



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Departamento de Química

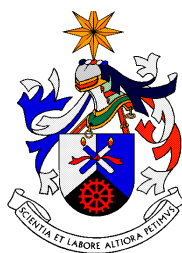
Estudo da actividade antibacteriana de diversos óleos essenciais

Tese de Mestrado (2ºCiclo)

Mestrado em Bioquímica

Cleide Vanessa Ferreira Rodrigues

2009/2010



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Departamento de Química

Estudo da actividade antibacteriana de diversos óleos essenciais

Elaborado por: Cleide Vanessa Ferreira Rodrigues

Tese apresentada na Universidade da Beira Interior para obtenção do grau de Mestre na área de Bioquímica, sob orientação do Prof. Dr. Pedro Miguel Mendonça Rocha e do Prof. Dr. Jesus M. Rodilla do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior.

2009/2010

*Aos meus Pais, Armando Monteiro
Rodrigues e Maria da Luz Ferreira
Rodrigues, que tudo fizeram para eu chegar
até aqui.*

Agradecimentos

A realização deste trabalho foi conseguida com a ajuda, companheirismo, generosidade e boa vontade de muitos, por isso não queria deixar passar a oportunidade de agradecer a todos os que de algum modo contribuíram para a sua concretização.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais, Armando e Maria da Luz, por tudo o que têm feito por mim e por tudo o que passaram para poder concluir mais uma etapa, porque sem eles isto não seria possível. Um muito obrigada por estarem sempre comigo, pelos pais que são e por me darem esta oportunidade de seguir mestrado.

Aos restantes membros da família, Irmãs e Irmão, Tios, Tias e Avós, incluindo o meu namorado José Luís Neves Ribeiro, por me acompanharem sempre e por me darem força para continuar e conseguir ser muito mais.

Ao Professor Doutor Pedro Rocha, por me ter dado sempre apoio e me ter cedido e criado um espaço no seu laboratório para eu realizar esta tese, e também pela sua sabedoria transmitida.

Ao Professor Doutor Jesus Rodilla, pela sua disponibilidade, simpatia, sabedoria, pelo apoio e ajuda no que necessitava e pela cedência de óleos essenciais e dados importantes para esta tese.

À Professora Lúcia Silva pela cedência dos óleos essenciais e dados importantes para esta tese.

Aos funcionários do laboratório Brito Rocha Lda por me terem prestado sempre apoio no que necessitava, pelos ensinamentos dados e pela simpatia e amizade prestada.

Aos meus amigos Andréa Silva, Ana Marques, Alexandre Gonçalves, Eunice Pombo, Estela Caldeira, Gerardo Osório, Joana Monteiro, Paulo Garcia, Sara Pinheiro e Sónia Almeida, por serem as pessoas que são e por me proporcionarem momentos inesquecíveis e sem duvida pelo apoio imenso que prestam e prestaram nos momentos mais difíceis e também naqueles de grande felicidade. Obrigada por existirem na minha vida.

Aos restantes amigos que me acompanharam ao longo da minha vida académica lhes agradeço pelos momentos bem passados juntos (Crazy Family e vizinhos e considerados vizinhos das residências, companheiros de casa e companheiros de grupo).

A todos o meu MUITO OBRIGADA

Resumo

Os conhecimentos acerca das plantas medicinais e da sua utilização têm vindo a ser acumuladas desde a antiguidade até aos nossos dias. Os óleos essenciais são misturas naturais muito complexas que podem conter cerca de 20-60 componentes em concentrações bastante diferentes e podem ser extraídos a partir das plantas aromáticas. Geralmente, os componentes principais dos óleos essenciais determinam as suas propriedades biológicas. Há algum tempo atrás, reconheceu-se que alguns óleos essenciais exibiam propriedades antimicrobianas. Actualmente, existem diversos métodos de *screening* para definir se o extracto de uma determinada planta possui actividade antimicrobiana. Os dois métodos mais utilizados são os de difusão em agar e de diluição em caldo. Então, o principal objectivo deste trabalho foi determinar a actividade antibacteriana dos óleos essenciais *Guaiaco wood* (e *Bulnesol*), *Schinus molle*, *Lavandula luisieri* (obtido das folhas e das flores), *Mentha cervina*, *Lippia alba* e *Thymus mastichina* contra *Escherichia coli*, *Salmonella spp* e *Staphylococcus aureus*, utilizando o método de difusão em agar com cavidades cilíndricas (poços) para a determinação dos halos de inibição, o método de macrodiluição para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB) e o teste em placa para a determinação do efeito de vapor. De acordo com os resultados obtidos, destacam-se as actividades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, dos óleos *Schinus molle*, *Lavandula luisieri* (folhas e flores) e *Lippia alba*, e contra as estirpes Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25923 e *Salmonella spp*) dos óleos *Thymus mastichina* e *Mentha cervina*.

Abstract

The knowledges about the medicinal plants and their use have been coming to be accumulated from the antiquity till our days. The essential oils are very complex natural mixtures that can contain nearly 20-60 components in quite different concentrations and can be extracted from aromatic plants. Generally, the main components of the essential oils determine his biological properties. Some time ago, some antimicrobial properties were identified in any essencial oils. In our days, there are several methods of *screening* to define if the extract of one particular plant has antimicrobial activity. The two most used methods are diffusion in agar and of dilution in broth. Then, the main goal of this work was: the determination of antibacterial activity of some essential oils, such as *Guaiac wood* (and *Bulnesol*), *Schinus molle*, *Lavandula luisieri* (obtained of the leaves and flowers), *Mentha cervina*, *Lippia alba* and *Thymus mastichina* against *Escherichia coli*, *Salmonella spp* and *Staphylococcus aureus*, using the method of diffusion in agar with cylindrical cavities (wells) for the determination of the haloes of inhibition; the method of macrodilution was used for the determination of the least inhibitory concentration (CMI), and least bactericidal concentration (CMB); finally the test in plate, for the determination of the effect of steam. In accordance with the obtained results, the antibacterial activities stand out against *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, of the oils *Schinus molle*, *Lavandula luisieri* (leaf out and flower) and *Lippia alba*, and against the Gram-negative stocks (*Escherichia coli* ATCC 25923 and *Salmonella spp*) of the oils *Thymus mastichina* and *Mentha cervina*.

