



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM – FFOE
CURSO DE FARMÁCIA

FABRICIO CESAR FERNANDES

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MODULADORA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS
FOLHAS DO QUIMIOTIPO II DE *Lippia alba* (MILL.) N.E. BROWN

Fortaleza

2015

FABRICIO CESAR FERNANDES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MODULADORA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS
FOLHAS DO QUIMIOTIPO II DE *Lippia alba* (MILL.) N.E. BROWN**

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nádia Accioly Pinto Nogueira.

Fortaleza
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- | | |
|-------|---|
| F399a | <p>Fernandes, Fabricio Cesar.</p> <p>Atividade atimicrobiana e moduladora do óleo essencial das folhas do quimiotipo II de <i>Lippia alba</i> (MILL.) N.E. Brown/ Fabrício Cesar Fernandes. – 2015.
52 f. : il.</p> <p>Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Curso de Farmácia, Fortaleza, 2015.
Orientação: Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira.</p> <p>1. Lippia. 2. Anti-Infeciosos. 3. Óleos Voláteis. I. Título.</p> |
|-------|---|
-
- CDD 615.1

FABRICIO CESAR FERNANDES

ATIVIDADE ATIMICROBIANA E MODULADORA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS
FOLHAS DO QUIMIOTIPO II DE *Lippia alba* (MILL.) N.E. BROWN

Monografia submetida à Coordenação do
Curso de Graduação em Farmácia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para a obtenção do título de
Farmacêutico.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Nádia Accioly Pinto Nogueira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Renata de Sousa Alves
Universidade Federal do Ceará – UFC

Me. Gleilton Weyne Passos Sales
Universidade Federal do Ceará – UFC

À Deus.

Aos meus pais Robson e Lucirene.

Aos meus irmãos Jobson, Rafael, Rodrigo e
Karine

À minha avó Antonieta e minhas tias Célia,
Vera, Sueli, Deise e Ruth

À minha noiva Carla.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e meu pai, Lucirene e Robson que sempre me apoiaram em todos os passos da minha vida, que mesmo nos dias de dificuldade, nunca deixaram de investir na minha educação e de meus irmãos. Saibam que o homem que me tornei hoje, foi fruto do esforço e dedicação de vocês. Muito obrigado por tudo, estarei sempre lutando pra ser alguém melhor para nunca lhes decepcionar. Amo muito vocês.

Ao meu irmão Jobson, por não ter duvidado da minha capacidade de passar no vestibular da UFC, por ter me ajudado de todas as formas possíveis para que hoje eu realizasse esse sonho. Muito obrigado, você foi pai e irmão. Te amo cara.

Aos meus irmãos Rafael e Rodrigo por me ensinarem o que é amor de irmão, mesmo nas brigas e discussões sempre temos motivo para continuar unidos. Muito obrigado por todo apoio e ajuda que sempre me deram em tudo na minha vida. Aprendo muito com vocês, com seus erros e acertos, saibam que amo vocês.

Aos meus avós, que sempre foram exemplo na minha vida, minha avó Leda que sempre mostrou o carinho e afeto de avó e que cuidou de mim e meus irmãos sempre com muito amor.

À minha avó Tetê que é minha segunda mãe, me ajuda em tudo que pode, me trata como um filho, briga bastante comigo, mas eu sei que a senhora faz isso pra me educar. Muito obrigado por tudo que fez na minha vida, por toda ajuda e apoio, hoje essa conquista é nossa, a senhora e minhas tias maravilhosas (Célia, Vera, Sueli, Deise e Ruth) contribuíram imensamente na minha formação. Amo vocês, sei que nunca serei capaz retribuir tudo o que fizeram por mim, só tenho que agradecer a Deus a sorte de ter vocês na minha vida.

Agradeço à minha noiva Carla, muito obrigado por ter me ajudado a estudar para as provas mais difíceis da faculdade, me incentivado a dar sempre o melhor de mim, por me dar força em cada decisão que tomo. Você mudou minha vida, me fez ver o mundo de outra forma, me trouxe paz. Nunca fui tão feliz como hoje ao seu lado. Em 8 meses estaremos casados, e só irei confirmar o que tenho certeza há 3 anos, SIM, quero você pra vida inteira.

Aos meus amigos do Icarai, Leo, Bruninho, Arcelino, Diego, Jadson, Tetef, Acélio, muito obrigado pelos momentos felizes dos mais de 12 anos que nos conhecemos, obrigado por me fazerem sorrir quando eu chorava, obrigado por dividirem a vida comigo.

Aos meus amigos de Rock, Barata, Robson, Aildson, Igor, Heric, Saulo, Eldinho, Nilo, Ismael. Vocês são irmãos, obrigado pelos 8 anos de amizade, pelos shows que fomos,

pelas musicas que fizemos juntos, pelos conselhos e piadas contadas. Obrigado por tudo.

À melhor turma de todas da faculdade de farmácia, turma 2014.2, que foram meus irmãos nesses 5 anos, sempre dispostos a ajudar no que fosse preciso. Amo vocês, nunca esquecerei dos nossos momentos tristes e felizes na faculdade. Guardarei vocês pra sempre no meu coração.

Aos amigos da faculdade, que em 5 anos se tornaram muito importantes na minha vida, principalmente no meu último semestre de faculdade, têm contribuído para diminuir o stress do dia a dia, muito obrigado pela amizade de vocês, em especial ao Alysso Oliveira, Bruno Ripardo, Thales, Urllan, Ícaro Freire, Ícaro Belmino, Marco Levi, Jackson, Ítalo e Jader, parceria pra vida inteira.

À todos do LabMicro – UFC, pela paciência, pelo carinho, conselhos e aprendizado. Foram 5 anos de convivência e amizade. Não posso deixar de agradecer à Andressa Hellen, Larissa Queiroz, Andrea Bessa, Anne Caroline, Suelen Carneiro, Luciana Oliveira, Eric Tobaruela, Adriana Albuquerque, Felipe Magalhães, Rafael Mendes e Gleilton Weyne muito obrigado pelos experimentos divididos, tardes molhadas matando e lavando material, encontros universitários, resumos, reuniões, conselhos, seminários... Foram cinco anos muito bem vividos ao lado de vocês. Sentirei muita saudade. Em especial, a minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Nádia Accioly Pinto Nogueira por tudo que me ensinou, não só sobre microbiologia, mas sobre responsabilidade, respeito, trabalho, dedicação, compromisso e amizade. Posso dizer que a senhora foi uma mãe nesses 5 anos, muito obrigado por tudo e por nunca ter desistido de mim.

Ao “chefe” Gleilton Weyne, que me fez crescer como pesquisador, me ajudou em todos meus experimentos e sempre me deu conselhos para que eu fosse sempre melhor a cada dia. Você foi, em todos os pontos, um excelente co-orientador, além de amigo paciente e atencioso. Muito obrigado por toda ajuda e contribuição neste trabalho, ela foi fundamental para o desenvolvimento do mesmo.

Aos membros e ex membros da Ipharma Jr. (Rafael Soeiro, Richard Rarison, Juliana Guimarães, Luanna Loyola, Diego Moreira, Anderson Lima, Luan Filipe, Luise Castro, Glaydson Reis, Beatriz Almeida, Athila Lacerda) por dividirem comigo a vivência em gestão que sempre sonhei na vida, por contribuírem no meu aprendizado empresarial e por juntos estarmos tentando mudar a sociedade através do ideal empreendedor. Em especial ao Helder Veras, fundador e idealizado da empresa e à Cristianne Medina, que mesmo sempre ocupada com suas atribuições na empresa e na faculdade, nunca negou me ajudar nas minhas atividades, desde que entramos para a Ipharma tem trabalhado pelo melhoramento contínuo,

tanto individual, como dos membros da empresa. Muito obrigado por lutar pra que esse sonho não morresse. Sem você, sem sua ajuda, a Ipharma teria acabado.

Ao Prof. Said Gonçalves da Cruz Fonseca, pelo apoio confiança no trabalho da Ipharma Jr., pela atenção e carinho com que trata os alunos, e pela imensa contribuição para nossa formação como farmacêuticos.

Aos membros do PET/UFC Farmácia, por sempre ajudarem quando precisei, pelos momentos de descontração, pelo carinho e amizade.

À Profª. Drª. Aparecida Tiemi Nagao Dias por ter possibilitado minhas leituras no espectrofotômetro em seu laboratório e ao Rafael de Oliveira por ter me ajudado a utilizar o aparelho.

À Profª. Drª. Renata de Sousa Alves por sempre ajudar os alunos quando solicitada e por estar sempre com um sorriso no rosto.

“Sobreviver e acreditar
que no final a verdade vai prevalecer.
E ninguém vai me derrubar,
nem todo mal desse mundo vai me enfraquecer”
(Lucas Silveira - Fresno)

RESUMO

Conhecida popularmente como Erva-cidreira, a espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown é uma planta amplamente utilizada na medicina popular brasileira para vários fins terapêuticos. Considerando estudos que comprovam o potencial antimicrobiano (ATM) do óleo essencial das folhas de *L. alba*, em especial do quimiotipo II (OELaII), esse estudo teve como objetivo avaliar sua interferência na ação de cinco antibióticos (Azitromicina (AZI), Ceftriaxona (CEF), Ciprofloxacino (CIP) e Vancomicina (VAN)), utilizados para combater infecções por *Staphylococcus aureus* resistente (ORSA) e sensível (OSSA) à oxacilina. O material botânico, folhas frescas do quimiotipo II de *L. alba*, foi obtido no Campo Experimental de Paraipaba da Embrapa Agroindústria Tropical e o OELaII foi obtido por hidrodestilação. As cepas padrões utilizadas no presente trabalho foram: *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458 (cepas OSSA); *S. aureus* CCBH 5330 e *S. aureus* ATCC 33591 (cepas ORSA). A atividade antimicrobiana do OELaII e dos ATM foi avaliada pela determinação das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Letal Mínima (CLM). Para determinação do efeito modulador (sinergismo, indiferença ou antagonismo) do OELaII sobre os ATM foi utilizado o Método de *Checkerboard* e o cálculo dos Índices de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). Os resultados obtidos mostram que a CIM do OELaII para as cepas OSSA e ORSA foram muito próximas, variando de 312 a 625 µg/mL. As CLM ocorreram na faixa de 312 a 1250 µg/mL. O efeito modulador do OELaII, demonstrado pelo método de *Checkerboard*, variou dependendo do antibiótico e da cepa testada, sendo a VAN o antibiótico com melhores resultados, pois em 100% das cepas testadas foi observado sinergismo da associação com o óleo essencial, até mesmo na concentração 1/16 da CIM do OELaII e ATM. Para a CIP, a associação resultou em efeito sinérgico para 50% das cepas testadas, sendo essas cepas resistentes à OXA. Já para a CEF, a associação foi indiferente para 100% das cepas testadas. A associação do OELaII com AZI foi antagônica para 75% das cepas e indiferente para 25%. Os resultados mostram que o OELaII modula positivamente a ação antimicrobiana da VAN e CIP, potencializando a eficácia desses ATM. Dessa forma, o OELaII pode ser considerado um candidato potencial ao desenvolvimento de um fármaco capaz de contribuir para o controle da resistência microbiana e para a redução das doses terapêuticas efetivas.

Palavras-chave: *Lippia*. Anti-Infecciosos. Óleos Voláteis.

ABSTRACT

Popularly known as “ervacidreira”, the *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown species is a popular plant that is largely used in Brazilian popular medicine to reach many therapeutic goals. Considering the studies that prove the antimicrobial potential (ATM) of the essential oil of *L. alba*, specially the chemiotype II (OELaII), this study had the goal to evaluate its interference in the action of five antibiotics (Azitromicin (AZI), Ceftriaxone (CEF), Ciprofloxacin (CIP) e Vancomicin (VAN)), used to fight *Staphylococcus aureus* oxacillin-resistant (ORSA) and *Staphylococcus aureus* oxacillin-sensitive infections. The botanic material, dried leaves of *L. alba* chemiotype II, was obtained from the Experimental Field, Embrapa Tropical in Paraipaba. The OELaII was obtained by hydrodistillation. The standard strains used on this study were: *S. aureus* ATCC 6538P and *S. aureus* ATCC 14458 (strains OSSA); *S. aureus* CCBH 5330 and *S. aureus* ATCC 33591 (strains ORSA). The antimicrobial activity from OELaII and the antibiotics was evaluated using the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Lethal Concentration (MLC). In order to determine the modulating effects (synergism, indifference and antagonism) from OELaII over the antimicrobials, it was used the *Checkerboard* Method and the Fractional Inhibitory Concentration Indices calculation. The results show that the OELaII MIC to the strains OSSA and OSRA were very close, varying from 312 to 625 µg/mL, as well as the MLC that varied from 312 to 1250 µg/mL. The modulating effect of OELaII demonstrated by the *Checkerboard* Method varied depending on the antibiotic and the tested strain, being VAN the antibiotic with better results, because in 100% of the tested strains was observed synergism of the association between these antibiotics and the essential oil, even in the 1/16 MIC concentration of OELaII and ATM. To the CIP, the association resulted in a synergic effect to 50% of the tested strains, being these strains OXA resistant. To the CEF, the association was indifferent for 100% of the tested strains. The OELaII and AZI association was antagonist for 75% of the strains and indifferent for 25%. The results show that the OELaII modulates positively the antimicrobial action of VAN and CIP, enhancing the efficacy of these ATM. Thereby; the OELaII can be considered a potential candidate to pharmaceutical development, capable of contributing to the antimicrobial resistance control and to the reduction of effective therapeutical doses.

