

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

CARLOS EBERTON ALVES MANGUEIRA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO EXTRATO ETANÓLICO
Matricaria recutita L. **FRENTE A** *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Juazeiro do Norte – CE,
2019

CARLOS EBERTON ALVES MANGUEIRA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO EXTRATO ETANÓLICO
Matricaria recutita L. FRENTE A Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa

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: Prof(a) Ma. Tassia Thais Al Yafawi

CARLOS EBERTON ALVES MANGUEIRA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO EXTRATO ETANÓLICO
Matricaria recutita L. FRENTE A Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa

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: Prof(a) Ma. Tassia Thais Al Yafawi

Data da Aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.(a) Ma. Tassia Thais Al Yafawi
Orientadora

Prof. Esp. José Junior dos Santos Aguiar
Examinador 1

Prof. Esp. Maria Dayane Alves De Aquino
Examinador 2

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO EXTRATO ETANÓLICO *Matricaria recutita* L. FRENTE A *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Carlos Eberton Alves Mangueira¹, Ma.Tassia Thais Al Yafawi²

RESUMO

O presente estudo tem por objetivo avaliar o perfil de resistência a antibióticos e a sensibilidade ao extrato de *Matricaria Recutita* L. frente as bactérias *Staphylococcus Aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os testes antibacterianos e modulatórios foram feitos através do método de microdiluição em placas. Na análise da atividade antibacteriana do extrato etanólico *Matricaria Recutita* (EEMR) foi observado uma CIM de 512ug/mL frente à cepa de *Pseudomonas aeruginosa* e 1024ug/mL para a cepa de *Staphylococcus aureus*. Nos testes modulatórios observou uma atividade sinérgica quando o extrato foi combinado ao antibiótico gentamicina frente à cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Conclui-se que o extrato atuando de forma isolada não possui relevância clínica em relação a atividade antibacteriana, porém quando combinado a um antibiótico aminoglicosídeo houve uma redução da concentração inibitória mínima.

Palavras-chave: Atividade Antibacteriana, *Matricaria Recutita* L., *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT *Matricaria Recutita* L. FRONT A *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Carlos Eberton Alves Mangueira³, Ma.Tassia Thais Al Yafawi⁴

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the antibiotic resistance profile and sensitivity of the *Matricaria Recutita* L. extract against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. The antibacterial and modulatory tests were done through the plate microdilution method. In the analysis of the antibacterial activity of the *Matricaria Recutita* ethanolic extract (EEMR), a MIC of 512ug / mL was observed against the *Pseudomonas aeruginosa* strain and 1024ug / mL for the *Staphylococcus aureus* strain. In the modulatory tests a synergistic activity was observed when the extract was combined with the antibiotic gentamicin against the *Pseudomonas aeruginosa* strain. It was concluded that the extract acting in isolation does not have clinical relevance in relation to the antibacterial activity, but when combined with an aminoglycoside antibiotic there was a reduction of the minimum inhibitory concentration.

Keywords: Antibacterial activity, *Matricaria Recutita* L., *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

¹ Discente de Biomedicina, carloseberton@gmail.com, Centro Universitário Dr. Leão Sampaio

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

³ Discente de Biomedicina, carloseberton@gmail.com, Centro Universitário Dr. Leão Sampaio

⁴ Docente do curso de Biomedicina, thaisyafawi@leaosampaio.edu.br, Centro Universitário Dr. Leão Sampaio

1 INTRODUÇÃO

As antigas civilizações já utilizavam as plantas medicinais como auxílio no tratamento e até em curas de enfermidades, além de serem usadas para a alimentação e na produção de remédios. Tendo em vista a sua grande aceitação popular, as indústrias farmacológicas começaram a analisar essas plantas (SANTOS; NUNES & MARTINS, 2012).

Os costumes da utilização de produtos naturais são repassados de geração a geração, com a facilidade da obtenção, deve ser cada vez mais estudadas para que a população não utilize de forma errada e acabem tendo efeitos indesejados na mesma (MOTTA; LIMA; VALE, 2016).

A população começou a ter um cunho científico maior, com mais informações gerada das grandes indústrias farmacológicas, fazendo com que a sociedade utilizasse com menos frequências as plantas medicinais e valorizando a grande eficácia dos antibióticos. Essa eficácia acabou disseminando o uso dos antibióticos, mas sem critérios definidos. A sua utilização exacerbada culminou na resistência bacteriana de algumas bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras...), tornando assim alguns antibióticos ineficazes (LIMA; BENJAMIM; SANTOS, 2017).