Abreviaturas

- AT – Ausência de turvação (observação visual);
- ATCC – American Type Culture Collection;
- ATP – Trifosfato de Adenosina;
- ATR – Gene de tolerância ao ácido;
- C + – Controlo positivo;
- C - – Controlo negativo;
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (antes designado por NCCLS);
- CMB – Concentração Mínima Bactericida (mínimo de 0,1% de 5×10^5 UFC/ml $\leftrightarrow \leq 500$ UFC/ml);
- CMI – Concentração Mínima Inibitória (1º tubo a apresentar turvação);
- CP – Contagem em placa (UFC/ml). Método de espalhamento;
- Dil. – Diluição;
- DMSO – Dimetilsufóxido;
- EB – Extracto bruto;
- EU – União Europeia;
- FDA – Food and Drug Administration;
- FI – Forte Inibição, crescimento bacteriano visual apenas na periferia do meio de cultura;
- GC/MS – Cromatografia gasosa/espectrometria de massa;
- IPP – Difosfato de isopentenilo;
- LPS – Lipopolissacáridos;
- MEP – Fosfato do metileritritol;
- MHA – Muller-Hinton Agar (Ref. 784397 - OXOID LTD);
- MHB – Muller-Hinton Broth (Ref. 724245 - OXOID LTD);
- MH2 – Muller-Hinton agar, placa preparada (Ref. 43301; MH2 – BioMérieux SA);
- NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards;
- [Óleo] – Concentração do óleo;
- PMF – Proton Motive Force;
- PT – Presença de turvação (observação visual);
- SC – Sem crescimento visível na placa de Petri (grande inibição);
- Sol. – Solução;

T – Turvação nos tubos (observação visual);

t – Vestígios;

UFC – Unidade Formadora de Colónia.

Índice

1 – Introdução	1
1.1 – Uso corrente dos óleos essenciais	4
1.2 – Composição Química dos óleos essenciais.....	5
1.2.1 - Terpenos.....	6
1.2.1.1 – Monoterpenos	9
1.2.1.2 – Sesquiterpenos	10
1.2.2 – Componentes Aromáticos	11
1.3 – Actividade antimicrobiana	12
1.4 – Modo de acção antimicrobiana	14
1.4.1 – Carvacrol e Timol.....	15
1.4.2 – Eugenol.....	16
1.4.3 – p-Cimeno	17
1.4.4 – Carvona	17
1.4.5 – Cinamaldeído.....	17
1.4.6 – Terpineno.....	18
1.5 – Sinergismo entre os componentes dos óleos essenciais	19
1.6 – Métodos para avaliação da actividade antimicrobiana	20
1.6.1 – Métodos de difusão em agar	20
1.6.1.1 – Teste de difusão em disco	21
1.6.1.2 – Cilindros de aço inoxidável	21
1.6.1.3 – Perfuração em agar	21
1.6.2 – Método de diluição em caldo.....	22
1.6.2.1 – Macrodiluição	23
1.6.2.2 – Microdiluição	23
1.6.3 – Método do efeito do vapor do óleo essencial	24
1.7 – Factores que interferem nos métodos.....	25
1.7.1 – Meios de cultura	25

1.7.2 – pH:	26
1.7.3 – Disponibilidade de oxigénio.....	26
1.7.4 – Inóculo.....	26
1.7.5 – Condições de incubação	27
1.7.6 – Emulsionador e o óleo essencial utilizado.....	27
1.8 – Recursos utilizados para melhoria da leitura do diâmetro do halo no método de difusão em agar	30
1.9 – Microorganismos.....	31
1.9.1 – <i>Escherichia coli</i>	31
1.9.2 – <i>Salmonela</i>	33
1.9.3 – <i>Staphylococcus aureus</i>	34
1.10 – Susceptibilidade dos organismos Gram-positivos e Gram-negativos.....	35
1.11 – Óleos essenciais.....	36
1.11.1 – <i>Guaiaco wood</i> : Óleo de <i>Bulnesia sarmientoi</i> (Palo Santo)	36
1.11.2 – <i>Schinus Molle</i>	37
1.11.3 – <i>Lippia alba</i>	38
1.11.4 – <i>Lavandula luisieri</i>	40
1.11.5 – <i>Mentha cervina</i>	41
1.11.6 – <i>Thymus mastichina</i>	42
1.12 – Antibióticos antibacterianos.....	44
1.12.1 – Penicilina G	44
1.12.2 - Gentamicina	44
2 – Objectivo	46
3 – Material e Métodos.....	48
3.1 – Óleos essenciais.....	49
3.2 - Microorganismos	49
3.3 – Meios de cultura	50
3.4 – Preparação da densidade do inóculo	50

3.4.1 – Método de difusão em agar	50
3.4.2 – Método de Macrodiluição – Determinação da CMI e da CMB.....	51
3.5 – Avaliação da actividade antibacteriana	51
3.5.1 – Procedimento do método de difusão em agar pela técnica do poço	52
3.5.2 – Procedimento do método dos vapores	52
3.5.3 – Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB) pela técnica da macrodiluição em caldo	53
3.5.3.1 – Diluições consecutivas de 1:2 dos óleos essenciais de <i>Lavandula luisieri</i> (das folhas e das flores).....	53
3.5.3.2 – Diluições consecutivas de 1:2 dos óleos essenciais de <i>Thymus mastichina</i>	54
3.5.3.3 – Controlo positivo e do inóculo (tubo n°5)	54
3.5.3.4 – Controlo negativo (tubo n°6).....	55
3.5.4 – Ensaio realizados	55
3.6 – Análise estatística	56
4 – Resultados e Discussão.....	57
4.1 – Composição dos óleos essenciais	58
4.1.1 – Óleo de <i>Bulnesia sarmientoi</i>	58
4.1.2 – Óleo de <i>Schinus molle</i>	59
4.1.3 – Óleo de <i>Lippia alba</i>	60
4.1.4 – Óleo de <i>Lavandula luisieri</i>	62
4.1.5 – Óleo de <i>Mentha cervina</i>	63
4.1.6 – Óleo de <i>Thymus mastichina</i>	64
4.2 – Actividade antimicrobiana dos óleos essenciais	66
4.2.1 – Halos de inibição pelo método dos vapores	67
4.2.2 – Halos de inibição pela técnica dos poços	69
4.2.3 – CMI e CMB – Método de Macrodiluição	72
4.3 – Comparação entre os halos de inibição e a CMI e CMB.....	76
4.4 – Modo de acção bacteriana	78
4.5 – Projectos futuros	78

