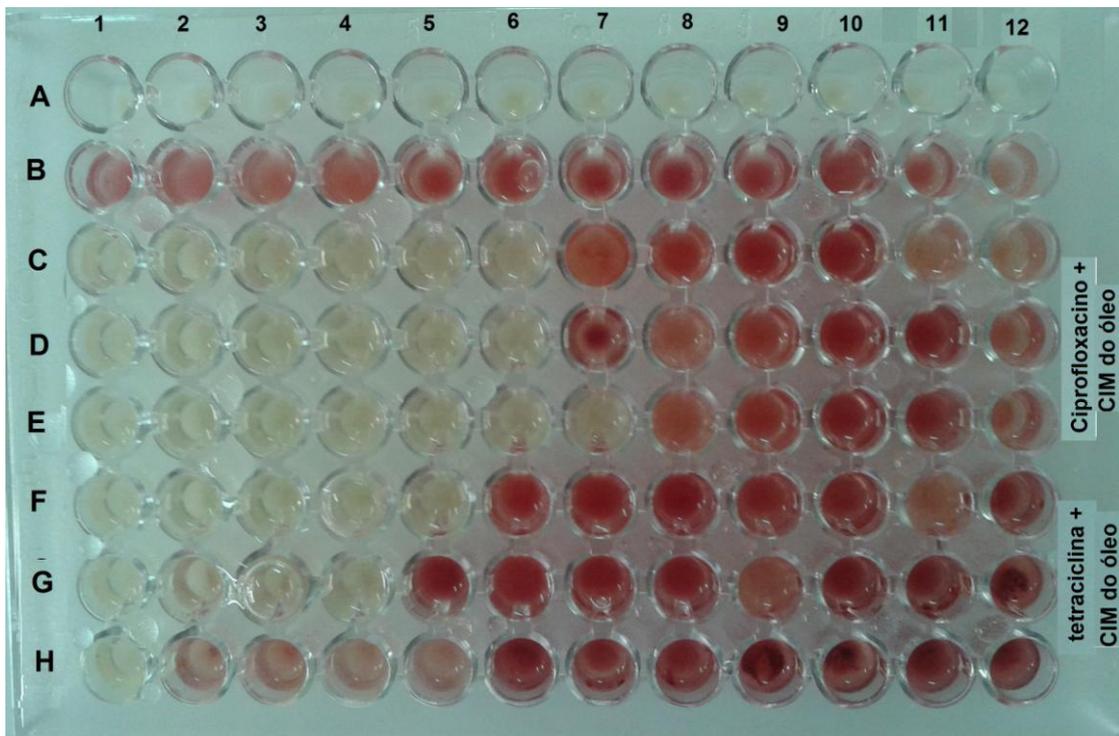


Figura 14 – Determinação da FIC dos antibióticos frente a *P. aeruginosa* ATCC 25619 evidenciado pelo TTC 2 % - diluição dos antibióticos na orientação horizontal ciprofloxacino (C, D, E) e CIM tetraciclina (F, G e H) associado a CIM do óleo de *O. gratissimum*

Os resultados das CIM das associações entre os antibióticos e o óleo de *O. gratissimum* avaliado pelo método *Checkerboard* encontram-se expressos na Tabela 7.

Tabela 7- Concentração inibitória mínima fracionada (FIC) e Índice da Concentração Inibitória Mínima (FICI) do óleo de *O. gratissimum* combinado com antibióticos

Micro-organismo	Substância-teste	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )		FIC	FICI	Resultado
		Isolado	Combinado			
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>O. gratissimum</i>	468,8	3,5	0,0075	0,009	Sinérgico
	Ciprofloxacino	0,6	0,00059	0,0010		
	<i>O. gratissimum</i>	468,8	3,5	0,0075	0,072	Sinérgico
	Tetracilina	0,028	0,0018	0,0643		
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	<i>O. gratissimum</i>	468,8	3,5	0,0075	5,008	Antagonista
	Ciprofloxacino	0,03	0,15	5,00		
	<i>O. gratissimum</i>	468,8	3,5	0,0075	0,038	Sinérgico
	Tetracilina	4	0,12	0,03		

\*sinérgico FICI  $\leq 0,5$ ; indiferente  $> 0,5$  e  $< 1$ ; antagonista FICI  $> 1$ .