Pseudomonas aeruginosa bacteria aeróbia, não fermentador de glicose, não esporulado, bacilo Gram negativo, possui flagelo polar, forma de bastonete e pertence a família *Pseudomonadaceae*. É uma bactéria oportunista que pode ser encontrada na água, solo e na região bucal de pessoas hospitalizadas. (DELGADO et al., 2018)

Staphylococcus aureus pertence a família *Micrococcaceae*, bactéria Gram positiva, anaeróbia facultativa, tendo um crescimento maior sob condições aeróbicas, em forma de cocos (cachos de uva) e presente na microbiota normal. A resistência a antibacterianos dessa bactéria esta cada vez maior, por isso é uma das principais bactérias de interesse medico (GARCIA; COSTA; CRUZ; GONÇALVES, 2017).

A camomila (*Matricaria recutita* L.) é uma erva originária da Europa, cultivada em todo o mundo inclusive na região centro sul do Brasil (Matos, 1998). Planta amplamente utilizada na medicina popular, para os fins como antiinflamatório e espasmolítico gástrico ação calmante da camomila assim como suas atividades analgésica, carminativa, cicatrizante e emenagoga (BRUNETON, 1991; MARTINS et al., 1998).

O pineno, borneol, 1,8 - cineol, cânfora e o álcool santolínico são os principais constituintes da camomila selvagem. É muito importante para o meio científico, por ter ação bactericida e parasiticida (CUNHA; NOGUEIRA; ROQUE, 2012).

Este produto natural ainda tem ação antifúngica, antioxidante, antibacteriana, antiespasmódica, anti-inflamatória e antipruriginosa. O composto 9 bisabolol é responsável pela atividade antimicrobiana e pela ação anti-inflamatória (ROBY et al., 2013).

Dessa forma este trabalho teve como objetivo verificar o potencial da atividade antibacteriana e moduladora da resistência à aminoglicosídeos do extrato etanólico de *Matricaria recutita* L..

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

A coleta das folhas do material vegetal da espécie *Matricaria recutita* L.. (Asteraceae) foi realizada em mercado público da cidade de Juazeiro do Norte - CE.

2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO

O extrato etanólico de *Matricaria recutita* (EEMr) foi preparado a partir de 500 gramas das folhas secas, previamente triturados e submetidos a extração exaustiva a frio com 1 mL de etanol por 72 horas. Após esse período o produto natural foi submetido ao banho-maria por 48 horas a 70° C, chegando a evaporar para obtenção do extrato bruto, com um rendimento de 130 gramas.

2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.

As linhagens de microrganismos utilizadas foram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. As cepas bacterianas foram estocadas em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI), de forma a conservarem inalteradas todas as suas características bioquímicas e perfil de sensibilidade a antimicrobianos.

O EEMr foi solubilizados inicialmente em água destilada e dimetilsulfóxido (DMSO) de forma a obter-se uma solução estoque de 1024 µg/mL. Os testes foram efetuados em triplicata. Para revelação dos resultados, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica em água destilada na concentração de 0,01%.

As atividades antimicrobianas do EEMr foram avaliadas utilizando a metodologia de microdiluição em caldo, com base no documento M7-A6 (NCCLS; CLSI 2017). Previamente, as cepas dos microrganismos foram ativadas em meio *Brain Heart Infusion* Broth (BHI) durante 24 h a 35 ± 2 °C. Após este pré-cultivo ocorreu à padronização do inóculo, que consistiu na preparação de suspensões em BHI a 3,8%, com turvação correspondente a 0,5 da Escala McFarland (1 x 10⁸ UFC/mL). Em seguida essas suspensões foram diluídas até 1 x 10⁶ UFC/ mL em caldo BHI a 10%, e volumes de 100 µL foram então homogeneizados em placa de microdiluição com 96 poços, acrescido de diferentes concentrações dos extratos

separadamente e em conjunto, resultando num inóculo final de 5×10^5 UFC/mL (NCCLS; CLSI, 2017).

Após a incubação, 20 µL da solução indicadora (Resazurina) foram adicionados em cada cavidade e as placas passaram por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. Ao final do período, a leitura foi feita baseada na coloração dos poços, sendo que os azuis indicam ausência de crescimento e os róseos indicam crescimento (MANN; MARKHAN, 1998; PALOMINO et al., 2002).