Keywords: Lippia. Anti-Infective Agents. Volatile Oils.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise da Variação
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Antimicrobiano
AZI	Azitromicina
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEF	Ceftriaxona
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacino
CLM	Concentração Letal Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
DACT	Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
EPM	Erro Padrão da Média
FFOE	Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
<i>L. alba</i>	<i>Lippia alba</i>
LabMicro	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada
mg	miligrama
µg	micrograma
µL	microlitro
OELaII	Óleo Essencial de <i>Lippia alba</i> II
ORSA	Oxacillin Resistent <i>Staphylococcus aureus</i>

OSSA	Oxacillin Sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
OXA	Oxacilina
PADETEC	Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
VAN	Vancomicina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Lippia alba</i> (MILL.) N.E. BROWN, quimiotipo II, cultivados no Campo Experimental de Paraipaba, da Embrapa Agroindústria Tropical.....	24
Figura 2 - Cromatografia do OELaII.....	25
Figura 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do OELaII para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 6538P (OSSA).....	30
Figura 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do OELaII para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 14458 (OSSA).....	30
Figura 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do OELaII para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 33591 (ORSA).....	31
Figura 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do OELaII para cepa <i>S. aureus</i> CCBH 5330 (ORSA).....	32
Figura 7 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Azitromicina para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 6538P (OSSA).....	32
Figura 8 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Azitromicina para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 14458 (OSSA).....	33
Figura 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Azitromicina para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 33591 (ORSA).....	33
Figura 10 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Azitromicina para cepa <i>S. aureus</i> CCBH 5330 (ORSA).....	33
Figura 11 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Ceftriaxona para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 6538P (OSSA).....	34
Figura 12 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Ceftriaxona para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 14458 (OSSA).....	34
Figura 13 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Ceftriaxona para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 33591 (ORSA).....	35
Figura 14 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Ceftriaxona para cepa <i>S. aureus</i> CCBH 5330 (ORSA).....	36
Figura 15 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do Ciprofloxacino para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 6538P (OSSA).....	36
Figura 16 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do Ciprofloxacino para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 14458 (OSSA).....	37
Figura 17 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do Ciprofloxacino para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 33591 (ORSA).....	37
Figura 18 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Ciprofloxacino para cepa <i>S. aureus</i> CCBH 5330 (ORSA).....	38
Figura 19 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Vancomicina para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 6538P (OSSA).....	38
Figura 20 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Vancomicina para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 14458 (OSSA).....	39
Figura 21 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Vancomicina para cepa <i>S. aureus</i> ATCC 33591 (ORSA).....	39

Figura 22 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Vancomicina para cepa <i>S. aureus</i> CCBH 5330 (ORSA).....	40
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do óleo essencial das folhas do quimiotipo II de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown.	29
Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos antimicrobianos. (Continua).....	29
Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração inibitória fracionada (CIF) de OELaII e AZI e índice CIF da associação OELaII + AZI	41
Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração inibitória fracionada (CIF) de OELaII e CEF e índice CIF da associação OELaII + CEF.	41
Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração inibitória fracionada (CIF) de OELaII e CIP e índice CIF da associação OELaII + CIP.	41
Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração inibitória fracionada (CIF) de OELaII e VAN e índice CIF da associação OELaII + VAN.....	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Considerações Gerais.....	15
1.2	Planta Medicinal.....	16
1.3	Antimicrobianos e resistência bacteriana.....	17
1.4	Óleos Essenciais	19
1.5	<i>Lippia alba</i> e seus quimiotipos	20
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo Geral	23
3.2	Objetivos Específicos	23
4	MATERIAIS E MÉTODO	24
4.1	Material botânico.....	24
4.2	Extração do óleo essencial das folhas do quimiotipo II de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown	24
4.3	Cepas bacterianas	25
4.4	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	26
4.5	Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM).....	26
4.6	Avaliação do efeito modulador do OELaII na atividade de antibióticos de uso clínico	27
4.7	Análise Estatística	27
5	RESULTADOS	29
5.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM)	29
5.2	Efeito modulador do OELaII na atividade de antibióticos de uso clínico	40
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

As plantas têm sido utilizadas de diversas formas pela população para tratar doenças ao longo dos anos. A referência mais antiga que se conhece sobre essa utilização data em mais de sessenta mil anos, nas descobertas feitas em estudos arqueológicos no Irã. Na China, 3000 a.C, tem-se os primeiros vestígios de utilização de fitoterápicos, onde um imperador chinês catalogou 365 tipos de ervas medicinais e venenos utilizados naquela época (REZENDE; COCCO, 2002).

A observação popular dos efeitos terapêuticos de plantas chamadas “medicinais” impulsionou a ciência em busca de comprovação desses efeitos. Sabe-se que muitas plantas medicinais possuem compostos químicos com atividade terapêutica, entretanto sua utilização deve ser cautelosa, uma vez que, assim como um medicamento sintético essas substâncias podem trazer riscos ao usuário. Assim, para que o uso de uma planta medicinal seja considerado seguro, é necessário que sejam feitos estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos (RITTER *et al.*, 2002).

No Brasil, o farmacêutico pesquisador Dr. Francisco José de Abreu Matos, professor da Universidade Federal do Ceará, foi pioneiro em estudos com plantas medicinais. Seu trabalho tinha como objetivo catalogar as plantas utilizadas na medicina popular e elucidar a veracidade de seus efeitos terapêuticos, devolvendo esse conhecimento para a população (PHARMACIA BRASILEIRA, 2009).

É sabido que várias bactérias são capazes de desenvolver resistência às drogas utilizadas como agentes antimicrobianos, entre as cepas que apresentam resistência, *Staphylococcus aureus* é um patógeno versátil, capaz de causar uma grande variedade de infecções, que nos últimos anos aumentaram devido a presença de espécies resistentes a oxacilina (ORSA) (DUARTE, 2006; PACHECO, 2009).

O crescente problema da resistência microbiana aos futuros tratamentos com antimicrobianos leva a incerteza de sua viabilidade, sendo necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Assim, espera-se que os óleos essenciais (OEs) atinjam alvos moleculares nos microorganismos, diferentes dos antibióticos convencionais, de modo que, sejam ativos contra patógenos resistentes (DUARTE, 2006).

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos

vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência da planta, principalmente na defesa contra microrganismos. Os OEs possuem atividade antibacteriana e antifúngica, sendo extraídos de diversas partes vegetais (folhas, flores, sementes, raízes, cascas e tubérculos) de plantas aromáticas e medicinais (SIQUI *et al.*, 2000; BIZZO; HVELL; REZENDE, 2009)

A *Lippia alba*, também conhecida como “erva-cidreira”, ocorre nas Américas Central e do Sul e é encontrada praticamente em todas as regiões do Brasil, onde seu emprego como planta medicinal é bastante utilizado pelas suas propriedades sedativa, carminativa, analgésica, espasmolítica, emenagoga e antimicrobiana (MATOS *et al.*, 1996; VALE *et al.*, 1999; ZÉTOLA *et al.*, 2002; GEROMINI *et al.*, 20012).

Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo verificar o efeito do óleo essencial de *Lippia alba* do quimiotipo II (OELaII) na atividade antimicrobiana da Azitromicina (AZI); Ceftriaxona (CEF); Ciprofloxacino (CIP) e Vancomicina (VAN), a fim de buscar novas alternativas de formulações terapêuticas com menores concentrações e contribuindo para o controle da resistência bacteriana às drogas antimicrobianas.

1.2 Planta Medicinal

Uma planta é denominada medicinal quando possui substâncias ativas que provocam no organismo humano, reações que podem variar da cura ao abrandamento da doença (SILVA JÚNIOR, 1994).

No Brasil, a utilização de plantas para tratamento de determinadas enfermidades vem crescendo, alavancada pela busca de medicamentos de origem natural, que parte considerável da população acredita causar menos efeitos colaterais. Por outro lado, inúmeros pesquisadores salientam a necessidade do uso moderado de plantas medicinais objetivando evitar problemas quanto ao uso prolongado e indiscriminado destes produtos (MARINHO *et al.*, 2007; NEGRELLE *et al.*, 2007).

Em alguns países industrializados, como França, Itália e Alemanha, estima-se que entre 70% a 90% da população recorrem ao conhecimento popular, sob o cunho de “medicina complementar”, “alternativa” ou “não convencional”. Esta mesma taxa pode ser observada em países emergentes, porém sob uma realidade diferente, uma vez que o acesso aos medicamentos padronizados é precário, sendo a medicina popular a principal fonte de prevenção, tratamento e manutenção da saúde de grande parte da população nestes países,

(WHO, 2011).

O Brasil possui a maior biodiversidade de plantas do mundo, contando com um número estimado acima de 20% do número total de espécies do planeta. Com mais de 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial, esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado. Aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais (CARVALHO *et al.* 2007).

O uso de plantas e seus derivados pelo homem, objetivando a promoção e manutenção de sua saúde, podem ser comprovados historicamente por registros de longa data, como por exemplo, os egípcios, assírios, mesopotâmicos, indianos, chineses e outras civilizações que sempre contavam com a figura do pajé, xamã ou benzedor. O curandeiro local era a figura responsável pela indicação da espécie de planta correta para afecções variadas, desde febres, distúrbios psicológicos e gastrointestinais, infecções bacterianas, acne, gota, e até epilepsia, pelo emprego de formulações simples, como cataplasmas, chás, decoctos, pós, defumadouros, tinturas e outras formulações herbais (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Na medicina popular, as plantas são utilizadas concomitantemente ao uso de medicamentos convencionais (AMORIM, 1999). Neste uso associado, as plantas medicinais e/ou seus subprodutos podem atuar inibindo ou intensificando o efeito terapêutico dos medicamentos convencionais, bem como não interferir na resposta esperada (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Segundo Lima *et al.* (2003), existe um grande interesse no uso de plantas medicinais como fonte de agentes que combatem doenças causadas pela ação microbiana. Para tanto, estudos experimentais são essenciais para confirmar as possíveis propriedades antibióticas dessas plantas e de seus produtos derivados.

1.3 Antimicrobianos e resistência bacteriana

Os antimicrobianos são substâncias naturais (antibióticos) ou sintéticas (quimioterápicos) que agem sobre microrganismos inibindo o seu crescimento ou causando a sua destruição. (MOTA *et al.*, 2010).

Após sua descoberta em 1928, por Alexander Fleming, e sua disponibilização para a

população civil em 1944, antes exclusividade de militares, os antibióticos aumentaram a sobrevida após infecções e procedimentos cirúrgicos, pois sua utilização foi amplamente difundida de tal forma que os antibióticos são considerados os medicamentos mais vendidos no mundo segundo Van Boeckel *et al.* (2014).

Os antimicrobianos são a classe de medicamentos mais frequentemente prescritos em hospitais. Cerca de 40% dos pacientes hospitalizados são tratados com os mesmos, tanto para indicações terapêuticas como profiláticas, e seu emprego inadequado tem proporcionado o surgimento cada vez maior de microrganismos resistentes (BOLUFER *et al.*, 2004; RODRIGUES; BERTOLDI, 2010).

Uma cepa microbiana é considerada resistente a um agente antimicrobiano quando é capaz de se multiplicar na presença de concentrações de drogas antimicrobianas mais altas do que as doses terapêuticas dadas a humanos e/ou animais. A resistência microbiana é um fenômeno biológico e natural que se tornou efetivamente evidente após a terapia antimicrobiana na década de 1940 (BRAOIOS *et al.*, 2013).

Na maioria dos casos, a utilização destes medicamentos, realizada de forma abusiva e desnecessária, expõe a população a uma série de riscos, com implicações diretas no desenvolvimento da resistência bacteriana e inefetividade terapêutica, conseqüentemente, há aumento na morbidade, mortalidade e gastos com saúde decorrentes de processos infecciosos (CIFTÇI *et al.*, 2001; FIJN *et al.*, 2002; ABRANTES *et al.*, 2007; OBRELI NETO; VIEIRA; CUMAN, 2011)

A primeira utilização clínica de um antibiótico foi contra uma infecção por *Staphylococcus aureus*, desde então, a penicilina foi amplamente utilizada contra infecções estafilocócicas até os anos 60, quando começaram a aparecer as primeiras cepas resistentes. Com isso, foi criado o beta-lactâmico sintético meticilina, que era resistente à ação das beta-lactamases. Entretanto, o frequente uso das penicilinas penicilinase-estáveis, como meticilina e oxacilina, resultou, poucos anos depois no surgimento de cepas resistentes a meticilina/oxacilina - MRSA/ORSA.

