

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

THAIANY FELIPE BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DE
FÁRMACOS DA COMBINAÇÃO DOS COMPOSTOS EUGENOL E SABINENO**

Juazeiro do Norte – CE
2018

THAIANY FELIPE BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DE
FÁRMACOS DA COMBINAÇÃO DOS COMPOSTOS EUGENOL E SABINENO**

Trabalho de Conclusão de curso - Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro.

THAIANY FELIPE BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DE
FÁRMACOS DA COMBINAÇÃO DOS COMPOSTOS EUGENOL E SABINENO**

Trabalho de Conclusão de Curso - Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro.

Data de aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof(a) Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro
Orientadora

Prof(a) Esp. Rakel Olinda Macedo da Silva
Examinador 1

Prof(a) Esp. Lívia Maria Garcia Leandro
Examinador 2

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e ter concedido essa oportunidade, força e coragem para vencer uma das muitas etapas que virão.

Aos meus pais Cletonio e Socorro por todo amor, apoio, cuidado, incentivo e sempre dar o seu melhor quanto ao esforço para que eu possa adquirir uma formação.

A minha irmã Thalia por todo o carinho.

In memória da minha bisavó Maria (Mainha) por ter ajudado a me criar, ressaltando que sua lembrança sempre estará viva em mim assim como a do meu avô João Felipe pela sua alegria e palavras mesmo quando estava em uma fase difícil da doença.

A toda minha família pelo apoio nessa jornada.

A minha orientadora Ma. Maria Karollyna pela paciência e conhecimento repassado.

Muito Obrigada!

AValiação DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DE FÁRMACOS DA COMBINAÇÃO DOS COMPOSTOS EUGENOL E SABINENO

Thaiany Felipe Barbosa¹, Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro²

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e moduladora de fármacos do eugenol e sabineno associados. Para realização do experimento, foram utilizadas linhagens bacterianas ATCC e multirresistentes de *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358, e a solução com a combinação do eugenol com o sabineno na proporção 1:1 foi denominada solução A. Foram utilizados os antibióticos clindamicina e gentamicina e a técnica aplicada foi a de microdiluição em caldo. Os resultados foram expressos em média aritmética \pm desvio padrão, avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo pos-test *Bonferroni* utilizando o software *GraphPad Prism*. Na avaliação da atividade antibacteriana foi obtida uma concentração inibitória mínima da solução A de 256 μ g/mL. Nos testes de modulação é possível observar que houve sinergismo quando a solução A foi associada a gentamicina frente a cepa de *Staphylococcus aureus* e indiferença frente a cepa Gram negativa. Já modulação do eugenol e sabineno associados a clindamicina frente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* não apresentou resultados significativos. Diante dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que o eugenol e sabineno podem servir futuramente como uma nova ferramenta no combate de bactérias resistentes, principalmente contra microrganismos Gram positivos.

Palavras-chave: Modulação. Resistência. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*.

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL AND MODULATOR ACTIVITY OF COMBINATION OF EUGENOL AND SABINENO COMPOUNDS

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the antibacterial and modulatory activity of eugenol and sabinene associated drugs. In order to perform the experiment, standard and multi-resistant strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were used, and the solution with the combination of eugenol and the 1: 1 ratio of sabinene was named solution A. Clindamycin and gentamicin antibiotics and the technique applied was that of microdilution in broth. The results were expressed as arithmetic mean \pm standard deviation, statistically evaluated through analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-test using *GraphPad Prism* software. In the evaluation of antibacterial activity, a minimum inhibitory concentration of solution A of 256 μ g / mL was obtained. In the modulation tests, it is possible to observe that there was synergism when solution A was associated with gentamicin against the strain of *Staphylococcus aureus* and indifference to the Gram negative strain. Modulation of eugenol and sabinene associated the clindamycin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* did not present

¹ Discente do curso de Biomedicina, thaianyfelipe07@outlook.com, Centro Universitário Leão Sampaio

² Docente do curso de Biomedicina, karollynasilva@leaosampaio.edu.br, Centro Universitário Leão Sampaio

significant results. In view of the results obtained in this study, it can be concluded that eugenol and sabinene may serve as a new tool in the fight against resistant bacteria, mainly against Gram positive microorganisms.

Keywords: Modulation. Resistance. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*.