2.4 AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DO EXTRATO SOBRE A RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS

Para avaliar o EEMr como moduladores da ação antibiótica, a CIM de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos e cefalosporinas (Gentamicina e Cefazolina) foi avaliada na presença e na ausência do extrato em microplacas estéreis. Os antibióticos foram avaliados nas concentrações variando de 1024 a 2µg/mL. Todos os antibióticos testados foram obtidos junto a Sigma®.

O EEMr foi misturado em caldo BHI 10% em concentração de 1024µg/mL. A preparação das soluções de antibióticos foi realizada com a adição de água destilada estéril em mesma concentração dobrada (1024µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL diluídas seriadamente 1:1 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100µL do meio de cultura conterà a suspensão bacteriana diluída (1:10). Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para o extrato foram utilizados durante a modulação (SANTOS et al., 2004), modificado. As placas preenchidas no sentido alfabético e incubadas a 35°C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de Resazurina, como citado anteriormente no teste de determinação da CIM. Todos os testes foram realizados em triplicatas para que fossem posteriormente submetidos à análise estatística.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Amostra de folhas representativas da espécie de *Matricaria recutita* L. (Asteraceae) foram coletadas no mercado público e processadas em exsiccatas, em seguida encaminhadas e depositadas no herbário Dárdano de Andrade Lima, na Universidade Regional do Cariri – Urca

Os resultados dos testes foram obtidos em triplicata e expressos como média geométrica. Para análise estatística foi aplicada a ANOVA seguida do Bonferroni post test. Utilizando o software GraphPad Prisma 6.0 (Matias, 2013), considerando significância com $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA: Resultados obtidos no presente trabalho

Matricaria recutita	Gentamicina	Cefazolina	extrato	Gentamicina + extrato	Cef. + extrato
<i>Staphylococcus aureus</i>		256-256-256	0-0-0		128-128-128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	256-256-256		512-512-512	64-64-64	

Nos testes de ação antimicrobiana o EEMr não teve efeito clinicamente significativo para bactéria *Staphylococcus aureus* com CIM maior ou igual a 1024ug/mL e para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* a CIM foi igual a 512ug/mL. Esses resultados corroboram com Carvalho (2014) em técnica de microdiluição em caldo.

O extrato aquoso de *Matricaria recutita* foi ativa para *Pseudomonas aeruginosa* (CIM igual a 512ug/mL), contudo estudos realizados por Romero et al. (2005) e Simionatto (2004) não obtiveram tal atividade para essa bactéria, porém foi detectado a mesma inatividade bacteriana quando testada frente ao *Staphylococcus aureus*, tendo como resultado o CIM igual ou superior a 1024ul/mL.

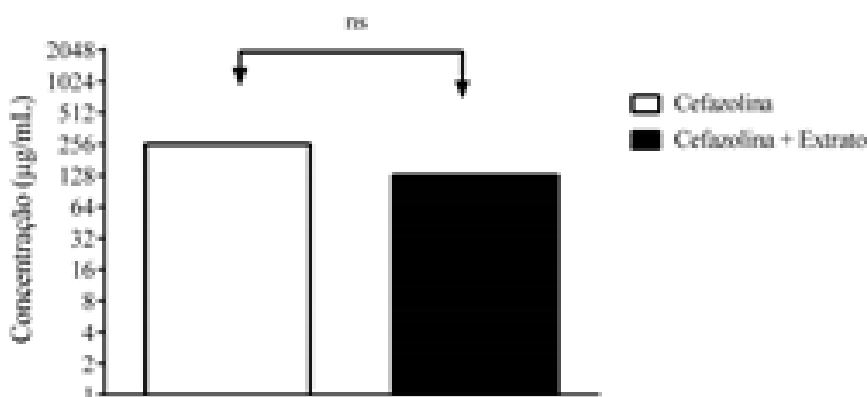
Quando foi realizado estudo com *Matricaria recutita* por Hartmann; Onofre (2010) os resultados estavam divergentes quando comparado com a atividade do extrato, provavelmente

por se tratar de uma parte diferente da planta (Flores). Foi testado o óleo essencial puro frente a *Staphylococcus aureus*, teve atividade antibacteriana, entretanto quando testada a *Pseudomonas auriginosa*, não constatou nenhuma atividade antibacteriana.

De acordo com Silva (2010) os óleos essenciais possuem maior eficiência a atividade antibacteriana em relação ao extrato, mas ambos os compostos foram detectados a ação antimicrobiano do extrato etanólico *Matricaria recutita*.