O *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), de origem hospitalar ou comunitária, tem sido relatado como um dos principais problemas graves de saúde por apresentar resistência aos antibióticos beta lactâmicos e a outras muitas classes de antimicrobianos. Essa resistência a múltiplos antibióticos tem sido um fator que favorece a falha terapêutica devido à dificuldade de se encontrar uma antibioticoterapia ideal (FERREIRA *et al.*, 2009).

As pesquisas para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos são demasiadamente importantes para obtenção de um número maior de opções para o tratamento de infecções bacterianas, já que o uso cada vez maior dos antibióticos existentes fez com que as bactérias desenvolvessem mecanismos de defesa e resistência contra os agentes antimicrobianos disponíveis, dificultando e algumas vezes impossibilitando o tratamento dos enfermos.

1.4 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são substâncias naturais e complexas, sintetizados durante o metabolismo secundário de plantas aromáticas, caracterizando-se por serem voláteis e possuírem forte odor. Em sua maioria, estes óleos são extraídos de plantas naturais de regiões quentes como os trópicos e o mediterrâneo, onde representam parte importante da farmacopéia tradicional (MACHADO; FERNANDES JUNIOR, 2011).

Definidos pela *International Standard Organization* (ISO) como produtos obtidos de parte de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (PEREIRA, 2006).

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços) (SIMÕES *et al.*, 2004; PEREIRA, 2006).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para determinado órgão e característica do seu estágio de desenvolvimento. Contudo, as condições ambientais são capazes de causar variações, como a influência do ciclo vegetativo, em que a concentração de cada um dos constituintes do óleo pode variar durante o desenvolvimento do vegetal. (PIRES, 2007).

As plantas ricas em óleos essenciais devem ser coletadas pela manhã ou à noite, pois o período de exposição ao sol pode provocar uma perda quantitativa importante do óleo existente no vegetal. O grau de hidratação do terreno e os teores de macronutrientes (N, P, K) também podem influenciar a composição dos óleos voláteis. Entretanto, não se pode prever ou estabelecer um único padrão, pois cada espécie reage de forma diferenciada (CASTRO, 2006).

Vários estudos têm demonstrado diferentes atividades terapêuticas dos óleos essenciais, como atividade antimicrobiana (GEROMINI *et al.*, 2012), ação larvívica (RAJKUMAR *et al.*, 2010) e ação contra fungos (CARMO; LIMA; SOUZA, 2008).

As plantas aromáticas têm sido tradicionalmente utilizados na medicina popular, para estender a vida de prateleira de alimentos, mostrando inibição contra bactérias, fungos e leveduras, pois a maioria de suas propriedades são devidas aos óleos essenciais produzidos pelo seu metabolismo secundário (HULLIN *et al.*, 1998).

Os óleos essenciais, assim como outros extratos naturais de plantas, vêm sendo considerados uma alternativa importante no controle microbiano tanto na área médica como na indústria de alimentos, bebidas, etc (FORMOLO, 2009), eles são capazes de controlar microrganismos relacionados com a pele (ADAM, *et al.*, 1998), e a deterioração de alimentos, incluindo bactérias Gram-negativo e Gram-positivo (GALLI; FRANZETTI; BRIGUGLIO, 1985).

Sua origem natural é um meio mais seguro para o usuário e para o meio ambiente, pois apresenta menor risco de promover resistência microbiana aos seus componentes, já que são misturas de vários compostos que apresentam diferentes ações antimicrobianas, tornando assim, mais difícil a adaptação do microrganismo (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003).

1.5 *Lippia alba* e seus quimiotipos

A “erva-cidreira”, *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., é uma espécie pertencente a família *Verbenacea* comumente utilizada pela população brasileira como planta medicinal, devido às propriedades calmante, espasmolítica suave, analgésica, sedativa, ansiolítica e levemente expectorante (GAMA, 2012).

No Brasil, é popularmente conhecida como “erva-cidreira”, “erva-cidreira brasileira”, “erva-cidreira-do-campo”, “falsa-melissa”, “alecrim-do-campo”, “alecrim-selvagem”, “cidreira-brava, salva” (CORRÊA JUNIOR *et al.*, 1991).

A planta é um arbusto perene muito ramificado, com as brotações novas eretas, que tendem a ficar arqueadas com o crescimento, chegando a encostar no solo, onde normalmente enraizam, formando moitas de 1,5 a 2m de altura (SILVA JUNIOR, 1998; BIASI, 2003).

Matos (1998) relata que existem, no Nordeste do Brasil, três tipos de *Lippia alba*, caracterizados pelos constituintes químicos de seus óleos essenciais de suas folhas em três quimiotipos: quimiotipo I (mirceno, citral), quimiotipo II (limoneno, citral) e quimiotipo III

(limoneno, carvona).

Teixeira (2009), demonstrou que dentre os três quimiotipos de *L. alba*, o óleo essencial do quimiotipo II (OELaII), que contém grande teor de citral e limoneno, possui o maior e mais amplo espectro de atividade antimicrobiana. Neste estudo, observou-se que OELaI e OELaII possuíam em sua composição uma maior quantidade de citral (53,3% e 78,98%), respectivamente, onde OELaII possuía o maior teor. Por terem apresentando maior atividade antimicrobiana, e o OELaIII, que não possui citral, ter apresentando menor atividade, o estudo relaciona o citral como um possível responsável pelo potencial antimicrobiano, mas não descarta a possibilidade de sinergismo entre os constituintes do OELaII.

Rocha (2012), estudou a interferência do OELaII na ação da oxacilina sobre *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (ORSA), com resultados que revelaram que OELaII possui uma atividade sinérgica importante, reduzindo significativamente a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da oxacilina. Além disso, foi demonstrado que quando avaliado o efeito do tempo de exposição do microrganismo à combinação do OELaII com oxacilina, fica evidente a potencialização do efeito antimicrobiano da associação em relação a ação dos compostos separadamente.

Veras *et al.* (2011), em seu estudo, demonstrou o potencial sinérgico do OELa associado com eritromicina contra três tipo de cepas de *S. aureus*. O efeito mais expressivo foi o aumento 221,4% no diâmetro da zona de inibição de eritromicina sobre *S. aureus* ATCC 25923, na presença de 12% óleo essencial de *Lippia alba*.

Vários estudos envolvendo a *Lippia alba* tem demonstrado resultados importantes sobre o seu potencial terapêutico. O aumento do número de bactérias resistentes a antibióticos e a preocupação relativa à inexistência de tratamento contra cepas multi resistentes, faz com que os estudos para descobertas de novos agentes antimicrobianos sejam cada dia mais relevantes. Dessa forma surge a importância da investigação científica do potencial antimicrobiano e efeito modulador do OELa, a fim de que se possa elucidar uma nova alternativa terapêutica para o tratamento de infecções por cepas ORSA e OSSA.

2 JUSTIFICATIVA

A resistência microbiana é assunto problemático e atual, não só para a comunidade, mas principalmente para os profissionais de saúde e gestores públicos, pois além de aumentar os riscos de uma infecção, pode elevar os gastos públicos ligados ao tratamento e cuidado com o paciente.

O estudo para desenvolvimento de novas substâncias com potencial antimicrobiano é de extrema importância, pois essa investigação pode levar a produção de novos medicamentos para tratamento de infecções por microrganismos resistentes aos antibióticos já existentes.

As plantas medicinais vêm sendo estudadas há décadas em busca de compostos farmacologicamente ativos. Com a problemática da resistência microbiana, esses estudos tem se voltado bastante para descoberta de compostos vegetais com atividade contra microrganismos patogênicos, visto que o Brasil possui uma grande diversidade de plantas indicadas popularmente para tratar infecções, mas sem comprovação de sua efetividade.

A *Lippia alba*, estudada neste trabalho, possui no óleo essencial extraído de suas folhas, substâncias já comprovadas com ação antimicrobiana, como citral, limoneno e carvona. Dessa forma, faz-se necessário conhecer o efeito causado pela associação do óleo essencial com antibióticos utilizados na clínica, para se determinar a importância do tipo de interação (efeito sinérgico, indiferente ou antagônico), e assim embasar um estudo continuado para se desenvolver novos medicamentos para o tratamento de infecções microbianas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana das folhas do quimiotipo II de *Lippia alba* (mill.) N.E. Brown e sua ação moduladora na associação com antimicrobianos de uso clínico.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Letal Mínima (CLM) do OELaII, *in vitro*, sobre cepas ORSA e OSSA;

Avaliar o efeito modulador do OELaII na atividade antimicrobiana da AZI, CEF, CIP, VAN sobre cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes a oxacilina.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Material botânico

O material botânico, folhas frescas de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Figura 1), foi obtido no Campo Experimental de Paraipaba da Embrapa Agroindústria Tropical e sua exsicata foi depositada no herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com o número de tombo CEN 73.791.

Figura 1 - *Lippia alba* (MILL.) N.E. BROWN, quimiotipo II, cultivados no Campo Experimental de Paraipaba, da Embrapa Agroindústria Tropical



Fonte: Rocha (2012)

4.2 Extração do óleo essencial das folhas do quimiotipo II de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown

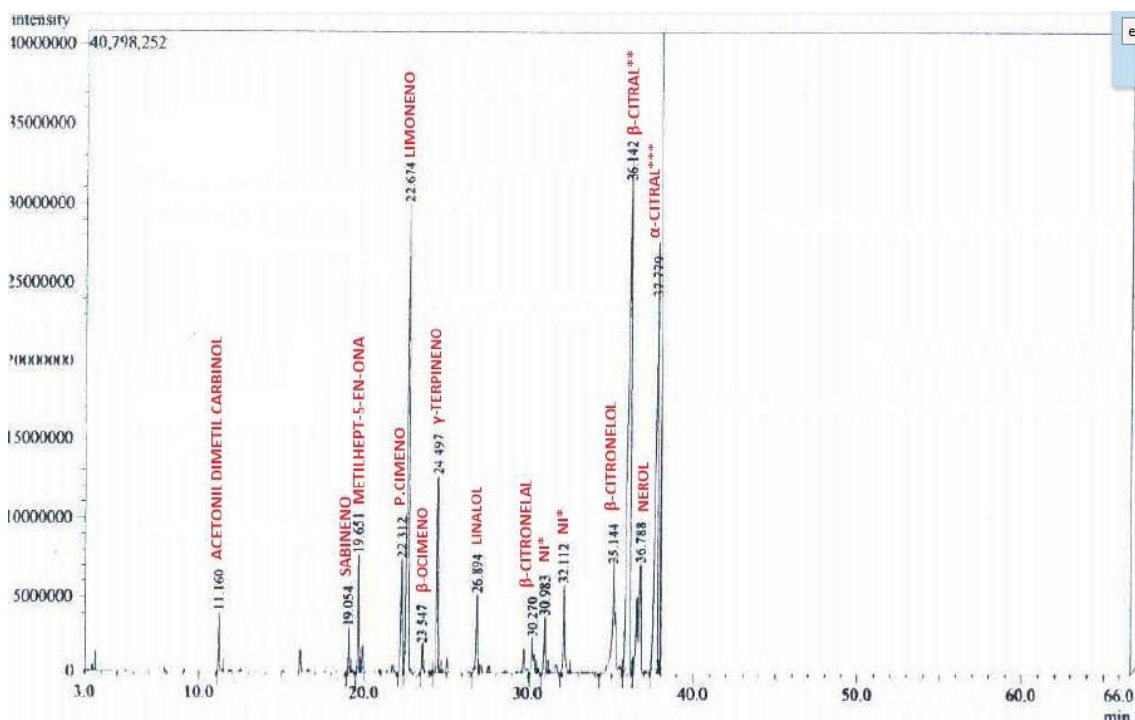
O óleo essencial (OELaII) foi obtido por hidrodestilação (arraste de vapor), a partir das folhas frescas do quimiotipo II de *Lippia alba*. As amostras foram colocadas em um mariote ligado a uma fonte de vapor, sendo o mesmo acoplado a um extrator tipo Clevenger e um condensador (CRAVEIRO, 1981). Após duas horas de extração, foram separadas as fases óleo/água no doseador. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e filtrada.

A análises dos constituintes do OELaII foi realizada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico da (PADETEC) da UFC através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CG/EM) (Figura 2). Os componentes do OELaII foram identificados através da comparação de seus espectros de massa com espectros existentes na

literatura (ADAMS, 2007).

O rendimento do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown foi de 0,182% (g/g).

Figura 2 - Cromatografia do OELaII



Realizada por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS). *NI: Composto não identificado; **Neral; ***Geranial

Fonte: PADETEC, UFC

4.3 Cepas bacterianas

Foram utilizadas quatro cepas de referência de *S. aureus*, sendo duas cepas resistentes a oxacilina (ORSA), *S. aureus* ATCC 33591 e *S. aureus* CCBH 5330; e 2 cepas sensíveis a oxacilina (OSSA), *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458.