5 – Conclusão	80
6 – Bibliografia	85

Índice de Figuras

Figura 1 – Estruturas químicas de alguns componentes dos óleos essenciais.....	5/6
Figura 2 – Terpenos são sintetizados de unidades de cinco carbonos (isopreno)	6
Figura 3 – Via do ácido mevalónico para a produção do IPP, a unidade básica para a biossíntese de terpenos	7
Figura 4 – Via MEP para a produção do IPP, a unidade básica para a biossíntese de terpenos	7
Figura 5 – As principais subclasses de terpenos biossintetizados a partir de unidades de cinco carbonos.....	8
Figura 6 – Localizações e mecanismos na célula bacteriana dos sítios de acção dos componentes dos óleos essenciais	15
Figura 7 – <i>Escherichia coli</i> em forma de bacilo.....	31
Figura 8 – <i>Escherichia coli</i> com flagelos	32
Figura 9 – <i>Escherichia coli</i> com fímbrias	32
Figura 10 – <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Figura 11 – <i>Bulnesia sarmientoi</i>	36
Figura 12 – <i>Schinus molle</i>	37
Figura 13 – <i>Lippia alba</i>	38
Figura 14 – <i>Lavandula luisieri</i>	40
Figura 15 – <i>Mentha cervina</i>	41
Figura 16 – <i>Thymus Mastichina</i>	42
Figura 17 – Esquema de representação do ensaio das diluições consecutivas de 1:2 dos óleos essenciais da <i>Lavandula luisieri</i> , para a determinação da CMI e da CMB	54
Figura 18 – Esquema de representação do ensaio com o controlo positivo para a confirmação da concentração do inoculo	55
Figura 19 – Colector de destilação segundo a Farmacopeia Europeia. Destilador Clevenger	58

Figura 20 – Resultado do ensaio com o óleo essencial guaiaco + bulnesol contra o <i>Staphylococcus aureus</i> , pela técnica dos poços	66
Figura 21 – Resultado do ensaio com o óleo essencial de <i>Lippia alba</i> contra a <i>Salmonela spp</i> , pela técnica dos poços.....	66
Figura 22 – Resultado do ensaio com o óleo essencial de <i>Lavandula luisieri</i> dos extractos das flores contra <i>Staphylococcus aureus</i> , pelo método do vapor.....	67

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição do óleo essencial de <i>Bulnesia sarmientoi</i>	59
Tabela 2 – Composição do óleo essencial de <i>Schinus molle</i>	60
Tabela 3 – Composição do óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	61
Tabela 4 – Composição do óleo essencial de <i>Lavandula luisieri</i>	62
Tabela 5 – Composição do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i>	63
Tabela 6 – Composição do óleo essencial de <i>Thymus mastichina</i>	65
Tabela 7 – Halos de inibição da actividade antibacteriana do vapor dos óleos essenciais, <i>Schinus molle</i> , <i>Lippia alba</i> , <i>Lavandula luisieri</i> , <i>Mentha cervina</i> , <i>Thymus mastichina</i> e (<i>Guaiaco</i> + <i>Bulnesol</i>), contra os microrganismos testados, segundo o método dos vapores	68
Tabela 8 – Halos de inibição da actividade antibacteriana dos extractos dos óleos essenciais, dos controlos positivos e do controlo negativo contra os microrganismos testados, pelo método de difusão em agar	71
Tabela 9 – Resultados dos ensaios de macrodiluição com o óleo essencial <i>Lavandula luisieri</i> dos extractos de <u>folhas</u> . A vermelho indica a CMI.....	73
Tabela 10 – CMI e CMB reais e observadas, e concentrações correspondentes do óleo essencial de <i>Lavandula luisieri</i> do extracto das <u>flores</u> , conforme os resultados da tabela 9	73
Tabela 11 – Resultados dos ensaios de macrodiluição com o óleo essencial <i>Lavandula luisieri</i> dos extractos de <u>flores</u> . A vermelho indica a CMI.....	74
Tabela 12 – CMI e CMB reais e observadas, e concentrações correspondentes do óleo essencial de <i>Lavandula luisieri</i> do extracto das <u>flores</u> , conforme os resultados da tabela 11	74
Tabela 13 – Resultados dos ensaios de macrodiluição com o óleo essencial <i>Thymus mastichina</i> . A vermelho indica a CMI.	75
Tabela 14 – CMI e CMB reais e observadas, e concentrações correspondentes do óleo essencial de <i>Thymus mastichina</i> , conforme os resultados da tabela 13	75

Tabela 15 – Comparação dos halos de inibição obtidos pela técnica de difusão em agar com as CMI e CMB, do óleo essencial <i>Lavandula luisieri</i> do extracto das <u>folhas</u>	76
Tabela 16 – Comparação dos halos de inibição obtidos pela técnica de difusão em agar com as CMI e CMB, do óleo essencial <i>Lavandula luisieri</i> do extracto das <u>flores</u>	76
Tabela 17 – Comparação dos halos de inibição obtidos pela técnica de difusão em agar com as CMI e CMB, do óleo essencial <i>Thymus mastichina</i>	76
Tabela 18 – Resumo dos ensaios efectuados	77

1 – INTRODUÇÃO

Os conhecimentos acerca das plantas medicinais e da sua utilização têm vindo a ser acumuladas desde a antiguidade até aos nossos dias. No entanto, só nos últimos duzentos anos, o desenvolvimento da Química permitiu aos cientistas produzir extractos padronizados de plantas e isolar os seus princípios activos. Novas pesquisas e experiências farmacológicas têm vindo a confirmar a utilização empírica das plantas e potenciais novos usos terapêuticos, tendo as plantas medicinais conquistado o reconhecimento científico, e daqui resultando no desenvolvimento de novos fármacos através da investigação de produtos naturais [Madureira, 2009].