Para a modulação do extrato de EEMr com cefazolina frente a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC, como ilustrado no gráfico 1, obteve-se uma CIM de 128ug/mL demonstrando que o extrato é indiferente quando combinado com o antibiótico.

GRÁFICO 1. Atividade Modulatória do EEMR quando combinado a um antibiótico Cefazolina frente a cepa de *Staphylococcus aureus*



Segundo Burt, (2004); Al-Bayati, (2008); Izadi et al., (2010) o extrato etanólico *Matricaria recutita* possui ação antibacteriana, confirmando os resultados do presente trabalho, no qual o uso do extrato apresentou sinergismo.

Foi realizado testes antibacteriano por Munir et al., (2014) do extrato etanólico *Matricaria recutita* frente a cepas bacterianas, dentre elas o *Staphylococcus aureus*, tendo efeito bacteriano sobre a mesma, corroborando com o presente trabalho, que obtve uma atividade bacteriana do extrato etanólico *Matricaria recutita* com uma maior concentração.

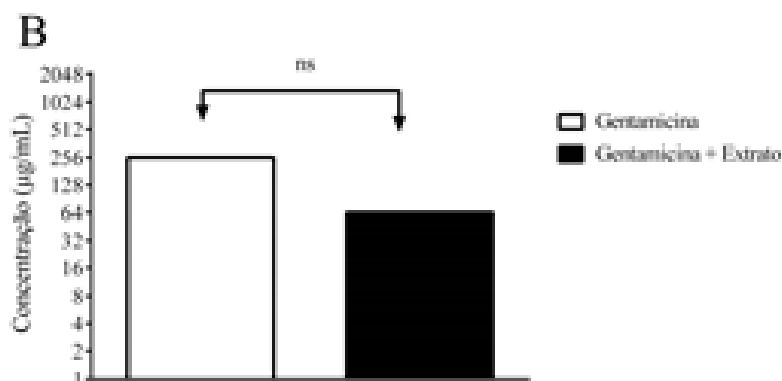
Nos testes de modulação em triplicata quando usado o EEMr com a Cefalozina a inibição da colônia de bactéria . *Staphylococcus aureus* foi de 128ug/mL., este resultado é compatível com Munir et al., (2014) onde foi realizado a modulação do extrato etanólico *Matricaria recutita* frente a *Staphylococcus aureus*, do mesmo modo apresentando atividade antibacteriana.

HO et al., 2001 acredita que os sinergismo observado em modulação de plantas medicinais e aminoglicosídeos pode ser devido a constituição de metabolitos secundários oriundos das próprias plantas, que são sintetizados por elas em resposta a infecções microbianas. Matias (2010) explana bem em sua tese de mestrado a ação desses metabólitos e descreve os flavonoides como principal agente antimicrobiano contra uma ampla variedade de microrganismos.

Os antibióticos são moléculas hidrofílicas, compostas por um anel aminociclitol central unido a um ou mais amino açúcar através de ligação glicosídica, para Magnet (2005) seja o motivo para o qual a modulação com plantas medicinais varie de acordo com a planta em estudo e as condições a elas empregadas.

A atividade antibacteriana do EEMR e da modulação da mesma, os resultados de Silva (2010), foram poucos significantes frente a *Staphylococcus aureus*, correspondendo ao resultados do presente trabalho, onde a o CIM foi igual ou superior a 1024ul/mL, quando testado o EEMR, porém obteve uma CIM de 128ul/mL quando feita a modulação.

GRAFICO 2. Atividade Modulatória do EEMR quando combinado a um antibiótico Gentamicina frente a cepa de *Pseudomonas aurginosa*.



Nos testes de modulação em triplicata quando usado o EEMR com a gentamicina a inibição da colônia da bactéria *Pseudomonas aurginosa* foi de 64 ug/mL, como ilustrado no gráfico 2. Este resultado é compatível com Silva (2015) e Figueiredo et al., (2010) quando utilizado a modulação do EEMR frente a *Pseudomonas aurginosa*, teve um resultado pouco significativo.

Segundo Figueirado et al. (2013) efeitos dos metabólitos presente em planta medicinais que atuam sinergicamente com aminoglicosídeos, pode ser uma alternativa para a

diminuição de reações adversas, diminuindo a CIM as doses necessárias atuais para uso terapêutico desses medicamentos devem diminuir.