Neste estudo verificou que a atividade antibacteriana dos antibióticos associado ao óleo essencial de *O. gratissimum* apresentou efeito sinérgico frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A redução da CIM observada demonstrou aumento da eficácia dos antibióticos *in vitro*. Desta maneira, o sinergismo demonstrado pode representar importante utilização para tratamentos no cenário clínico, a fim de diminuir os efeitos adversos dos antibióticos.

No entanto, vale ressaltar que o estudo foi realizado por métodos de ensaios *in vitro*, necessitando a confirmação dos resultados por meio de modelos experimentais *in vivo*, que possibilitem a ratificação dos resultados com maior confiabilidade.

## 6 CONCLUSÃO

O método de difusão em ágar apresentou resultados que evidenciaram efeito sinérgico da associação de *O. gratissimum* com rifampicina, tetraciclina e ciprofloxacino; efeito antagônico com cefepime e penicilina G e efeito indiferente com cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, sulfazotrim, vancomicina frente a *S. aureus*. Em relação a *P. aeruginosa*, apresentou efeito sinérgico com cefepime e ciprofloxacino; e efeito indiferente para ampicilina, amicacina, amoxicilina-ácido clavulânico, ceftazidima, cefalotina, cefoxitina, cefuroxime, gentamicina, meropenem, sulfazotrim.

No método FICI tanto o ciprofloxacino quanto a tetraciclina apresentaram melhor atividade antimicrobiana ao serem associados ao óleo essencial de *O. gratissimum* frente a *S. aureus*. A redução da CIM do ciprofloxacino e da tetraciclina associado a CIM do OE de *O. gratissimum* foi de 99,02% e 93,57%, respectivamente frente à bactéria Gram-positiva. Enquanto, frente a *P. aeruginosa*., a tetraciclina apresentou efeito sinérgico e o ciprofloxacino efeito antagônico, combinado ao óleo *O. gratissimum*.

Desta maneira, os resultados mostraram pronunciado efeito sinérgico do óleo essencial de *O. gratissimum* associado a antibióticos frente a *S. aureus*. Demonstrando que o método de *Checkerboard* apresentou sensibilidade superior ao teste de disco difusão, permitindo avaliar a interferência entre os fármacos e a essência da alfavaca cravo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ADJOU, E. S. et al. Effect of essential oil from fresh leaves of *Ocimum gratissimum* L. on mycoflora during storage of peanuts in Benin. **Mycotoxin Research**. n. 29, p. 29-38. 2013.
- AGUIYI, J. C. et al. Hypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. **Fitoterapia**. v. 71, p. 444-446. 2000.
- ALIGIANIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n. 49, p. 4168-4170, 2001.
- ATKINS, P; JONES, L. **Princípios de Química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.
- AYISI, N. K.; NYADEDZOR, C. Comparative in vitro effects of AZT and extracts of *Ocimum gratissimum*, *Ficus polita*, *Clausena anisata*, *Alchornea cordifolia*, and *Elaeophorbium drupifera* against HIV-1 and HIV-2 infections. **Antiviral Research**. v. 58, p. 25–33. 2003.
- AZEVEDO, L. F. P. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) S.w. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.16, n.2, p.209-215. 2014.
- BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC Press, 2010.
- BASSOLE, I. H. N; JULIANI, H. R. Essential oils in Combination and their antimicrobial properties. **Molecules**. v. 17, n. 4, p. 3989-4006.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1. ed. 2004.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7ca540804466f6018f69ef6f58f405d3/rd0014\\_31\\_03\\_2010.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7ca540804466f6018f69ef6f58f405d3/rd0014_31_03_2010.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 15 de set. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. v.2. 5. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde.** Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS.** Relatório de Gestão 2006/ 2010. Ministério da Saúde. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS : atitude de ampliação de acesso /** Ministério da Saúde. 2. ed. Brasília, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais na Central de Medicamentos.** Ministério da Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006.

CANHOTO, J. M. **Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética.** Coimbra: Universidade de Coimbra, 2010.

CAREY, F. A. **Química Orgânica.** v. 2. 7 ed. Porto Alegre: McGraw-Bookman, 2008.

CARNEIRO, F.M. et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais .** v.3, n. 2, p.44-75, JUL/DEZ. 2014.

CAROVIC´-STANKO, K. et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry.** v.119, p.196–201. 2010.

CECHINEL-FILHO, V. **Plant bioactivities and drug Discovery: principles, practice and perspectives.** New Jersey: John Wiley & Sons, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.** Approved Standard—Seventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7: Pennsylvania, 2006.