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana a antibióticos é atualmente um dos problemas de saúde pública mais importantes, tendo em vista que muitas bactérias anteriormente inibidas por antibióticos comumente utilizados perderam a resposta a esses mesmos agentes (LOUREIRO et al., 2016). São designados como resistentes os microrganismos capazes de crescer na presença de concentrações de um ou mais antibióticos que geralmente prejudicariam suas funções de desenvolvimento (ALENCAR et al., 2015).

A utilização de plantas medicinais é muito comum no Brasil e seu potencial curativo é reconhecido mundialmente, são definidas como vegetais que apresentam substâncias com atividade terapêutica. Calcula-se que diversas espécies nativas tenha alguma propriedade medicinal, porém sequer 1% foi pesquisada corretamente (MESSIAS et al., 2015). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelaram que 80% da população mundial usa plantas para amenização ou cura de doenças (RODRIGUES et al., 2015).

As plantas biossintetizam substâncias, designados metabólitos secundários, que são importantes para a adequação e a colonização das espécies vegetais. Os flavonoides, alcaloides e os terpenos são exemplos desses metabólitos e, na sua maioria, exibem atividades biológicas, como por exemplo, ação antiinflamatória, antitumoral, antioxidante, antiparasitária, antiviral e antibacteriana (COLARES, 2016).

Eugenol (4-alil-2-metoxifenol), é um composto presente no cravo, óleo de noz-moscada, óleo de canela e óleo de oliva. Tem sido utilizado para fabricação de cosméticos e na medicina popular, apresenta propriedades antioxidante, antiinflamatória, antibacteriana e atua como anestésico local (PHUNPEE et al., 2016). Também tem sido utilizado como antisséptico dentário (GÜLÇIN, 2011), entretanto, sua utilização apresenta algumas limitações em virtude da sua baixa estabilidade, visto que é facilmente oxidado ou decomposto na presença de oxigênio, luz ou calor (KAYACI; ERTAS; UYAR, 2013).

O sabineno é um monoterpene bicíclico natural isolado do óleo de diversas espécies de plantas, tal como *Picea abies* (abeto-falso), *Quercus ilex* (azinheira), *Clausena anisata*. e *Piper gaudichaudianum* (pariparoba). Esse composto é considerado como o responsável pela

atividade antimicrobiana desses óleos essenciais (MANINI, 2015), entretanto ainda não há muitos relatos a respeito de sua bioatividade (CARVALHO et al., 2017).

. Com o decorrer do tempo, as bactérias adquiriram resistência devido principalmente o uso inadequado de medicamentos. Compostos isolados de plantas medicinais poderiam ser utilizados para produção de medicamentos fitoterápicos devido ser um recurso natural e apresentar alto potencial de cura contra bactérias e ser uma alternativa de tratamento. Dessa forma, é importante o esclarecimento acerca das substâncias isoladas e associadas que fazem parte da composição dessas plantas. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e moduladora de fármacos do eugenol e sabineno associados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Os antibióticos Clindamicina e Gentamicina foram obtidos de LaborClin, Brasil. Os meios de cultura foram adquiridos de HIMEDIA, Índia e o Dimetilsulfóxido (DMSO) de Merck, Alemanha. Os compostos isolados Eugenol e Sabineno foram adquiridos da Sigma e foram combinados em uma proporção 1:1, e a esta solução foi dado o nome de Solução A.

2.2 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas as linhagens bacterianas padrões de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz e as linhagens multirresistentes de isolados clínicos *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358. Todas as linhagens foram mantidas em Ágar infusão de coração (HIA). Para realização dos testes, as linhagens foram suspendidas em tubo de ensaio com solução salina para obter uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL).

2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E MODULAÇÃO DOS FÁRMACOS

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo utilizando placas esterilizadas com 96 poços com diluições em série 1:1 (NCCLS, 2003). Culturas microbianas mantidas em Ágar estoque sob refrigeração foram repicadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 35°C durante 24 h. A solução teste foi

preparada utilizando 10 mg da solução A (proporção 1:1 de eugenol e sabineno) solubilizada em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo uma concentração inicial de 10 mg/mL. A partir desta concentração, foram realizadas as diluições em água destilada estéril para obter uma solução estoque de 1024 µg/mL. As concentrações finais das amostras no meio de cultura foram 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 µg/mL.