Os óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos que podem ser sintetizados através de todos os órgãos da planta, isto é, flores, folhas, frutos, sementes, botões, rebentos, raízes, madeira ou cortiça, e são fornecidos em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou glandulares [Bakkali *et al*, 2008; Burt, 2004]. São caracterizados por serem moléculas de pequeno peso molecular, muitos são voláteis, naturais, líquidos, complexos, de odor forte, lípidos e raramente colorados, produzidos por plantas aromáticas como metabolitos secundários, lipossolúveis e solúvel em solventes orgânicos com uma densidade geralmente mais baixa do que a da água [Bakkali *et al*, 2008]. Há muito tempo reconheceu-se que alguns óleos essenciais exibiam propriedades antimicrobianas. Além das propriedades antibacterianas, os óleos essenciais ou os seus componentes demonstraram exibir propriedades antivirais, antimicótica, antitoxigénica, antiparasita, antifúngica e insecticida [Burt, 2004].

Os óleos essenciais são extraídos a partir das plantas aromáticas geralmente localizadas em países de temperados a quentes, como o Mediterrâneo, e países tropicais onde eles representam uma parte importante na farmacopeia tradicional [Bakkali *et al*, 2008]. Os maiores produtores de óleos essenciais são países em desenvolvimento e emergentes como: Brasil, China, Egipto, Índia, México, Guatemala, Indonésia..., enquanto os maiores consumidores são os países industrializados (USA, Europa ocidental e Japão). A comercialização dos óleos essenciais pode estar centrada em torno da sua bioactividade, e neste contexto a descoberta de novos usos e aplicações dos óleos essenciais dirigirá além disso o processo de pesquisa e desenvolvimento [Korock *et al*, 2007].

Existem vários métodos para extrair os óleos essenciais, mas o método de destilação a vapor é o mais frequentemente usado na produção comercial de óleos essenciais [Bakkali *et al*, 2008; Burt *et al*, 2004]. O perfil químico dos produtos dos óleos essenciais difere não só no número de moléculas, mas também nos tipos

estereoquímicos das moléculas extraídas, e o tipo de extracção que é escolhido de acordo com o objectivo de uso. Ou seja, o produto de extracção pode variar na qualidade, na quantidade e na composição de acordo com o clima, composição do solo, o órgão da planta, a idade e a etapa de ciclo vegetativo. Assim, para obter óleos essenciais de composição constante, eles têm de ser extraídos nas mesmas condições a partir do mesmo órgão da planta que cresceu no mesmo solo, sob o mesmo clima e escolhido na mesma estação. Muitos dos óleos essenciais comercializados são caracterizados quimicamente por cromatografia gasosa, analisados e identificados por espectrometria de massa ou então por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC/MS) [Bakkali *et al*, 2008; Fan *et al*, 2009]. Monografias analíticas têm sido publicadas para assegurar uma boa qualidade dos óleos essenciais [Bakkali *et al*, 2008].

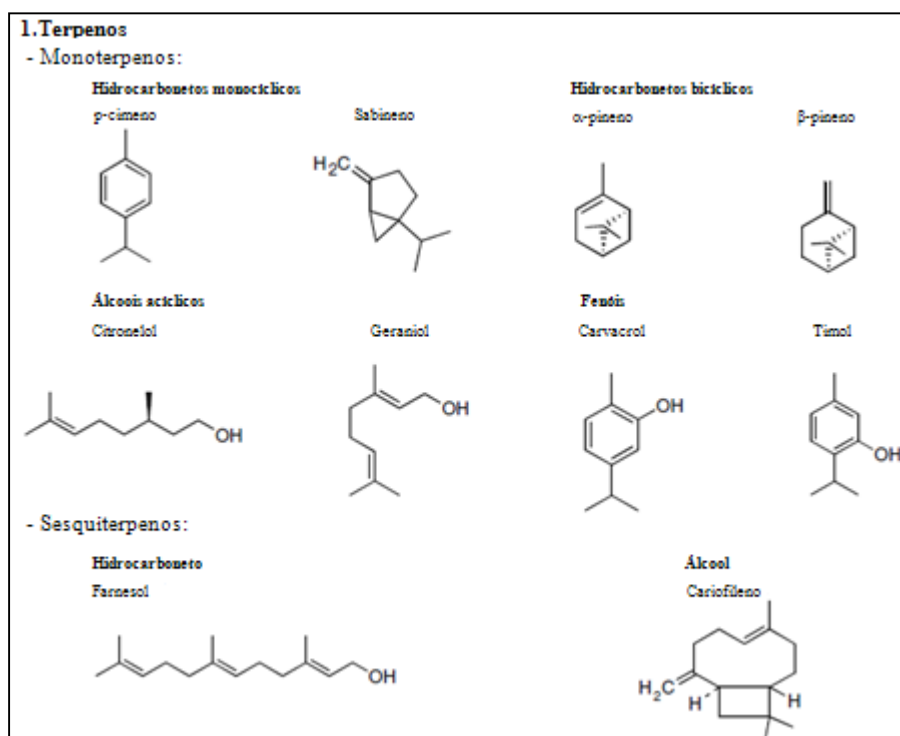
1.1. Uso corrente dos óleos essenciais:

Os óleos essenciais são usados devido às suas propriedades antibacterianas, antivirais, antimicótica, antitoxigénica, antiparásita, antifúngica e insecticida, pelas suas fragrâncias e aromas, e também como analgésico, sedativo, anti-inflamatório, espasmolítico e medicamentos analgésicos locais [Bakkali *et al*, 2008]. O principal uso dos óleos essenciais na União Europeia (UE) é na comida, como aromas, perfumes (fragrâncias e aftershaves) e nos produtos farmacêuticos pelas suas propriedades funcionais [Burt, 2004].

Até agora, aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, 300 dos quais são comercialmente importantes especialmente para a indústria farmacêutica, agronomia, de alimentos, sanitária, cosmética e indústria de perfumes. Os óleos essenciais ou alguns dos seus componentes são usados em perfumes e produtos de maquilhagem, em produtos sanitários, na odontologia, na agricultura, como conservantes e aditivos alimentares, e como medicamentos naturais. Além disso, os óleos essenciais são usados nas massagens como misturas com óleo vegetal ou em banhos, mas mais frequentemente na aromaterapia. Alguns óleos essenciais parecem expor propriedades medicinais particulares que têm sido requeridas para cura de uma ou outra disfunção de órgãos ou desordem sistémica. Na natureza, os óleos essenciais desenvolvem um papel importante na protecção das plantas contra as bactérias, vírus, fungos, insectos e também contra os animais herbívoros reduzindo o seu apetite para tais plantas. Eles também podem atrair alguns insectos para favorecer a dispersão de pólenes e sementes, ou repelir outros parasitas indesejáveis [Bakkali *et al*, 2008].