Os procedimentos experimentais foram executados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LabMicro) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará (DACT-FFOE-UFC).

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM dos antibióticos (ATM) e do OELaII foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de cultura, de acordo com a metodologia descrita pelo CLSI (2003). Culturas microbianas puras mantidas em ágar estoque sob refrigeração foram repicadas em caldo infusão de cérebro e coração (caldo BHI, Merck) e incubadas a 35°C até atingirem fase exponencial de crescimento (6-10h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril para se obter uma turbidez comparável a do tubo 0,5 da escala de McFarland, o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, e diluída 100 vezes. Aos poços da placa de microdiluição foram adicionados 100 µL de caldo Muller Hinton (Merck), 100 µL do OELaII (20mg/mL a 10µg/mL diluído em solução com 1% de Tween 80) ou ATM e 5 µL da suspensão microbiana (aproximadamente 10^6 UFC/mL).

Aos poços-controle de inibição do crescimento microbiano, foram adicionados o meio de cultura, o agente antimicrobiano e o inóculo do microrganismo. Aos poços-controle de não inibição do crescimento microbiano, foram adicionados o meio de cultura, diluente do OELaII e ATM, e inóculo do microrganismo.

As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Passado esse tempo, foram submetidas à inspeção visual de crescimento microbiano e à leitura de absorbância a 620nm, em leitor de Elisa (Bio-Tek). A CIM foi considerada a menor concentração do OELaII ou ATM, capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, comprovada pela ausência de turvação visível. As leituras de absorbância foram utilizadas para evitar erros determinados pela turvação do OELaII.

4.5 Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM)

De forma asséptica, foram depositados inóculos de 5 µL obtidos a partir dos poços das microplacas usadas para a determinação da CIM que não apresentaram crescimento microbiano visível, na superfície do ágar *Plate-Count*. As placas foram incubadas a 35°C e após 24h foram feitas as contagens das colônias crescidas na superfície do ágar. A concentração do óleo essencial que determinou um crescimento microbiano na superfície do ágar $< 0,1\%$ do inóculo inicial, foi considerada a CLM, ou seja, a menor concentração capaz de determinar a morte de 99,9% das células microbianas.

O tamanho do inóculo microbiano inicial foi determinado pela técnica de microgotas (ROMEIRO, 2008), para confirmar se as suspensões microbianas usadas continham realmente

o número de UFC/mL desejado, ou seja, aproximadamente 10^6 UFC/mL. Para isso, foram adicionadas, assepticamente, 5 gotas contendo 5 μ L de uma suspensão microbiana com aproximadamente 10^4 UFC/mL à superfície do ágar *Plate-Count* (Merck) que foi incubado a 35°C por 24h. Após esse período, as colônias crescidas na superfície do ágar foram contadas, foi calculada a média aritmética e o valor obtido foi multiplicado pelo valor da diluição. Esse experimento foi realizado em duplicata e o resultado foi a média dos valores obtidos.

4.6 Avaliação do efeito modulador do OELaII na atividade de antibióticos de uso clínico

O efeito do OELaII na atividade antimicrobiana dos antibióticos Azitromicina (AZI), Ceftriaxona (CEF), Ciprofloxacino (CIP) e Vancomicina (VAN) sobre cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes a oxacilina foi avaliado pelo Método de Checkerboard, como descrito por Cleeland e Squires (1991), utilizando-se, para isso, microplacas estéreis com 96 poços. Aos poços das microplacas foram adicionadas alíquotas de 80 μ L de culturas microbianas contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL, 80 μ L de caldo Muller Hinton, 20 μ L do OELaII e 20 μ L dos antibióticos. Os valores de CIM de OELaII e dos ATM testados, previamente determinados, foram utilizados para obtenção das diferentes associações do OELaII e ATM.

As microplacas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. Após esse período foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano. Os resultados obtidos foram avaliados quanto o efeito modulador do OELaII na atividade antimicrobiana dos antibióticos testados. Foram observadas as associações que inibiram o crescimento microbiano (ausência de turvação) e elaborada uma tabela para facilitar a visualização dos resultados utilizando o calculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), que é determinado pela aplicação das formulas (EUCAST 2003):

$$\text{CIF do OE} = \text{CIM do óleo essencial na associação} / \text{CIM do óleo essencial isolado}$$

$$\text{CIF da ATM} = \text{CIM da ATM na associação} / \text{CIM da ATM isolada}$$

$$\text{ICIF} = \text{CIF do óleo essencial} + \text{CIF da ATM}$$

O Índice CIF (ICIF) foi interpretado como: efeito sinérgico para $\text{ICIF} \leq 0,5$, efeito aditivo ou indiferente para $\text{ICIF} > 0,5$ e $< 1,0$, e efeito antagonista para $\text{ICIF} > 1,0$

4.7 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do programa *Graph Pad Prism 5.0* (USA). Os resultados foram expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). Para

a verificação das diferenças estatísticas entre grupos foi realizada análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM)

Para a determinação de CIM e CLM de OELaII e dos ATM foram utilizados os testes de microdiluição em caldo de cultura de acordo com a metodologia descrita pelo CLSI (2003), e de contagem de células viáveis, respectivamente (BARON; PETERSON; FINEGOLD, 1994). Os resultados da CIM e CLM do OELaII estão expressos na Tabela 1, e os resultados de CIM e CLM dos antimicrobianos testados encontra-se na Tabela 2. Os resultados da CIM detectados através de leituras de absorbância a 620nm em leitor de Elisa (Bio-Tek) confirmaram os valores obtidos por inspeção visual de crescimento. Assim foram evitados erros de interpretação determinado pela turvação observada em poços onde o OELaII foi adicionado em maiores concentrações.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do óleo essencial das folhas do quimiotipo II de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.

Cepas Microbianas	OELaII	
	CIM (mg/mL)	CLM (mg/mL)
<i>S.aureus</i> ATCC 6538P*	0,312	0,312
<i>S.aureus</i> ATCC 14458*	0,625	0,625
<i>S.aureus</i> ATCC 33591**	0,312	1,250
<i>S.aureus</i> CCBH 5330**	0,625	0,625

*Cepa OSSA; **Cepa ORSA. Fonte: O autor (2015)

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos antimicrobianos. (Continua)

Antimicrobianos		Cepas Microbianas			
		<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	<i>S. aureus</i> ATCC 14458	<i>S. aureus</i> ATCC 33591	<i>S. aureus</i> CCBH 5330
AZI	CIM	0,117	0,117	500	31,25
	CLM	Nd	0,469	Nd	125,0
CEF	CIM	4,0	4,0	64,0	32,0
	CLM	8,0	16,0	Nd	Nd

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos antimicrobianos

CIP	CIM	0,125	0,125	0,5	32,0
	CLM	0,25	0,125	1,0	Nd
VAN	CIM	1,0	1,0	1,0	1,0
	CLM	2,0	2,0	4,0	1,0

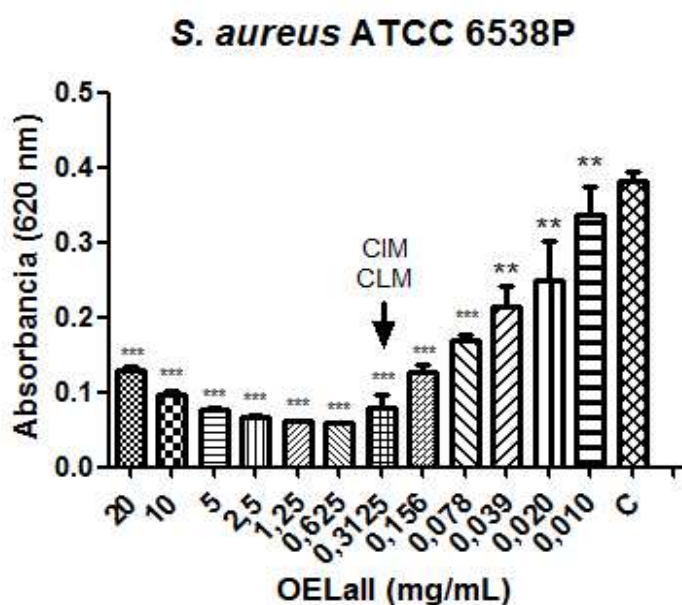
CIM e CLM em $\mu\text{g/mL}$, Nd: não determinada nas concentrações de ATM testadas.

AZI: azitromicina), CEF: ceftriaxona, CIP: ciprofloxacino VAN: vancomicina.

Fonte: O autor (2015)

O OELaII foi testado nas concentrações de 20 mg/mL a 0,01 mg/mL e os valores de CIM foram os mesmos para as cepas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 33591, sendo de 0,312mg/mL. Já para as cepas *S. aureus* ATCC 14458 e *S. aureus* CCBH 5330 os valores da CIM foram iguais, porém maiores, sendo de 0,625 mg/mL.

Com relação aos antibióticos testados, o menor e o maior valor de CIM encontrado foram de AZI, de 0,117 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O menor valor foi para *S. aureus* ATCC 6538P (OSSA) e o maior valor para *S. aureus* ATCC 33591 (ORSA).

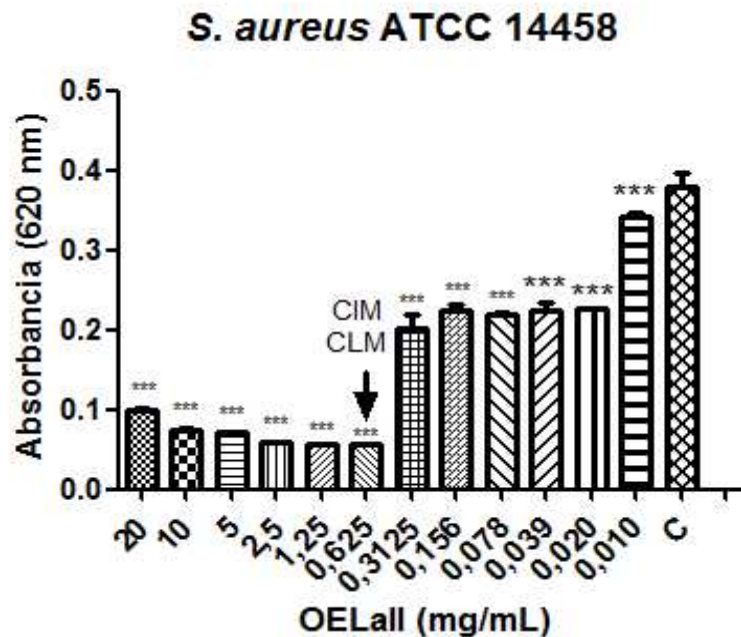
Figura 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do OELaII para cepa *S. aureus* ATCC 6538P (OSSA).

Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

Figura 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do OELaII para cepa *S.*

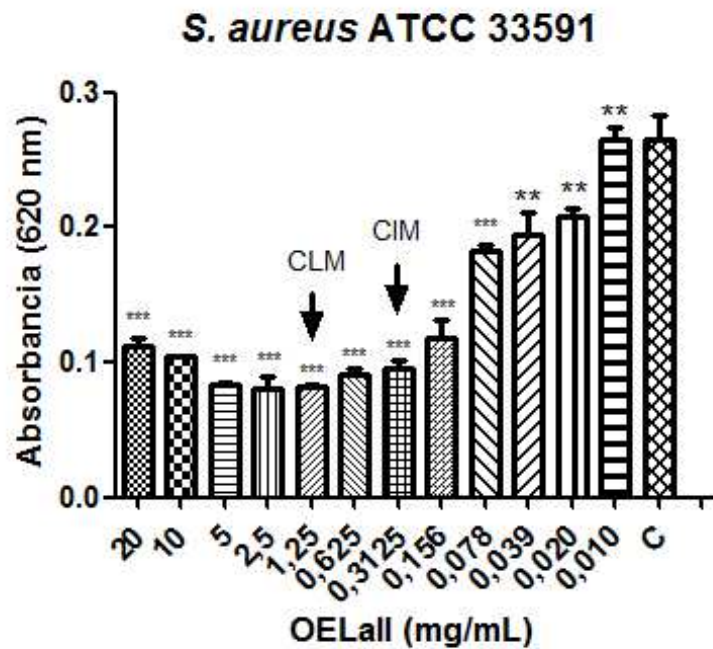
aureus ATCC 14458 (OSSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