Após, procedeu-se a padronização do inóculo, que consiste na preparação de uma suspensão em BHI, cuja turvação seja similar ao tubo 0,5 da escala McFarland (1×10^8 UFC/mL). Essa suspensão foi diluída 100 vezes, em meio BHI, o que corresponde aproximadamente a uma suspensão contendo 1×10^6 UFC/mL, da qual foi retirado 100 µL e adicionado em cada poço da placa acrescido de diferentes concentrações da solução A.

Os testes foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C, durante 24 h. Após esse período, as placas foram reveladas com corante específico, a resazurina. Esta solução foi preparada em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após o período de incubação, 20 µg/mL da solução indicadora foi acrescentada nas placas em cada cavidade e após uma hora em temperatura ambiente foi realizada a leitura do teste. Esta é determinada através da coloração do meio de cultura, sendo considerada positiva para os poços que não apresentarem crescimento microbiano, ou seja, permaneçam com a coloração azul e negativa os que obtiverem coloração vermelha (SALVAT et al., 2001).

O controle negativo do teste foi realizado com os meios de cultura contendo o inóculo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, nos poços de microdiluição conforme detectado macroscopicamente.

O teste para avaliação da atividade moduladora foi realizado utilizando cepas bacterianas multirresistentes e a solução A na concentração subinibitória. Os antibióticos foram utilizados em concentração de 1.024 µg/mL e através da microdiluição foi adicionado 100 µg/mL nos poços contendo BHI a 10% mais inóculo e solução A. As concentrações finais de antibióticos foram de 512 a 0,5 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 ± 2 °C. Posteriormente, as placas foram reveladas com corante específico, a resazurina e após uma hora foi efetuada a leitura, considerando positiva os que continuaram na coloração azul e negativa os que apresentaram coloração vermelha. Todos os testes foram realizados em triplicata e a revelação foi feita utilizando resazurina (COUTINHO et al., 2010).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

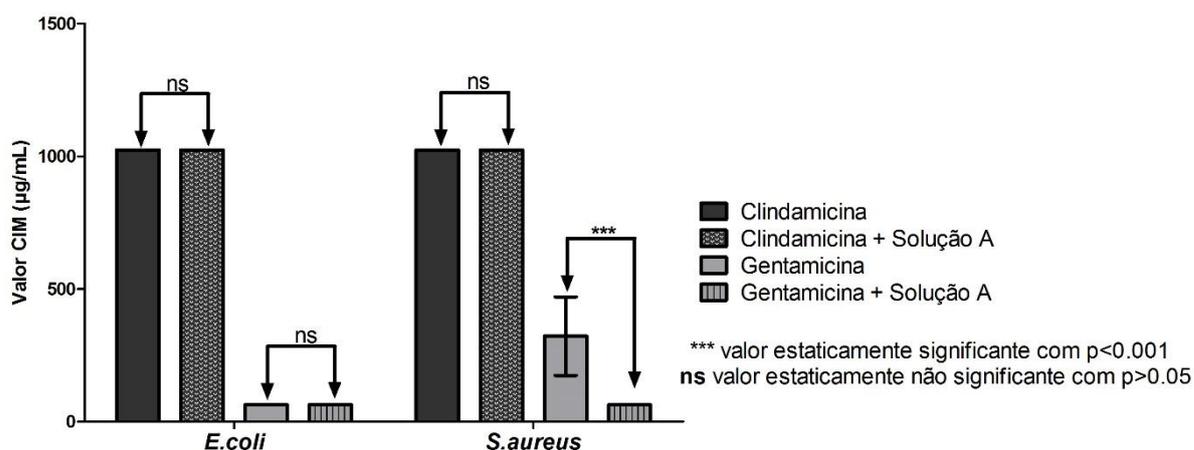
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da atividade antibacteriana pelo método de microdiluição com as substâncias associadas eugenol e sabineno frente as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* padrões e multiresistentes apresentou uma MIC de 256 μ g/mL para todas as cepas (Tabela 1), o qual é considerado relevante de acordo Qiu et al (2010), onde a sua pesquisa mostrou resultado semelhante sendo a MIC do eugenol contra *S. aureus* também de 256 μ g/mL. Esses dados revelam que o composto eugenol poderia ser utilizada como componente básico para o futuro desenvolvimento de novos e mais potentes fármacos para o tratamento do *S. aureus*.