1.2. Composição Química dos óleos essenciais:

Os óleos essenciais são misturas naturais muito complexas que pode conter cerca de 20-60 componentes em concentrações bastante diferentes. Eles são caracterizados por dois ou três componentes principais em concentrações elevadas regularmente (20-70%) comparado com os outros componentes presentes em quantidades vestígias. Geralmente, estes componentes principais determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais. Os componentes dos óleos essenciais incluem dois grupos de origem sintética distinta. O grupo principal é composto dos terpenoides, os quais podem ser hidrocarbonetos alifáticos ou aromáticos, lineares ou cíclicos com diferentes grupos funcionais, todos caracterizados por peso molecular baixo (Figura 1) [Bakkali *et al*, 2008].



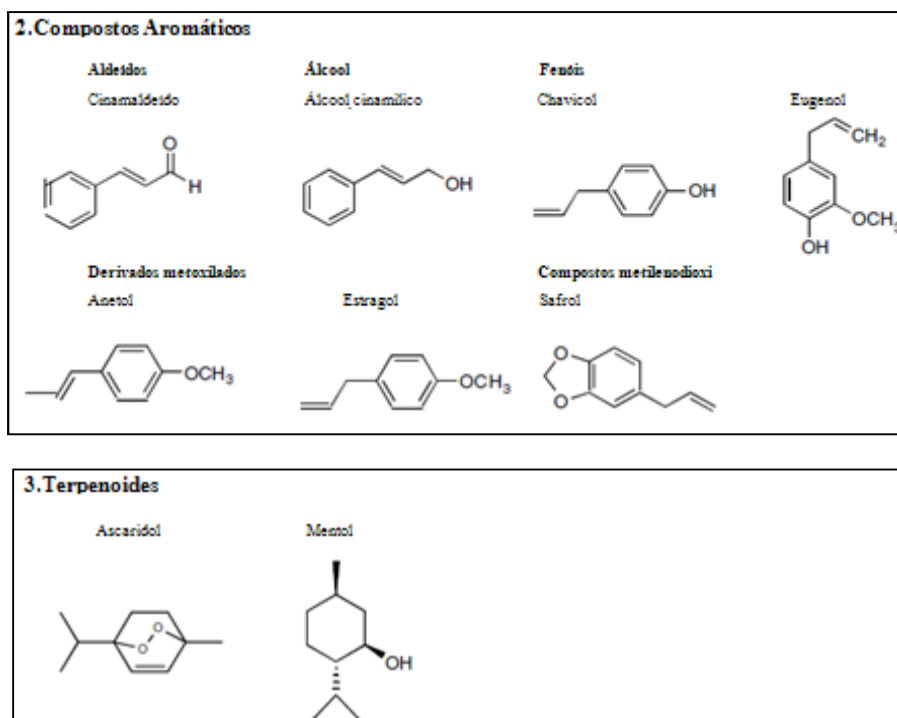


Figura 1 – Estruturas químicas de alguns componentes dos óleos essenciais [Adaptado de Bakkali *et al*, 2008].

1.2.1. Terpenos:

Os terpenos formam estruturalmente e funcionalmente diferentes classes. Eles são produzidos a partir da combinação de unidades base de cadeias de 5 carbonos denominadas de isopreno (figura 2).

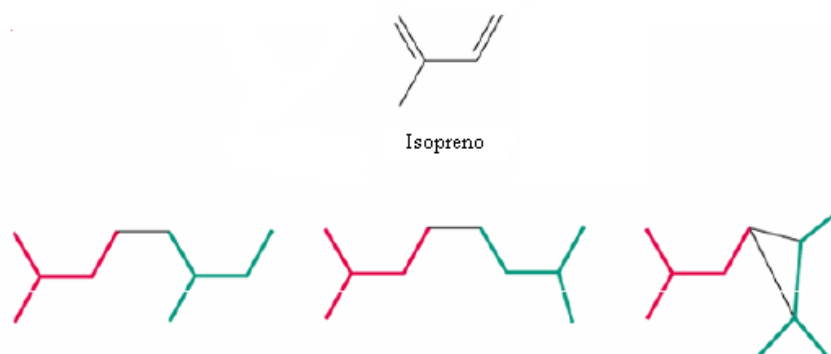


Figura 2 – Terpenos são sintetizados de unidades de cinco carbonos (isopreno). Acima, a estrutura do isopreno. Abaixo, os diferentes padrões de montagem de unidades de isopreno produzem uma variedade de estruturas¹.

A adição repetitiva de IPP forma os diferentes precursores, difosfato de prenilo, produz as várias classes de terpenos, a modificação do difosfato de prenilo pelas sintetases específicas do terpenos forma o esqueleto de terpeno e finalmente, a modificação enzimática secundária (reações redox) do esqueleto, atribui propriedades funcionais aos diferentes terpenos. Os principais terpenos são os monoterpênicos (C₁₀) e os sesquiterpenos (C₁₅), mas os outros derivados como: os hemiterpenos (C₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀) e politerpenos também existem (Figura 5) [Bakkali *et al*, 2008]. Os terpenos apresentam várias bioactividades, sendo activos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. O seu mecanismo de acção contra os mesmos ainda não está totalmente compreendido, mas pensa-se que está envolvido com a ruptura da membrana pelos componentes lipofílicos [Cowan, 1999].