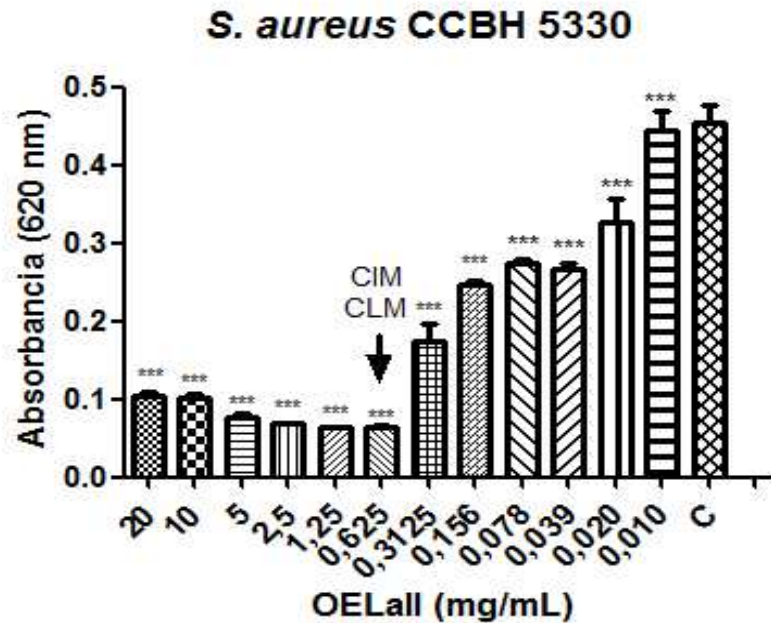
Figura 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do OELall para cepa *S. aureus* ATCC 33591 (ORSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

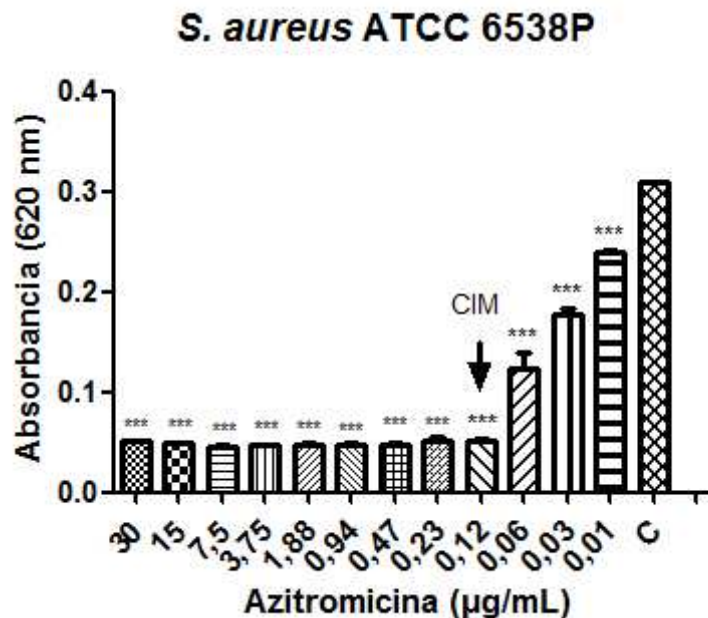
Figura 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do OELaII para cepa *S. aureus* CCBH 5330 (ORSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

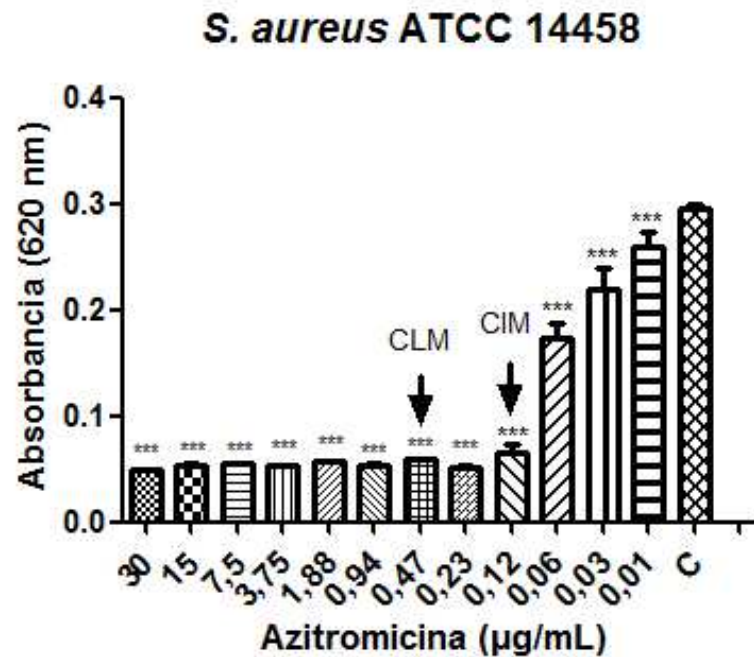
Figura 7 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Azitromicina para cepa *S. aureus* ATCC 6538P (OSSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

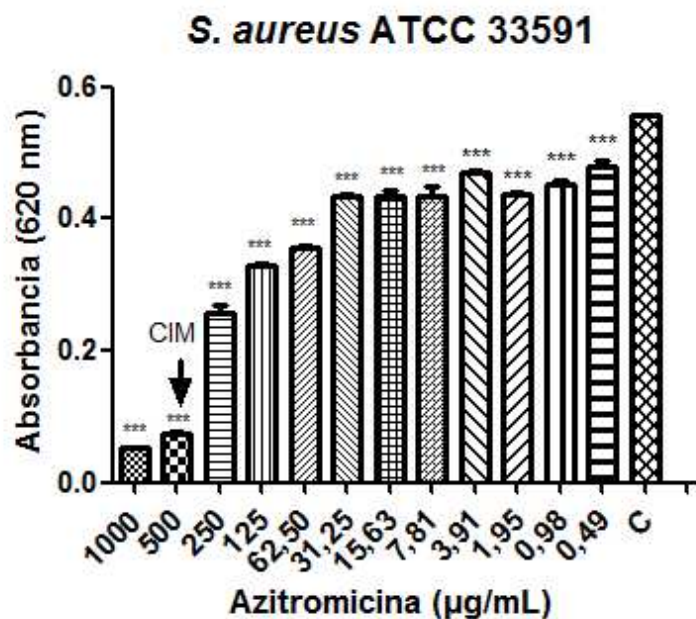
Figura 8 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Azitromicina para cepa *S. aureus* ATCC 14458 (OSSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

Figura 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Azitromicina para cepa *S. aureus* ATCC 33591 (ORSA).

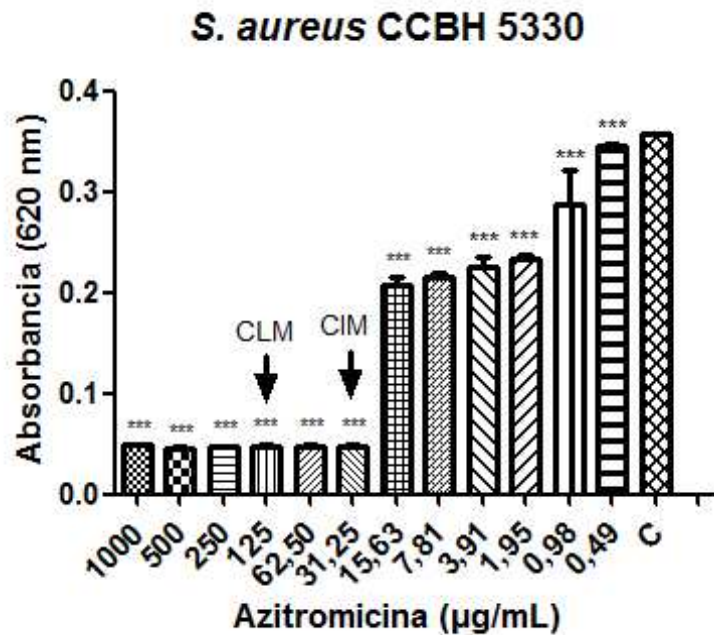


Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

Figura 10 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Azitromicina para

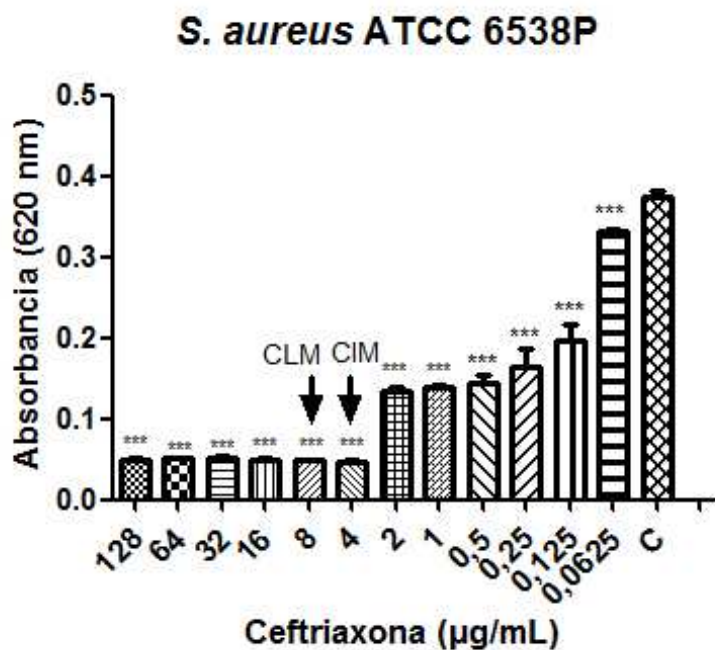
cepa *S. aureus* CCBH 5330 (ORSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

Figura 11 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Ceftriaxona para cepa *S. aureus* ATCC 6538P (OSSA).

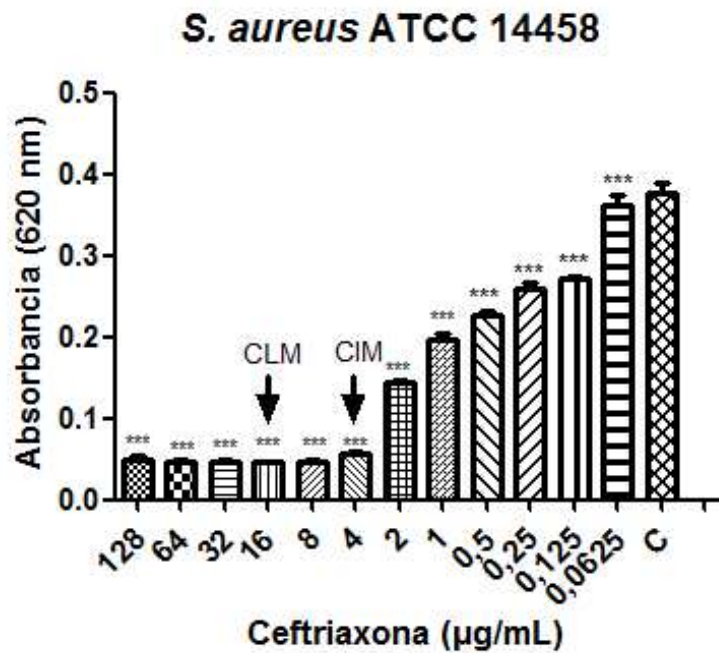


Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

Figura 12 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Ceftriaxona para

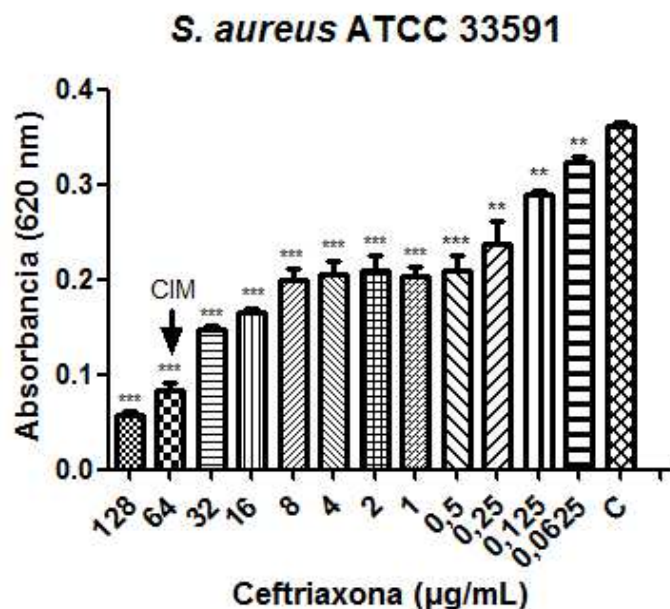
cepa *S. aureus* ATCC 14458 (OSSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

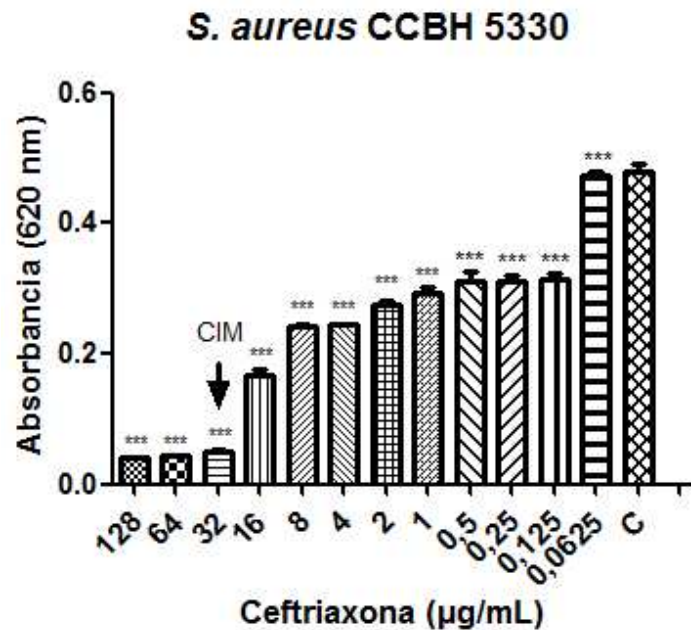
Figura 13 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Ceftriaxona para cepa *S. aureus* ATCC 33591 (ORSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