A análise com diferentes metodologias realizada por Pereira et al (2008), mostrou a formação do halo de inibição frente a bactérias *E.coli* e *S. aureus*, induzidos pelos óleos essenciais de *C. citratus* (capim-limão), *O. vulgare*(orégano) e *S. aromaticum* (cravo-da-índia) os quais são ricos em eugenol. Guimarães (2017) também evidenciou que o óleo do cravo da índia foi capaz de inibir o crescimento de *S.aureus* e *E.coli*, assim como Moraes (2014), verificou que o óleo essencial de *O. Gratisimum*, o qual apresenta eugenol como composto majoritário, apresentou efeito contra bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Nos testes de modulação, é possível observar que houve sinergismo quando a solução A foi associada a Gentamicina frente a cepa de *Staphylococcus aureus* e indiferença quando associado a cepa Gram negativa. Já a modulação com o antibiótico clindamicina frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* multirresistente não apresentou resultados significativos, ou seja, não houve diminuição da concentração inibitória mínima do fármaco (Figura 1).

Figura 1: Concentração inibitória mínima (μ g/mL) de aminoglicosídeos na ausência e presença do eugenol e sabineno.



Fonte: Próprio autor

Os antibióticos aminoglicosídeos são significativos para o arsenal terapêutico antibacteriano desde seu descobrimento na década de 40. Desde então, foi evidenciada uma série de novas substâncias com ação antibacteriana, derivadas dos actinomicetos, assim como os aminoglicosídeos semi-sintéticos, netilmicina e amicacina, derivados da canamicina e sisomicina (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

A gentamicina é um antibiótico da categoria dos aminoglicosídeos, e por essa razão apresenta ação contra microrganismos Gram negativos aeróbicos. É empregada para tratar infecções graves como aquelas causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, e quando associada com outros fármacos como betalactâmicos e vancomicina é utilizada para o tratamento de infecção sistêmica grave. A associação com outros fármacos proporciona maior penetração intracelular da gentamicina, o que resulta em um maior espectro de ação do medicamento frente a bactérias Gram positivas (SILVEIRA, 2017). Com base no resultado obtido no presente estudo, pode-se deduzir que a solução A foi capaz de melhorar a ação da gentamicina frente a cepa Gram positiva, que pode ter ocorrido devido a uma maior concentração do fármaco dentro da célula.

A clindamicina pertence à classe das lincosamidas e é um poderoso antibiótico contra bactérias anaeróbicas estritas e facultativas, envolvendo aquelas produtoras de beta lactamases. Pesquisas afirmam que a clindamicina é um agente antimicrobiano eficiente frente a bactérias presentes em abscessos perirradiculares agudos, indicando seu uso no tratamento de infecções odontogênicas graves em casos de insucesso no tratamento com penicilina ou quando esse antibiótico é contra indicado, perante as controvérsias da seleção do antibiótico em pacientes alérgicos à penicilina, que a clindamicina também é uma boa alternativa para conter a resistência bacteriana (ALFENAS et al., 2014). Diferentemente dos resultados com a

gentamicina, no presente estudo, não foi possível verificar melhora do efeito da clindamicina quando associada ao produto natural.

Caldas (2011), descreveu em seu estudo que o óleo essencial do *Ocimum gratissimum*, rico em Eugenol, frente à *S. aureus*, apresentou efeito sinérgico com gentamicina, benzilpenicilina, e ceftriaxona. Já Leandro (2018), exibiu resultados semelhantes em seu estudo utilizando outra metodologia associada ao aparelho de LED.

O ensaio realizado por Zago et al (2009), revelou ação positiva entre determinados antibióticos e óleos essenciais: Para *S. aureus*, gentamicina, cefepime, e cefalotina teve seu perfil de sensibilidade otimizado quando exposta a terapêutica com óleo essencial de capim cidreira e de hortelã.

Os óleos ricos em eugenol e outros aldeídos apresentam boa ação bactericida. Vários autores conferem ao composto majoritário do óleo de cravo, o eugenol, não só efeito bactericida, mas também outras propriedades biológicas. No entanto, a ação em conjunto com vários compostos existentes nos óleos é denominada sinergismo, o que outorga uma boa capacidade antibacteriana (RODELLA, 2015).

A maioria dos estudos analisados que tratam da atividade antibacteriana e moduladora de compostos naturais, revelam que óleos essenciais que possuem eugenol como componente majoritário ou o próprio composto isolado, apresentam efeitos promissores. Com relação as pesquisas com o composto sabineno, o número de estudos são bem menores, mas também mostram que esse composto pode apresentar efeito contra microrganismos, sendo importante novos estudos para evidenciar o potencial da combinação dessas duas substâncias.