4 CONCLUSÃO

O EEMr não teve atividade antibacteriana e atividade modulatória significativo estatisticamente para os testes de concentração inibitória mínima frente as cepas bacterianas testadas, frente a modulação a aminoglicosídeo, gentamicina, frente a bactéria *Pseudomonas auriginosa*. Contudo ocorre um sinergismo do EEMr quando analisado em conjuntos aos antibióticos gentamicina e cefazolina. A planta estudada pode ser uma fonte de compostos que desempenhem alguma atividade antibacteriana, porém outros estudos precisam ser realizados para elucidação dos resultados.

REFERÊNCIAS

- AL-BAYATI, F. A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, 2008.
- BRUNETON, J; FRESNO, À. V; ACCAME, E. C. Elementos de fitoquímica y farmacognosia. **Acriba**, 1991.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, 2004.
- CARVALHO, A. F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, 2014.
- DA CUNHA; ROQUE, O. R.; NOGUEIRA, T.N. A. Proença et al. Plantas aromáticas e óleos essenciais: composição e aplicações. **Fundação Calouste Gulbenkian**, 2012.
- DELGADO, L. A. et al. Atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto da *Gossypium hirsutum* L. Contra *Pseudomonas aeruginosa*. **Uningá**, v. 55, n. 4, 2018.
- FIGUEIREDO, E. A. P. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, 2010.

FIGUEREDO, F. G. et al. Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* AC Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, v. 2013, n.1, 2013.

GARCIA, P. D. P. et al. Contagem de *staphylococcus aureus* em alimentos como tema gerador no ensino de microbiologia de alimentos. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 9, n. 2, 2018.

HARTMANN, K. C.; ONOFRE, S. B. Atividade Antimicrobiana de óleos essenciais da camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 3, 2010.

HO, K. Y. et al., Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n.2, 2001.

IZADI, Z. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Feverfew (*Tanacetum parthenium*) Essential Oil. **International Journal of agriculture & biology**, v. 12, n. 5, 2010.

LIMA, C. C.; BENJAMIM, S. C. C.; SANTOS, R. F. S. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **CuidArte Enfermagem**, v. 11, n.1, 2017.

MAGNET, S.; BLANCHARD, J. S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. **Chemical reviews**, v. 105, n. 2, 2005.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of applied microbiology**, v. 84, n. 4, 1998.

MARTINS, E. R., CASTRO, D. M., CASTELLANI, D.C .E. Plantas medicinais. Viçosa: **Editora UFV**, 1998.

MATIAS, E.F.F. **Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana a aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* A.(velame), *Ocimum gartissimum* (alfavaca) e *Cordia verbanacea* DC.(erva-baleeira)**. Crato, CE: Universidade Regional do Cariri–URCA, 2010.

MATIAS, E. F. F. et al. Biological activities and chemical characterization of *Cordia verbanacea* DC. as tool to validate the ethnobiological usage. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 1, 2013.

MATOS, F.J. Farmácias vivas – sistema de utilização de plantas medicinais para pequenas comunidades. 3. ed. Fortaleza: **EUFC Edições**, 2002. 219p.

MOTTA, A. O.; LIMA, D. C. S.; VALE, C. R. Levantamento do uso de plantas medicinais em um centro de educação infantil em Goiânia – GO. **Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 1, 2016.

MUNIR, N. et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of two endangered plant species *atropa belladonna* and *matricaria chamomilla*. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 11, n. 5, 2014.

NCCLS, CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Nccls, v. 17, 2017.

PALOMINO, J.C; MATIN, A; CAMACHO; GUERRA, H; SWINGS, J; PORTALES, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, 2002.

para tratamento de diabetes. **Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, 2012.

ROBY, M. H. H. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). **Industrial crops and products**, v. 44, n.1, 2013.

ROMERO, C. D. et al. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, 2005.

SANTOS, M. M.; NUNES, M. G. S.; MARTINS, R. D. Uso empírico de plantas medicinais
SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 13, n. esp, 2004.

SILVA, F. R. N. S. Atividade moduladora do extrato etanólico da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre drogas antimicrobianas. 2015. **Dissertação –tcc**

SILVA, N. C. C; JUNIOR, A. F. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. 2010.

SIMIONATTO, E; MOREAL, A.F Estudos dos constituintes químicos de óleos voláteis de plantas medicinais do Rio Grande do Sul: isolamento, determinação e modificação e atividade biológica. 2004. 232p. **Tese de Doutorado** (Programa de Pós-graduação em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.