COSTA, A. F. **Farmacognosia.** v.1. 6.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

CUNHA, A. P. et al. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

DAMBOLENA, J. S. et al. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies.** v.11, p. 410–414. 2010.

DEVI, K. P. et al. Eugenol alters the integrity of cell membrane and acts against the nosocomial pathogen *Proteus mirabilis*. **Archives of Pharmacal Research**. v. 36, p. 282-292. 2013.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2nd. West Sussex: Wiley, 2002.

DRAGO, L. et al. *In vitro* evaluation of antibiotics combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infections Diseases**, v. 111, p. 1-7, 2007.

DUARTE, A. et al. Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine**. v. 19, p. 236-238. 2012.

DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, p. 197-201. 2007.

DUARTE, M. C. T. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolócos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 14, n. 01, p. 06-08. 2004.

FIGUEIREDO, E. A. P. et al. *Pseudomonas A. eruginosa*: Frequência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 19, n. 4, p. 421-427. out/dez. 2007.

FIGUEREDO, C. A. et al. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Revista de Saúde Coletiva**. v. 24, n. 2, p. 381-400. 2014.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre a modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. v. 21, n.1, p. 99-105. 1998.

FRANÇA, I. S. X, et al. Popular medicine: benefits and drawbacks of medicinal plants. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 61, n. 2, p. 201-208. mar./abr. 2008.

FRANCO, A. L. P. et al. Evaluation of the chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc., *Ocimum gratissimum* L. and *Curcuma longa* L. al. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. IV, n.2, p. 208-220. 2007.

FREITAS, R. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante das espécies *Plectranthus amboinicus* (Lour.) e *Mentha x villosa* (Huds.). **Revista Ciência Farmacêuticas Básica Aplicada**. v.35, n. 1, p. 113-118. 2014.

GARCIA, L. M. et al. Epidemiological profile of hospital infections by multidrug-resistant bacteria in a hospital of northern Minas Gerais (Brazil). **Revista de Epidemiologia**. v. 3, n. 2, p. 45-49. 2013.

- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374-381. 2007.
- GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemical**. 2011.
- HILTUNEN, R.; HOLM, Y. **Basil: The Genus Ocimum**. Department of Pharmacy. University of Helsinki. Finland: Taylor & Francis e-Library, 2005.
- HUI, Y. H. **Handbook of food products manufacturing**. New Jersey: John Wiley & Sons, v. 2. 2007.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia Médica**. 25. ed. McGraw-Hill Companies, 2012.
- JUNIOR, V. F. V. et al. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**. v. 28, n. 3, p. 519-528. 2005.
- KANZLER, S. **Plantas medicinais: viva mais e melhor**. Lebooks, 2013.
- LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- LOPES, A. C. **Diagnóstico e tratamento**. v. 2. Barueri, SP: Manole, 2006.
- LUZ, J. M. Q. et al. Horário de colheita e tempo de secagem da alfavaca-cravo. **Horticultura Brasileira**. v. 27, p. 539-542. 2009.
- MACIEL, M. M. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n. 3, p. 429-438. 2002.
- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MALIK, T. et al. Potentiation of antimicrobial activity of ciprofloxacin by *Pelargonium graveolens* essential oil against selected uropathogens. **Phytoterapy Research**. v. 25, p. 1225-1228. 2011.
- MATASYOH, J.C. et al. Volatile leaf oil constituents of *Ocimum americanum* L. occurring in Western Kenya. *Chemical Society of Ethiopia*. v. 20, n. 1, p. 177-180. 2006
- MATIAS, E. F. F. et al. Phytochemical screening and modulation of antibiotic activity by *Ocimum gratissimum* L. **Biomedicine & Preventive Nutrition**. v.1, p. 57–60. 2011.
- MEDEIROS, M. **Avaliação in vitro e in vivo de efeitos sinérgicos de antibacterianos resistentes produtoras de Carbapenemases tipo OXA endêmicas no Brasil**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

MORAES, F. C. **Avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *O. americanum*, *O. gratissimum* e *O. selloi* frente a bactérias aeróbias prevalentes em úlceras de decúbito.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Juiz de Fora. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Juiz de Fora, 2014.

NASCIMENTO, P. F.C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 17, n.1, p. 108-113. 2007.

NAZARRO, F. et al. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals.** v. 6, p. 1451-1474. 2013.

NETTO, B. H. T. **Avaliação de sinergismo de polimixina B com outros antimicrobianos em isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Faculdade de Medicina- Programa de Pós Graduação em Medicina. Porto Alegre, 2013.