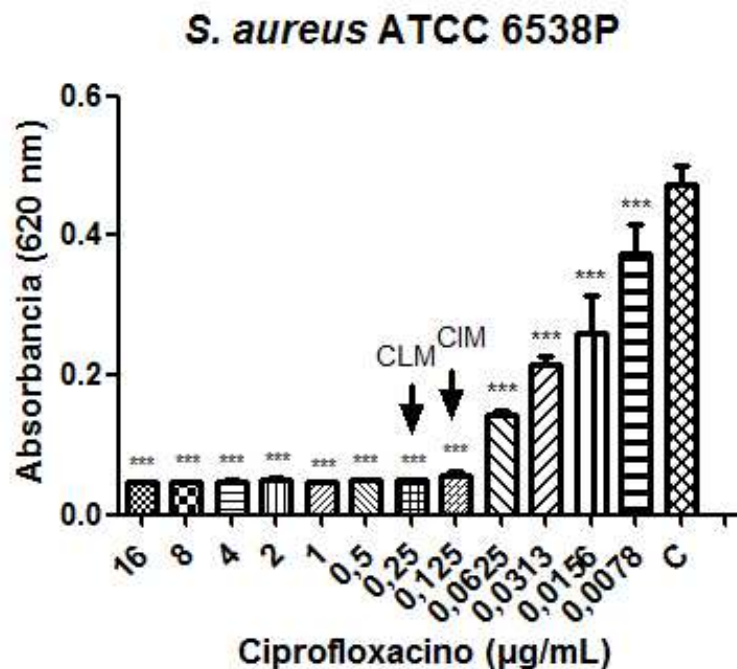
Figura 14 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Ceftriaxona para cepa *S. aureus* CCBH 5330 (ORSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média ± EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

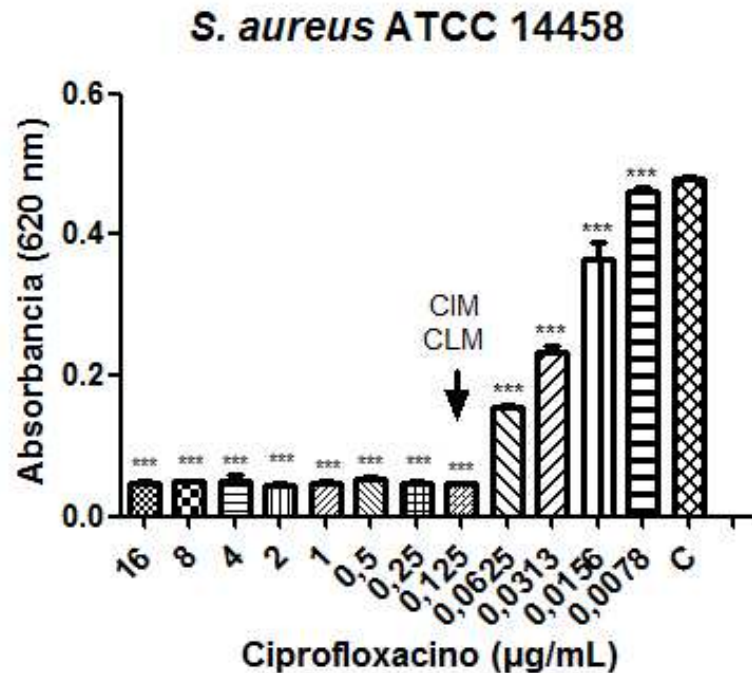
Figura 15 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do Ciprofloxacino para cepa *S. aureus* ATCC 6538P (OSSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média ± EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

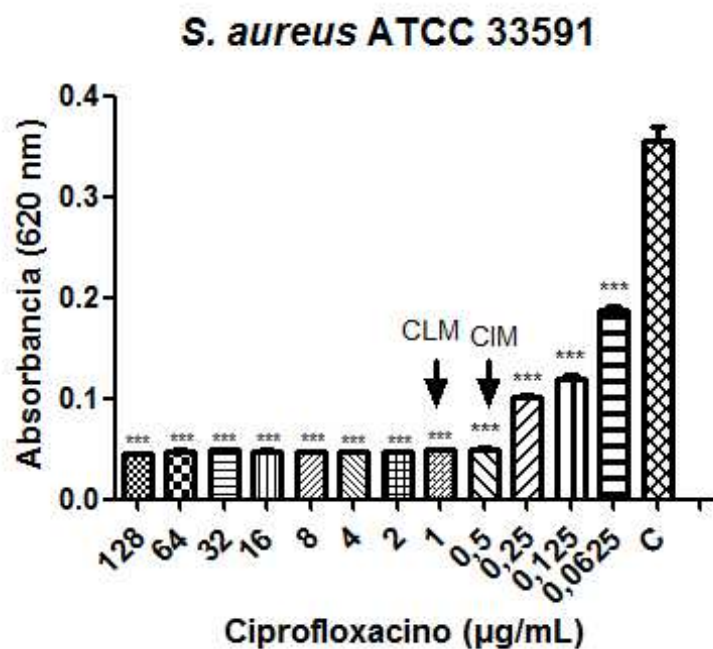
Figura 16 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do Ciprofloxacino para cepa *S. aureus* ATCC 14458 (OSSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

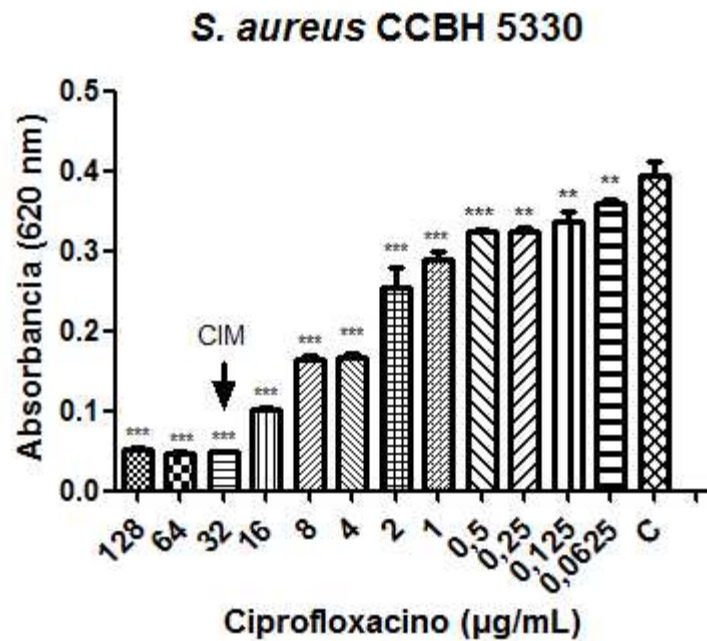
Figura 17 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do Ciprofloxacino para cepa *S. aureus* ATCC 33591 (ORSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

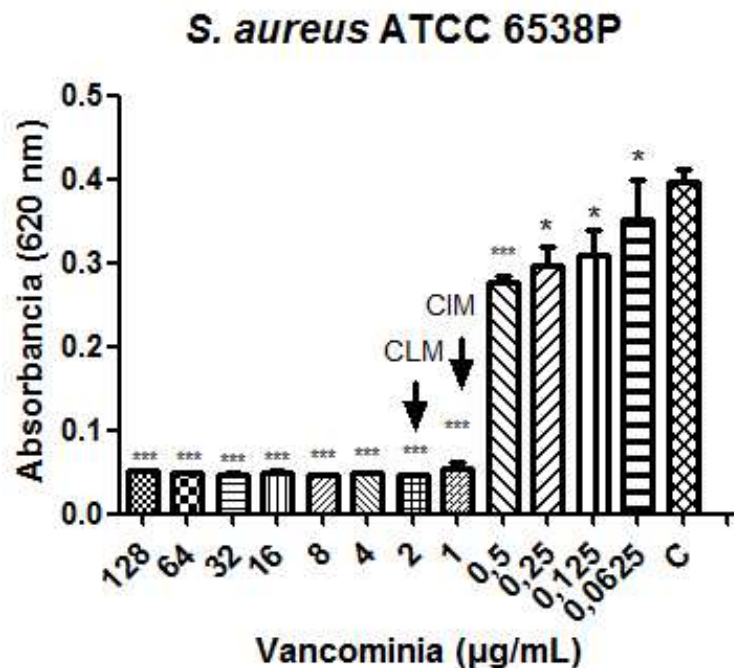
Figura 18 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Ciprofloxacino para cepa *S. aureus* CCBH 5330 (ORSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

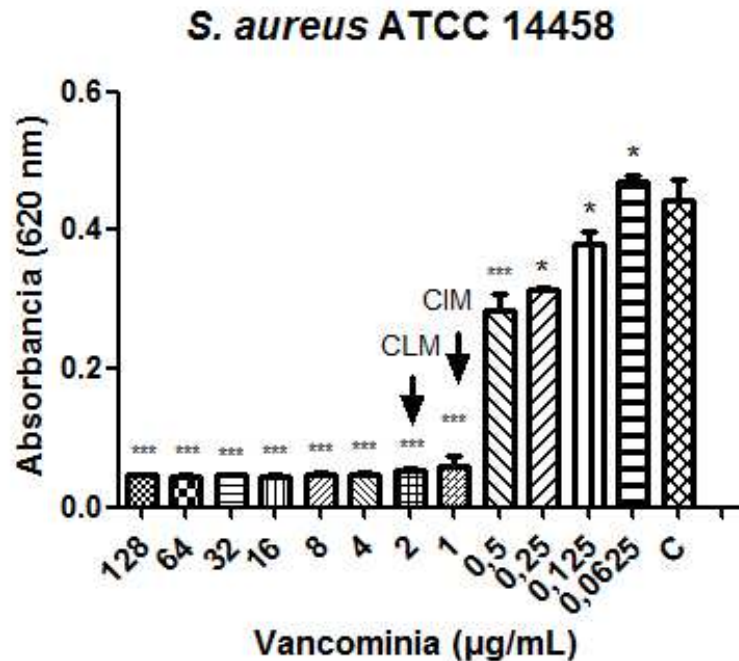
Figura 19 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Vancomicina para cepa *S. aureus* ATCC 6538P (OSSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

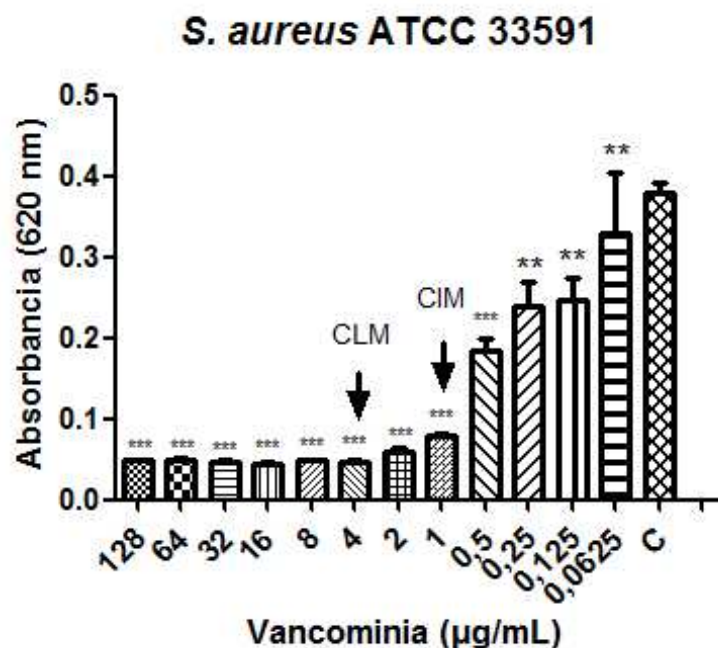
Figura 20 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Vancomicina para cepa *S. aureus* ATCC 14458 (OSSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

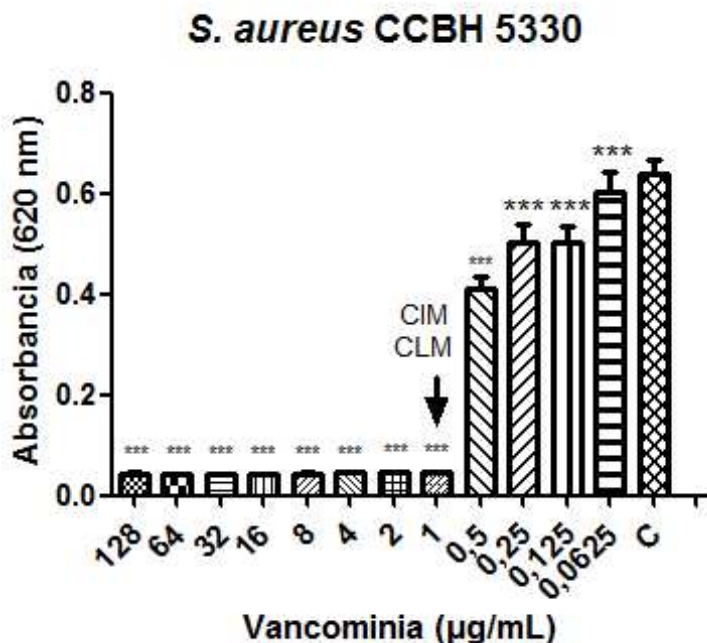
Figura 21 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Vancomicina para cepa *S. aureus* ATCC 33591 (ORSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

Figura 22 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) da Vancomicina para cepa *S. aureus* CCBH 5330 (ORSA).