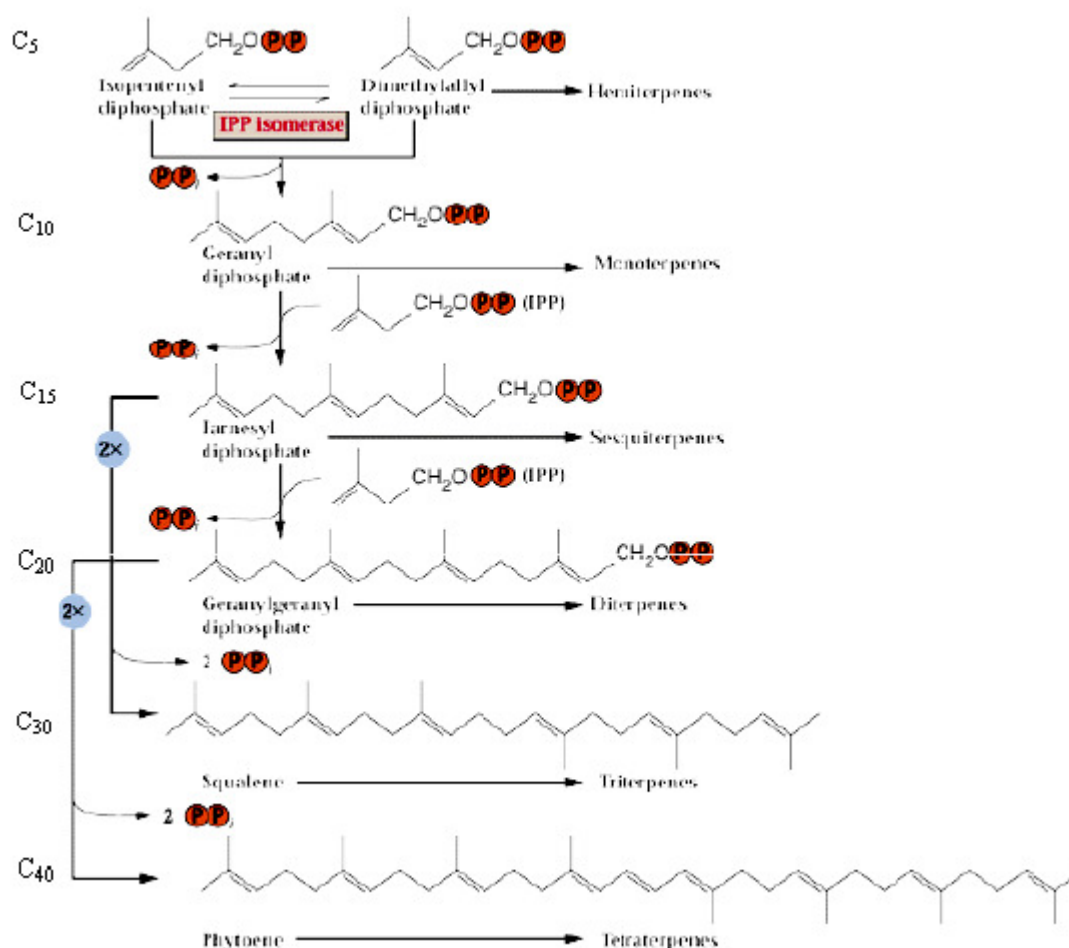


Figura 5 – As principais subclasses de terpenos biossintetizados a partir de unidades de cinco carbonos¹.

Um terpeno que contém oxigênio é denominado de terpenoide [Bakkali *et al*, 2008]. Os terpenoides são sintetizados a partir de unidades de acetato, e como tal, eles compartilham as suas origens com ácidos gordos. Estes diferenciam-se dos ácidos gordos por terem uma extensa ramificação e são ciclizados. Os terpenoides são também activos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários [Cowan, 1999]. Estes como são agentes lipofílicos conseqüentemente perturbam a integridade e permeabilidade da membrana. A perda de iões K^+ é usualmente indício de dano e é muitas vezes seguida pelo efluxo dos constituintes citoplasmáticos [Korock *et al*, 2007].

1.2.1.1. Monoterpenos:

Os monoterpenos formados a partir do acoplamento de duas unidades de isopreno (C₁₀). Estes compostos são as moléculas mais representativas constituindo 90% do óleo essencial e permite uma boa variedade de estruturas. Estes derivados podem apresentar diferentes grupos funcionais:

- Hidrocarbonetos:
 - *acíclicos*: mirceno, ocimeno, etc.;
 - *monocíclicos*: terpinenos, p-cimeno, felandrenos, etc.;
 - *bicíclicos*: pinenos, δ -3-careno, canfeno, sabineno, etc.

- Álcoois:
 - *acíclicos*: geraniol, linalol, citronelol, lavandulol, nerol, etc.;
 - *monocíclicos*: mentol, α -terpineol, carveol;
 - *bicíclicos*: borneol, fenchol, chrysanthenol, tuian-3-ol, etc.

- Aldeídos:
 - *acíclicos*: geranial, neral, citronelal, etc.

- Cetona:
 - *acíclicos*: tagetone, etc.;
 - *monocíclicos*: mentonas, carvona, pulegona, piperitona, etc.;

- *bicíclicos*: canfora, fenchona, tujona, ombelulona, pinocamphona, pinocarvona, etc.

- Ésteres:
 - *acíclicos*: acetato de linalilo ou propionato, acetato de citronelilo, etc.;
 - *monocíclicos*: acetatos de mentilo ou α -terpinilo, etc.;
 - *bicíclicos*: acetato de isobornilo, etc.
- Éteres: 1,8-cineole, mentofurano, etc.
- Peróxidos: ascaridole, etc.
- Fenóis: timol, carvacrol, etc.

Quando a molécula é opticamente activa, os dois enantiómeros podem estar muitas vezes presentes nas plantas. Não é frequente encontrar a forma racémica mais sim o enantiómero activo [Bakkali *et al*, 2008].

1.2.1.2. Sesquiterpenos

Os sesquiterpenos são formados a partir da união de três unidades de isoprenos (C15). A extensão da cadeia aumenta o número de ciclizações possíveis que permite uma maior variedade de estruturas. A estrutura e função dos sesquiterpenos são similares àqueles dos monoterpenos:

- Hidrocarbonetos: azuleno, β -bisaboleno, cadinenos, β -cariofilleno, logifoleno, curcumenos, elemenos, farnesenos, zingibereno, etc.
- Álcoois: bisabol, cedrol, β -nerolidol, farnesol, carotol, β -santalol, patchoulol, viridiflorol, etc.
- Cetonas: germacrona, nootkatona, cis-longipinan-2,7-diona, β -vetinona, turmeronas, etc.

- Epóxidos: oxido de cariofilleno, epoxi-humuleno, etc [Bakkali *et al*, 2008].