NGUEMTCOUIN, M. G. M. et al. *Ocimum gratissimum* essential oil and modified montmorillonite clay, a means of controlling insect pests in stored products. **Journal of Stored Products Research.** n. 52, p. 57-62. 2012.

NIST. National Institute of Standards and Technology. **Chemistry Webbook**, edited by P. J. Linstrom and W. G. Mallard. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov>>. Acesso em: 14 jun. 2014.

OLIVEIRA, L. F. G. et al. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. **Revista Fitoterapia**, v. 8, n. 1, p. 1-72. Jan/Mar. 2013

OLIVEIRA, R. A. G. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** v. 16, n. 1, p. 77-82. Jan./Mar. 2006.

OUYANG, X. et al. N. Antioxidant properties and chemical constituents of ethanolic extract and its fractions of *Ocimum gratissimum*. **Medicinal Chemistry Research.** v. 22, p. 1124-1130. 2013.

PADALIA, R. C. et al. Changes in aroma profiles of 11 Indian *Ocimum* taxa during plant ontogeny. **Acta Physiologiae Plantarum.** v. 35, p. 2567–2587. 2013.

PALANIAPPAN, K. ; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology.** v. 140, p. 164–168. 2010.

PAULA-FREIRE, L. I. G. et al. Evaluation of the Antinociceptive Activity of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) Essential Oil and its isolated Active Principles in Mice. **Phytotherapy Research.** v. 27, p. 1220–1224. 2013.

- PEREIRA, C. A. M.; MAIA, June Ferreira. Study of the antioxidant activity and essential oil from wild basil (*Ocimum gratissimum* L.) leaf. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 27, n.3, p. 624-632, jul. -set., 2007.
- PEREIRA-MAIA, E. C. et al . Tetraciclinas e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**. São Paulo , v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010 .
- PHEROBASE. **Database of Insect Pheromones and Semiochemicals**. Disponível em: <<http://www.pherobase.com/database/kovatas/Kovats-index.php>>. 22. fev. 2014. Acesso em 14 jun. 2014.
- PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finfing of new lead compounds? **Journal of Ethnopharmacology**. p. 57-60. 2005.
- RIBEIRO, D. S. et al. Interaction between the rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) and antimicrobial drugs in the control of bacteria isolated from foods. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 4, n.1, p. 10-19. 2013.
- RODRIGUES, F. F. G. et al. Synergy effects of the antibiotics gentamicina and the essential oil of *Croton zehntneri*. **Phytomedicine**. v. 16. p.1052–1055. 2009.
- ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “ Júlio Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara, 2012.
- SANTOS, F. S.; NOVALES, M. G. M. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**. v.23, p.136–141. 2012.
- SANTOS, N. Q.. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enfermagem**. v. 13, n. esp, p. 64-70. 2004.
- SANTOS, R. L. et al . Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu. v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.
- SILVA, L. L. et al. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**. n. 350-353, p. 91–97. 2012.
- SILVA, M. G. V. et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**. v.70, p. 32-34. 1999.
- SIMÕES, C. M. O. et al.,. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2 ed. Florianópolis: UFSC/UFRGS, 2000.
- TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gasliquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**. v. 11, p. 463-71. 1963.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The International Pharmacopoeia**. 3rd. 4 ed. 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. Acesso em: 11 jun. 2014..

YAP, P. S. X. et al. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. **Phytomedicine**. v. 20, p. 710-713. 2013.

ZAGO, J. A. A. et al. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19, n.4, p. 828-833, Out./Dez. 2009.



Composição química obtida do óleo essencial das folhas de *O. gratissimum* obtido por CG-FID

Pico	IRL <sub>cal.</sub>	IRL <sub>lit.</sub>	Substância	Concentração (%)	Classificação
1	1036	1037	cis- $\beta$ -ocimeno	18,98	Monoterpeno
2	1048	1050	trans- $\beta$ -ocimeno	1,4	Monoterpeno
3	1183	1177	terpinen-4-ol	0,75	Monoterpeno oxigenado
4	1360	1359	Eugenol	72,56	Fenilpropanóide
5	1431	1419	$\beta$ -cariofileno	0,88	Sesquiterpeno
6	1492	1494	trans-murolo-4(14),5-dieno	2,47	Sesquiterpeno

IRL<sub>cal.</sub>: Índice de Retenção Linear experimental

IRL<sub>lit.</sub>: Índice de Retenção Linear literatura