Medida de densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620nm. Valores estão expressos pela média $\pm$ EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle (C).

Fonte: O autor (2015)

5.2 Efeito modulador do OELaII na atividade de antibióticos de uso clínico

O efeito modulador do OELaII na atividade dos ATM testados foi avaliado pelo Método de *Checkerboard* realizado em microplacas estéril de 96 poços. Para o cálculo dos valores de Concentração Inibitória Fracionada (CIF) e do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (IFIC) foram utilizados as menores concentrações de OELaII e dos ATM contidas nas associações capazes de inibir o crescimento visual das cepas testadas.

Os ATM testados pertencem a cinco classes: macrolídeo (Azitromicina), cefalosporinas (Ceftriaxona), quinolona (Ciprofloxacino) e glicopeptídeo (Vancomicina). Foram utilizadas diferentes concentrações de ATM e OELaII, em associação, para que fosse possível identificar se o OE modula sinergicamente, antagonicamente ou se seu efeito é indiferente quando utilizado em concentrações sub inibitórias. As Tabelas de 3 a 6 mostram os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM), CIF e do IFIC.

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração inibitória fracionada (CIF) de OELaII e AZI e índice CIF da associação OELaII + AZI

Cepas Microbianas	CIM OELaII		CIF OELaII	CIM AZI		CIF AZI	ICIF
	I	A		I	A		
<i>S.aureus</i> ATCC 6538P	0,312	0,020	0,064	0,10	0,10	1	1,064
<i>S.aureus</i> ATCC 14458	0,625	>0,625	>1	0,10	>0,10	>1	>2
<i>S.aureus</i> ATCC 33591	0,312	>0,312	>1	500	>500	>1	>2
<i>S.aureus</i> CCBH 5330	0,625	>0,625	>1	30	>30	>1	>2

I: CIM do OELaII ou CIM da AZI isolados; A: CIM do OELaII ou da AZI na associação; CIF_{OELaII} = CIM do OELaII na associação/CIM do OELaII isolado; CIF_{AZI} = CIM da AZI na associação/CIM da AZI isolada; Índice CIF = CIF_{OELaII} + CIF_{AZI}; ICIF ≤ 0,5: sinergismo; ICIF > 0,5 e < 1,0: aditivo ou indiferente; ICIF > 1,0: antagonismo (Eucast, 2003).

Fonte: O autor (2015)

Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração inibitória fracionada (CIF) de OELaII e CEF e índice CIF da associação OELaII + CEF.

Cepas Microbianas	CIM OELaII		CIF OELaII	CIM CEF		CIF CEF	ICIF
	I	A		I	A		
<i>S.aureus</i> ATCC 6538P	0,312	0,156	0,5	4	2	0,5	1
<i>S.aureus</i> ATCC 14458	0,625	0,039	0,062	4	4	1	1,062
<i>S.aureus</i> ATCC 33591	0,312	0,312	1	64	16	0,25	1,25
<i>S.aureus</i> CCBH 5330	0,625	0,039	0,062	32	32	1	1,062

I: CIM do OELaII ou CIM da CEF isolados; A: CIM do OELaII ou da CEF na associação; CIF_{OELaII} = CIM do OELaII na associação/CIM do OELaII isolado; CIF_{CEF} = CIM da CEF na associação/CIM da CEF isolada; Índice CIF = CIF_{OELaII} + CIF_{CEF}; ICIF ≤ 0,5: sinergismo; ICIF > 0,5 e < 1,0: aditivo ou indiferente; ICIF > 1,0: antagonismo (Eucast, 2003).

Fonte: O autor (2015)

Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração inibitória fracionada (CIF) de OELaII e CIP e índice CIF da associação OELaII + CIP.

Cepas Microbianas	CIM OELaII		CIF OELaII	CIM CIP		CIF CIP	ICIF
	I	A		I	A		
<i>S.aureus</i> ATCC 6538P	0,312	0,020	0,064	0,125	0,125	1	1,064
<i>S.aureus</i> ATCC 14458	0,625	0,039	0,062	0,125	0,063	0,504	0,566
<i>S.aureus</i> ATCC 33591	0,312	0,020	0,064	0,5	0,125	0,25	0,314
<i>S.aureus</i> CCBH 5330	0,625	0,020	0,032	32	8	0,25	0,282

I: CIM do OELaII ou CIM da CIP isolados; A: CIM do OELaII ou da CIP na associação; CIF_{OELaII} = CIM do OELaII na associação/CIM do OELaII isolado; CIF_{CIP} = CIM da CIP na associação/CIM da CIP isolada; Índice CIF = CIF_{OELaII} + CIF_{CIP}; ICIF ≤ 0,5: sinergismo; ICIF > 0,5 e < 1,0: aditivo ou indiferente; ICIF > 1,0: antagonismo (Eucast, 2003).

Fonte: O autor (2015)

Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração inibitória fracionada (CIF) de OELaII e VAN e índice CIF da associação OELaII + VAN

Cepas Microbianas	CIM OELaII		CIF OELaII	CIM VAN		CIF VAN	ICIF
	I	A		I	A		
<i>S.aureus</i> ATCC 6538P	0,312	0,020	0,064	1	0,063	0,063	0,127
<i>S.aureus</i> ATCC 14458	0,625	0,039	0,062	1	0,063	0,063	0,125
<i>S.aureus</i> ATCC 33591	0,312	0,020	0,064	1	0,063	0,063	0,127
<i>S.aureus</i> CCBH 5330	0,625	0,039	0,062	1	0,063	0,063	0,125

I: CIM do OELaII ou CIM da VAN isolados; A: CIM do OELaII ou da VAN na associação; CIF_{OELaII} = CIM do OELaII na associação/CIM do OELaII isolado; CIF_{VAN} = CIM da VAN na associação/CIM da CIP isolada; Índice CIF = $CIF_{OELaII} + CIF_{VAN}$; $ICIF \leq 0,5$: sinergismo; $ICIF > 0,5$ e $< 1,0$: aditivo ou indiferente; $ICIF > 1,0$: antagonismo (Eucast, 2003).

Fonte: O autor (2015)

Verificou-se que a associação do OELaII com VAN apresentou o melhor resultado com 100% das cepas testadas apresentando efeito sinérgico, mesmo em concentrações muito baixas de 1/16 da CIM do OE e da VAN. A associação do OE + CIP apresentou ser sinérgica para 50% das cepas testadas, sendo essas resistentes à oxacilina.

Já para a AZI e CEF os resultados não foram tão positivos, pois a associação da CEF com o OELaII foi antagonica para 75% e indiferente para 25% das cepas testadas, e a associação OE + AZI teve efeito antagonico para 100%.

6 DISCUSSÃO

O conhecimento do fenômeno da resistência a agentes físicos e químicos entre os microrganismos data do início da era microbiana. Com a introdução das primeiras substâncias químicas com finalidade quimioterápica específica, Ehrlich e seus colaboradores Franke e Roehl, em 1905, descobriram o fenômeno da resistência às drogas, ao observarem que em culturas de tripanossomas africanos tratados com arsênico ou com determinados corantes havia a sobrevivência de alguns exemplares da mesma população microbiana. Estes autores descreveram que infecções por tripanossomas tratadas com doses baixas de arsenicais recaíam e relataram que um novo tratamento falhava porque os tripanossomas haviam desenvolvido resistência às drogas e que esta resistência passava a ser hereditária (ALBERT, 1968; TAVARES, 2000).

Com o aumento do consumo de antibióticos pela sociedade os mesmos acabam por combater as bactérias mais sensíveis e selecionam as mais fortes, isso, leva ao aparecimento de bactérias super-resistentes, em que diversos antibióticos não possuem efeito terapêutico sobre esses microrganismos, portanto, é notável que o aumento da resistência bacteriana cresce na mesma intensidade que o aumento do consumo de antibiótico na sociedade. (WECKX, 2012).

É grande o impacto clínico e econômico decorrentes do uso abusivo, indiscriminado e irresponsável de antimicrobianos, seja na terapêutica ou profilaticamente, podendo levar à disseminação de microorganismos resistentes, levando a perda de sua eficácia ao longo do tempo, dificultando o tratamento e associando a uma maior morbidade (FERREIRA *et al.*, 2015)

Por serem temas de grande relevância, o uso indiscriminado de antimicrobianos e o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou na edição do Diário Oficial da União em maio de 2011 uma norma a fim de controlar a dispensação e comercialização dos antimicrobianos para que dessa forma seja promovido o uso racional desses medicamentos e assim tentar diminuir o aparecimento de novas cepas multiresistentes.

No presente trabalho foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do OELaII e dos ATM (azitromicina, ceftriaxona, ciprofloxacino e vancomicina). Utilizando os valores de CIM e CLM de OELaII e ATM, foram formuladas associações OELaII + ATM, em concentrações subinibitórias, para determinação do efeito modulador do OELaII sobre os ATM. Os valores de ICIF permitiram

determinar o tipo de modulação do OELaII na ação dos ATM testados sobre cepas OSSA (*S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458) e ORSA (*S. aureus* CCBH 5330 e *S. aureus* ATCC 33591): sinergismo, antagonismo ou indiferença

Staphylococcus aureus é um importante patógeno devido à sua virulência, resistência aos antimicrobianos e associação a várias doenças, incluindo enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas, infecções oportunistas e intoxicação alimentar (LOWRY, 1998). Em 1960, descobriu-se a meticilina e as cefalosporinas que não sofrem ação das betalactamases. Não tão distante, foram descritas cepas de *S. aureus* resistentes a tais fármacos, que se espalharam rapidamente nos ambientes hospitalares. A vancomicina, descoberta em 1956, começou a ser utilizada no tratamento de cepas resistentes a meticilina (MRSA) mostrando eficácia. Entretanto, também foram descritas cepas resistentes a este fármaco (VRSA) (SANTOS *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2007).

No que diz respeito à crescente importância dada a infecções bacterianas em comunidades hospitalares e para o desenvolvimento progressivo da resistência antimicrobiana, um grande número de estudos tem sido realizados com produtos naturais em busca de uma nova perspectiva no tratamento de infecções bacterianas. Muitas plantas foram avaliadas não apenas pela sua atividade antimicrobiana direta, mas também como um agente modificador de resistência (LUCENA *et al.*, 2015; GIBBONS, 2004).

Na busca de novas alternativas para tratamento de infecções por *S. aureus* resistentes e sensíveis a oxacilina, muitos produtos vegetais, entre eles os OE, são testados. Os valores de CIM de OELaII, obtidos nesse estudo, variaram de 0,312 a 0,625 mg/mL para as 4 cepas testadas, o que pode ser considerada uma boa atividade antimicrobiana.

Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode estar associada a compostos majoritários, compostos minoritários e a interação entre diversos compostos, fato que dificulta a dedução dos princípios ativos nesses metabólitos secundários vegetais (ROCHA, 2012; BELAICHE *et al.*, 1995; LACHOWICZ *et al.*, 1998). Por apresentarem-se como misturas complexas de compostos, que exercem seus mecanismos de ação através de vias distintas, os OE tornam muito difícil a adaptação microbiana, de forma que a seleção e emergência de cepas resistentes é improvável (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003).

Os óleos essenciais são capazes de exercer modular a atividade antibacteriana de diversos antibióticos, seja através de um efeito antagônico ou sinérgico. Assim, o uso concomitante de produtos vegetais e medicamentos convencionais merece um olhar muito cuidadoso, visto a possibilidade de ocorrer interferência ou servir como auxílio no tratamento de doenças de etiologia bacteriana (ROCHA, 2012).

O ensaio de *checkerboard* por microdiluição em placa é muito utilizado para testar as atividades de muitos compostos em combinação contra um agente infeccioso, que pode ser determinada pelo cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) das misturas testadas (ORHAN *et al.*, 2005).