1.2.2. Componentes Aromáticos:

São formados a partir do fenilpropano, e ocorrem com menos frequência que os terpenos não aromáticos. A via de biossíntese relativa aos terpenos e derivados fenilpropanicos geralmente são separados nas plantas, mas pode coexistir em algumas. Os componentes aromáticos compreendem:

- Aldeídos: cinamaldeído;
- Álcool: álcool cinâmico;
- Fenóis: chavicol, eugenol;
- Derivados metoxilados: anethole, elemicine, estragole, metileugenoles;
- Componentes metilenodioxí: apiole, miristicine, safrole [Bakkali *et al*, 2008].

1.3. Actividade antimicrobiana:

Nos últimos anos, houve um crescente interesse nos componentes biologicamente activos, isolados a partir de espécies de plantas para a eliminação de microrganismos patogénicos, dada à resistência que estes têm apresentado relativamente a antibióticos ou porque eles são compostos mais seguros ecologicamente [Korock *et al*, 2007].

A fonte botânica, a proveniência da planta, o tempo de colheita ou a fase de desenvolvimento, técnica de extracção, o material da planta ser fresco ou seco, microrganismo(s) em teste e a metodologia dos ensaios microbiológicos são factores que influenciam a actividade antimicrobiana dos óleos essenciais e seus componentes [Faleiro *et al*, 2003].

Uma grande variedade de óleos essenciais são conhecidos por possuir propriedades antimicrobianas e em muitos casos, esta actividade é devido à presença de constituintes activos, principalmente atribuído aos terpenos tais como os monoterpenos, sesquiterpenos e álcoois relacionados e outros hidrocarbonetos e fenóis [Korock *et al*, 2007].

O carácter lipofílico do seu esqueleto hidrocarbonado e o carácter hidrofílico dos seus grupos funcionais são os factores de maior importância na acção antimicrobiana dos componentes dos óleos essenciais. Por isso, uma categoria das actividades tem sido proposto como se segue: fenóis > aldeídos > cetonas > álcoois > esteres > hidrocarbonetos [Korock *et al*, 2007].

Alguns óleos essenciais contêm estruturas fenólicas, tais como o carvacrol e o timol (Figura 1), são altamente activos contra um largo espectro de microrganismos. A importância do grupo hidroxilo tem sido confirmada e a posição relativa do grupo hidroxilo no anel fenólico não parece influenciar fortemente o grau de actividade antimicrobiana. Contudo, tem sido demonstrado que o carvacrol é mais activo que o timol. Além disso, a significância do anel aromático tem sido demonstrado pela falta de actividade do mentol (figura 1). A baixa actividade foi demonstrada em componentes contendo somente um anel aromático com substituintes alquilos. Contudo, um grupo aldeído com uma ligação dupla conjugada e uma cadeia hidrocarbonada longa ligada a um anel aromático pode resultar numa melhor actividade antibacteriana [Burt, 2004;

Korock *et al*, 2007]. Por exemplo, o cinamaldeído apresenta um forte efeito de inibição no crescimento de vários géneros de bactérias e de fungos [Korock *et al*, 2007].

Os óleos essenciais ricos em 1,8-cineole demonstraram ser activos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo a *Listeria monocytogenes*, contra a levedura *Candida albicans* e contra espécies de fungos fitopatogénicos [Korock *et al*, 2007].

O citral desenvolve uma actividade moderada. As cetonas, tais como a pulegona, fenchona, α -tujona e camfor revelam ter actividades antimicrobianas [Korock *et al*, 2007].

Monoterpenos oxigenados tais como o mentol, foram descritos por possuir uma actividade de forte a moderada contra muitas bactérias. Considerou-se que a posição do grupo funcional do álcool afecta as propriedades moleculares dos componentes, tais como a capacidade de ligações de hidrogénio [Korock *et al*, 2007].

Os monoterpenos hidrocarbonados, tais como o limoneno, o terpineno e o sabineno têm mostrado propriedades antimicrobianas, mas também parece terem actividade antibacteriana forte a moderada contra bactérias gram-positivas e contra fungos patogénicos, mas no geral a actividade mais débil tem sido observada contra as bactérias gram-negativas [Korock *et al*, 2007].

De maneira semelhante, os óleos essenciais que são caracterizados por um elevado conteúdo de sesquiterpenos exibem actividade antifúngica e antibacteriana. A actividade antimicrobiana de certos óleos parece ser determinada pela concentração de constituintes individuais de sulfuretos. Sulfuretos com um único átomo de enxofre não são activos, e sulfuretos com três ou quatro átomos de enxofre são altamente inibitórios contra o crescimento de *Candida utilis* e *Staphylococcus aureus* [Korock *et al*, 2007].

Usualmente, os componentes principais são sobretudo os responsáveis pela actividade antibacteriana em muitos dos óleos essenciais. Contudo, os óleos essenciais no seu integral tem uma maior actividade antibacteriana do que a combinação dos componentes principais isolados, indicando que alguns componentes secundários são essenciais para a actividade, provavelmente pela produção de um efeito sinérgico. Por outro lado, o antagonismo também foi observado, em que a actividade de diferentes componentes combinados é menor do que os componentes individuais [Korock *et al*, 2007].

1.4. Modo de acção antibacteriana:

Apesar das propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais e dos seus componentes terem sido revistos no passado, o seu mecanismo de acção não foi estudado em grande detalhe. Considerando um grande número de diferentes grupos de componentes químicos presentes nos óleos essenciais, é muito mais provável que a sua actividade antibacteriana não seja atribuída a um só mecanismo específico mas que existem vários alvos na célula. As localizações ou os mecanismos de acção que os componentes dos óleos essenciais podem ter na célula bacteriana, estão indicados na figura 6. Nem todos estes mecanismos se realizam em separado; alguns são afectados como uma consequência de outro mecanismo [Burt, 2004].

Uma característica importante dos óleos essenciais e dos seus componentes é a sua hidrofobicidade, que permite a partição dos lípidos da membrana celular da bactéria e da mitocôndria, perturbando a estrutura e tornando-os mais permeáveis. Pode ocorrer a perda de iões e outros conteúdos celulares. A perda extensiva de conteúdos da célula ou então a saída crítica de moléculas e iões conduzirá à morte da célula [Burt, 2004].