4 CONCLUSÃO

Por meio dos ensaios e estudos realizados ao longo do desenvolvimento deste trabalho, foi possível comprovar que as substâncias isoladas eugenol e sabineno associados apresentaram efeito antibacteriano contra *E. coli* e *S.aureus*, e nos testes de modulação, a solução A + gentamicina exibiu bons resultado de ação contra a cepa *S. aureus*, dessa forma, podendo servir futuramente como uma nova ferramenta no combate a bactérias resistentes, através da elucidação desses efeitos e também de suas possíveis ações tóxicas ao organismo humano, para que assim possa ser desenvolvido um futuro fármaco antimicrobiano derivado de produtos naturais.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, L. C. B. et al. Efeito modulador do extrato de plantas medicinais do gênero *Spondias* sobre a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* à Eritromicina. **Rev. Ciênc Farm. Básica. Apl**, v. 36, n. 1, 2015.
- ALFENAS, C. F. et al. Antibióticos no tratamento de abscessos perirradiculares agudos. **Rev. Bras. Odontol**, v. 71, n. 2, 2014.
- CARVALHO, V. R. A. et al. Antibiotic-modifying activity and chemical profile of the essential oil from the leaves of *Cordia verbenacea* DC. **Journal. of. Essent. Oil .Bearing. Plants**, v. 20, n. 2, 2017.
- COLARES, L. F. **Detecção de inibidores de proteases em cinco espécies vegetais nos vales do jequitinhonha e mucuri**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia, Tecnologia e Gestão) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus Mucuri. Teófilo Otoni-MG, 2016.
- COUTINHO, H. D. M. et al. Effect of *Momordicacharantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**, v. 33, n. 1, 2010.
- GUIMARÃES, C. C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev. Bras. Bioci**. v. 15, n.2, 2017.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of eugenol: A structure–activity relationship study. **Journal. Of. Medici. Food**, v. 14, n. 9, 2011.
- KAYACI, F; ERTAS, Y; UYAR, T. Enhanced thermal stability of eugenol by cyclodextrin inclusion complex encapsulated in electrospun polymeric nanofibers. **Journal. Agric. Food. Chem**, v. 61, n.1, 2013.
- LEANDRO, M. K. N. S. **Potencial antibacteriano e modulador do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* DC e do eugenol em associação com o aparelho de led**. 2018. Dissertação (Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular) - Universidade Regional do Cariri - URCA. Crato-CE, 2018.
- LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Rev. Port. Saúde Públi**, v. 34, n. 1, 2016.
- MANINI, P. R. **Efeito do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum kunth* e compostos majoritários em linhagens tumorais**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2015.
- MESSIAS, M. C. T. B. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 17, n. 1, 2015.
- MORAES, F. C. **Avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Ocimum americanum*, *Ocimum gratissimum* e *Ocimum selloi* frente a bactérias aeróbias prevalentes**

em úlceras de decúbito. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2014.

NCCLS. The national committee for clinical laboratory standards the methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 6^a ed. NCCLS document M7-A6. Wayne (PA): NCCLS; 2003, M07-a10.

OLIVEIRA, J. F. P; CIPULLO, J. P; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Braz. J. Cardiovasc. Surg**, v. 21, n. 4, 2006.

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciênc. Agrotec. Lavras**, v. 32, n. 3, 2008.

PHUNPEE, S. et al. A comparison of eugenol and menthol on encapsulation characteristics with water-soluble quaternized β -cyclodextrin grafted chitosan. **Internat. Journal. of .Biologi. Macromole**, v. 84, n.1, 2016.

QIU, J. et al. *Staphylococcus aureus* virulence-related exoproteins in eugenol reduces the expression of. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 76, n. 17, 2010.

RODELLA, F. M. **Extração e atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-índia.** 2015. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis. Assis, 2015.

RODRIGUES, L. S. et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta. Toxicol. Argent**, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 23, n. 1, 2015.

SALVAT, A. et al. Screening of some plants from North Argentina for their antimicrobial activity. **Let. In. Appli. Microbio**, v. 32, n. 5, 2001.

SILVEIRA, E. C. **Validação de metodologia farmacopéica para análise de sulfato de gentamicina por cromatografia líquida de alta eficiência para aplicação na indústria farmacêutica.** 2017. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química) -Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Bauru. Bauru, 2017.

ZAGO, J. A. A. et al. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 19, n. 4, 2009.