No presente trabalho ao avaliar o efeito da interação do OELaII com os ATM testados, foi constatado ação sinérgica para a associação CIP + OELaII sobre as cepas ORSA, reduzindo 4x a CIM do CIP com IFIC de 0,282 e 0,314. Sobre a cepa padrão *S. aureus* ATCC 14458, observou-se efeito indiferente, IFIC 0,566, porém para a cepa *S. aureus* ATCC 6538P, houve antagonismo, IFIC 1,064. Além do CIP, para a combinação VAN + OELaII foi observado sinergismo, não só sobre as cepas ORSA, mas também sobre as cepas OSSA, reduzindo 16 vezes a CIM da VAN, IFIC variando de 0,125 a 0,175.

Sales (2014) estudando o efeito modulador do óleo essencial de *Hymenaea courbail* L. (OEHC), verificou nas associações do OEHC com a oxacilina (OXA) efeitos sinérgicos de (40,63%), indiferentes (50%) e antagônicas (9,73%) sobre as cepas OSSA testadas. Os valores de ICIF variaram de 0,122 a 0,75, indicando a ocorrência de uma redução de até 16 vezes nas CIM de OEHC e OXA para as cepas de *S. aureus* testadas.

Para a AZI, a combinação com o OELaII foi antagônica para todas as cepas testadas, IFIC variando de 1,064 a $>2,0$. Também houve antagonismo na associação do OELaII com a CEF, exceto para o *S. aureus* ATCC 6538P, em que foi observada indiferença, IFIC 1,0.

Estes resultados mostram o bom potencial antimicrobiano do OELaII sobre cepas de *S. aureus* resistentes e sensíveis à oxacilina, assim como seu ótimo efeito modulador da ação da vancomicina e do ciprofloxacino

No entanto, sua ação antagônica sobre a azitromicina e ceftriaxona ressalta a importância da orientação de profissional médico ou farmacêutico, para evitar ausência de resposta ao antimicrobiano ou ocorrência de efeitos adversos indesejáveis.

7 CONCLUSÃO

A boa atividade antimicrobiana do OELaII sobre *Staphylococcus aureus*, inclusive contra cepas resistentes a oxacilina e sua capacidade de modular positivamente a ação antimicrobiana da vancomicina e do ciprofloxacino tornam esse OE um agente promissor para o desenvolvimento de um antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, P.M.; MAGALHÃES, S.M.S.; ACÚRCIO, F.A.; SAKURAI, E. Avaliação da qualidade das prescrições de antimicrobianos dispensados em unidade públicas de saúde de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2002. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. 1, p. 95- 104, 2007.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass Spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ALBERT, A. **Selective toxicity**. 4th ed. London: Methuen, 1968.
- AMORIM, J. A. **Fitoterapia popular e saúde da comunidade**: diagnóstico para proposta de integração nos serviços de saúde em Campina Grande, Paraíba. 1999. p. 206. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci.**, v.8, n.5, p. 431-441, 2005.
- BARON, E. J.; PETERSON, I. R.; FINEGOLD, S. M. **Diagnostic microbiology**. 9th ed. St. Louis: Mosby, 1994.
- BHAVANANI, S.M.; BALLOW, C.H. New agents for Gram-positive bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 13, p. 528-534, 1992.
- BIASI, L. A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Cienc. Rural**, v.33, n.3, p. 455-459, 2003.
- BIZZO, H. R.; HVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quím. Nova**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BOLUFER, J.V.A.; MONTERO, C.T.; Estudio de la utilización de antibióticos de um hospital comarcal. Años 1998-2002. **Farm. Hosp.**, v. 28, n. 6, p. 410-418, 2004.
- BRAOIOS, A.; PEREIRA, A. C. S.; POLICARPO, O. F.; SOARES, N. C.; BARBOSA, A.S. Uso de antimicrobianos pela população da cidade de Jataí, GO, Brasil. **Ciênc. Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 10, p. 3055-3060, 2013.
- CARMO, E. S.; LIMA, E.O.; SOUZA, E. L. The potential of *origanum vulgare* l. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related aspergillus species. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 362-367, jun. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151783822008000200030&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 2 maio 2015.
- CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, N.S.M.; Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 5, n. 11, p. 26-32, 2007.
- CASTRO, N. E. A. **Caracterização e fitoquímica de óleos essenciais de eucalipto e seu efeito sobre o protozoário tripanosomatídeo Herpetomonas samuelpessoai**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006.

CHAMBERS, H.F.; HARTMAN, B.J.; TOMASZ, A. Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. **J. Clin. Invest.**, v. 76, 1985.

ÇİFTÇİ, E.; DOĞRU, Ü.; AYSEV, D.; İNCE, E.; GÜRİZ, H. Investigation of risk factors for nasopharyngeal colonization with penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* in Turkish children. **Pediatr. Int.**, v. 43, p. 385- 390, 2001.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antibiot. Lab. Med.**, v. 3, p. 739-787, 1991.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – approved standard**. Wayne, PA, 2005. (Document M100-S15. 15a Inform Suppl.).

CORREA JÚNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba: EMATER-PR, 1991.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.*, and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **J. Crop Protect.** v.22, p.39-44, 2003.

DUARTE, M.C.T. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil**. 2006. 16 f. Campinas: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas/ Universidade de Campinas, 2006.

EUCAST. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. **Clin. Microbiol. J.**, v. 9, n. 8, p. 1-7, 2003.

FERREIRA, T. A.; FERREIRA, F. D. Qualidade da prescrição de antimicrobianos comercializados na região noroeste do Paraná, Brasil. **Rev. Saúde e Biol.**, v.10, n.1, p.137-143, jan./abr. 2015.

FIJN, R.; CHOW, M.C.; SCHUUR, P.M.; DE JONG-VAN DEN BERG, L.T.; BROUWERS, J.R. Multicentre evaluation of prescribing concurrence with anti-infective guidelines: epidemiological assessment of indicators. **Pharmacoepidemiol. Drug Saf.**, v. 11, p. 361–372, 2002.

FORMOLO, F. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de distintos quimiotipos de *lippia alba*(mill).n.e.brown**. 2009. 64 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Federal de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, 2009.

GALLI, A.; FRANZETTI, L.; BRIGUGLIO, D. In vitro antimicrobial activity of essential oil and extracts of spices used in foods. **Industrie Alimentari**, v. 24, n. 277, p. 463-466, 1985.

GAMA, E.V.G.; GARRIDO, M.S.; SILVA, F.; SOARES, A.C.F.; MARQUES, C.T.S. Produção de biomassa de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Br.] sob adubação com composto de capim elefante inoculado e sem inoculação de actinomicetos. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 14, p. 163-168, 2012.

GEROMINI, K. V. N.; RORATTO, F. B.; FERREIRA, F. G.; POLIDO, P. P.; SOUZA, S. G. H.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar**, v. 15, n. 2, p. 127-131, jul./dez. 2012.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 21, p. 263-277, 2004.

GONÇALVES, L. A.; BARBOSA, L. C. A.; AZEVEDO, A. A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.6, p.8-14, jan. 2003.

HULIN, V.; MATHOT, A.G.; MAFART, P.; DUFOSSE, L. Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. **Sci. Aliments**, v. 18, p. 563-582, 1998.

LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L.; SANTOS, B.H.C. Propriedades Antibacterianas de Óleos Essenciais de Plantas Medicinais. **Rev. Bras. Ciênc. Saúde**, v. 7, n. 3, p. 251-258, 2003.

LOWY, F. D. Staphylococcus aureus infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

LUCENA, B.F.F.; TINTINO, S.R.; FIGUEREDO, F.G.; OLIVEIRA, C.D.M.; AGUIAR, J.J.S.; CARDOSO, E.N.; AQUINO, P.E.A.; ANDRADE, J.C.; COUTINHO, H.D.M.; MATIAS, E.F.F.; Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Acta Biol.Colomb.**, v. 20, n.1, p. 39-45, jan. 2015.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JUNIOR, A. óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v.3, n. 2, p. 105-127, jan. 2011

MACHADO NETTO, E. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v.5, n.11, p. 26-32, 2007.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA Jr, V.F. Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. **Quim. Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MARINHO, M.L.; ALVES, M. S.; RODRIGUES, M. L. C.; ROTONDANO, T. E. F.; VIDAL, I. F.; SILVA, W. W.; ATHAYDE, A. C. R. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.9, n.3, p.64-69, 2007

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. **J. Essent. Oil Res.**, v. 8, p. 695-698, 1996.

MOTA, L.M.; VILAR, F.C.; DIAS, L.B.A.; NUNES, T.F.; MORIGUTI, J.C. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, n. 2, 2010.

NASCIMENTO, G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Rev. Bras. Microbiol.**, v. 31, p. 48-53, 2000.

NEGRELLE, R.R.B.; TOMAZZONI, M. I.; CECCON, M. F.; VALENTE, T. P. Estudo etnobotânico junto a Unidade Saúde da Família Nossa Senhora dos Navegantes: subsídios para o estabelecimento de programa de fitoterápicos na Rede Básica de Saúde do Município de Cascavel (Paraná). **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.9, n.3, p.6-22, 2007

OBRELI NETO, P. R.; VIEIRA, J. C.; CUMAN, R. K. N. Impacto da atenção farmacêutica no uso racional de antimicrobianos em uma unidade básica de saúde no interior do Estado de São Paulo. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 33, n. 2, p. 159-164, 2011.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.16, n.1, p. 77-82, 2006.

ORHAN, G.; BAYRAM, A.; ZER, Y.; BALCI, I. Synergy Tests by e Test and *Checkerboard* Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 1, p. 140–143, Jan. 2005.

PACHECO, R. L. **Avaliação da disseminação de *Staphylococcus Aureus* resistente a oxacilina em serviço de dermatologia do hospital das clínicas.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PEREIRA, A. A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos.** 58 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006.

PHARMACIA BRASILEIRA: Professor Matos: a transcendência do gênero. Fortaleza: Conselho Federal de Farmácia, 2009.

PIRES, T. C. **Efeito inibitório de óleos essenciais de citros sobre o crescimento de microrganismos.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2007.

RAJKUMAR, S. JEBANESAN, A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **J. Asia-Pacific Entomol.**, v. 13, p. 107-109, 2010.

REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Rev. Esc. Enferm. USP**, v. 36, n. 3, p. 282-288, 2002.

RITTER, M. R.; SOBIERAJSKI, G.R.; SCHENKEL, E.P.; MENTZ, L.A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, Porto Alegre, v. 12, n. 2, p.51-62, jul./dez. 2002.

ROCHA, L. Q. **Interferência do óleo essencial de folhas do quimiotipo II de *Lippia alba* (MILL.) NE BROWN na atividade antimicrobiana da oxacilina sobre *staphylococcus aureus* oxacilina-resistente.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

RODRIGUES, F. D.; BERTOLDI, A. D. Perfil da utilização de antimicrobianos em um hospital privado. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 15, supl.1, p.1239-1247, 2010.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em suspensão.** Viçosa: UFV, 2008.

SALES, G. W. P. **Avaliação da atividade antimicrobiana e do mecanismo de ação do óleo essencial extraído das cascas de frutos da *Hymenaea courbail* L.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007.

SILVA JUNIOR, A.A. **Plantas medicinais.** Itajaí : Epagri, 1998.

SILVA, A. F.; BARBOSA, L. C. A.; SILVA, E. A. M.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.6, n. 1, p.1-7, 2003.

SIMÕES, C.A.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVIK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004. p. 467-495.

SIQUI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. **Biotechnol. Ciênc. Desenvolv.**, v. 16, p. 38-43, 2000.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med.**, v. 33, n.3, p. 281-301, 2000.

TEIXEIRA, A. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas do quimiotipos I, II e III de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

VALE, T.G.; MATOS, F.J.A.; LIMA, T.C.M.; VIANA, G.S.B. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown chemotypes. **J. Ethnopharmacol.**, v. 67, p. 127-133, 1999.

VAN BOECKEL, T.P.; GANDRA, S.; ASHOK, A.; CAUDRON, Q.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; LAXMINARAYAN, R. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. **Lancet Infect. Dis.**, v. 14, n. 8, p. 742 – 750, 2014.

VERAS, H. N.; CAMPOS, A. R.; RODRIGUES, F. F.; BOTELHO, M. A.; COUTINHO, H. D.; MENEZES, I. R.; DA COSTA, J. G. Enhancement of the antibiotic activity of erythromycin by volatile compounds of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown against *Staphylococcus aureus*. **Pharmacogn. Mag.**, v. 7, n. 28, p. 334-337, Oct./Dec. 2011.

WECKX, L. Antibióticos do uso ao abuso. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, v. 78, n. 2, mar./abr. 2012.

WHO. The World Medicines Situation. **Traditional medicines:** global situations, issues, and challenges. Geneva, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch18_TraditionalMed.pdf>. Acesso em: 13 May 2015.

ZÉTOLA, M.; LIMA, T.C.M.; SONAGLIO, D.; GONZÁLES-ORTEGA, G.; LIMBERGER, R. P.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian false melissa). **J. Ethnopharmacol.**, v. 82, p. 207-215, 2002.