Geralmente, os óleos essenciais que contêm uma elevada percentagem de componentes fenólicos, tais como o carvacrol, o eugenol e o timol, possuem fortes propriedades antibacterianas contra patogénios de origem alimentar. Parece sensato que os seus mecanismos de acção seriam, portanto, semelhantes a outros fenólicos; isto é geralmente considerado ser um distúrbio da membrana citoplasmática, perturbando a força motriz de protões (PMF – Proton Motive Force), o fluxo de electrões, o transporte activo e a coagulação dos componentes da célula [Burt, 2004].

Os componentes dos óleos essenciais também parecem agir nas proteínas da célula embebidas na membrana citoplasmática. As enzimas tais como as ATPases são conhecidas por estarem localizadas na membrana citoplasmática e por estarem delimitados por moléculas de lípidos. Dois possíveis mecanismos têm sido sugeridos pelo qual os hidrocarbonos cíclicos poderiam actuar sobre estes. Hidrocarbonetos lipofílicos podem-se acumular na bicamada lipídica e distorcer a interacção lípido-proteína; alternativamente, a interacção directa dos componentes lipofílicos com partes hidrofóbicas da proteína é possível. Alguns óleos essenciais têm sido conhecidos por estimular o crescimento de pseudomicelias (uma série de células que aderem por extremo-extremo, como o resultado da separação incompleta de células recém

formadas) em certas leveduras. Isto poderia ser uma indicação de que os óleos essenciais actuam nas enzimas envolvidas nos componentes estruturais [Burt, 2004].

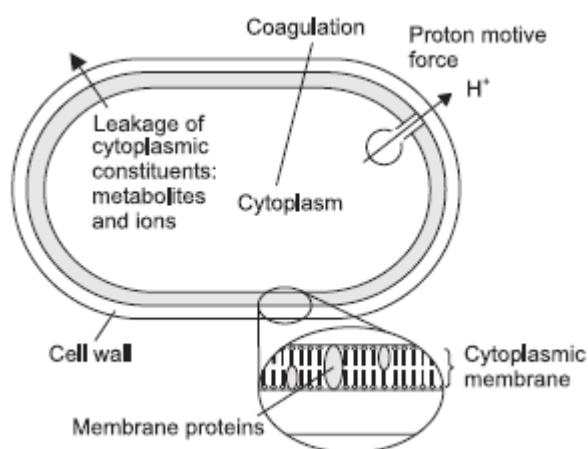


Figura 6: Localizações e mecanismos na célula bacteriana dos sítios de acção dos componentes dos óleos essenciais: degradação da parede celular; dano da membrana citoplasmática; dano das proteínas membranares; fuga dos componentes da célula; coagulação do citoplasma e diminuição da força motriz dos prótons [Adaptado de Burt, 2004].

1.4.1. Carvacrol e Timol:

O modo de acção do carvacrol, um dos principais componentes dos óleos de oregano e timus, parece ter recebido uma maior atenção dos investigadores. O timol é estruturalmente muito semelhante ao carvacrol, tendo o grupo hidroxilo numa localização diferente no anel fenólico. Ambas as substâncias parecem fazer a membrana celular permeável [Burt, 2004].

O carvacrol e o timol são capazes de desintegrar a membrana exterior das bactérias Gram-negativas, libertando os lipopolissacáridos (LPS) e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática para o ATP (Trifosfato de Adenosina). Demonstrou-se que a presença de cloreto de magnésio não tem influência nesta acção, sugerindo um outro mecanismo de quelação dos catiões na membrana externa [Burt, 2004].

Estudos com *Bacillus cereus* têm demonstrado que o carvacrol interage com a membrana da célula, dissolvendo-se em bicamada fosfolipídica e é assumido a alinhar

entre as cadeias de ácidos gordos. Esta distorção da estrutura física pode causar a expansão e destabilização da membrana, aumentando a fluidez da membrana, que por sua vez pode aumentar a permeabilidade passiva. A medição da temperatura de transição de fase média dos lípidos bacterianos, confirma que as membranas tornam-se instantaneamente mais fluidas na presença do carvacrol. A passagem de metabolitos celulares do *Bacillus cereus* através da membrana celular, expondo-o ao carvacrol, tem sido investigada. As medições do ATP extracelular e intracelular revelou que o nível de ATP dentro da célula diminui, enquanto fora da célula não houve aumento proporcional. Presume-se, portanto, que a taxa de síntese de ATP foi reduzida ou que a taxa de ATP hidrolisado foi aumentada. As medições do potencial de membrana, das células em crescimento exponencial, revelaram uma diminuição acentuada a quando da adição de carvacrol e indica um enfraquecimento da força motriz dos prótons. O gradiente de pH através da membrana celular foi enfraquecido pela presença do carvacrol e foi completamente dissipada na presença de 1mM ou mais. Além disso, os níveis intracelulares de íons de potássio caíram, enquanto a quantidade extracelular aumentou proporcionalmente. Concluiu-se que o carvacrol forma canais através da membrana pelo afastamento das cadeias dos ácidos gordos dos fosfolípidos, permitindo que os íons saiam do citoplasma. O óleo essencial de oregano, contém carvacrol como um componente maioritário, causa de fuga dos íons fosfato a partir do *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa* [Burt, 2004].

Num estudo, examinou-se o trabalho do timol contra o *Salmonella typhimurium* e o *Staphylococcus aureus* e a hipótese de o timol se ligar às proteínas da membrana hidrofóbicas e por meio de ligações de hidrogénio, mudando assim as características de permeabilidade da membrana. Observou-se que o timol inibe mais a pH 5.5 do que a pH de 6.5. Em pH baixo a molécula de timol será indissociável e portanto mais hidrofóbico, e pode-se ligar melhor às áreas hidrofóbicas das proteínas e dissolver melhor na fase lipídica [Burt, 2004].

1.4.2. Eugenol:

O eugenol é o componente maioritário (aproximadamente 85%) do óleo de cravo. Concentrações sub-letais do eugenol tem demonstrado inibirem a produção da amilase e das proteases pelo *Bacillus cereus*. A deterioração da parede celular e um elevado grau da lise celular também foram observadas. Pensa-se que o grupo hidroxilo

do eugenol se liga às proteínas, prevenindo a acção enzimática no *Enterobacter aerogenes* [Burt, 2004].

1.4.3. p-Cimeno:

O precursor biológico do carvacrol, o p-cimeno é hidrofóbico e causa um inchaço da membrana citoplasmática em maior medida do que o carvacrol. O p-cimeno não é um antimicrobiano efectivo quando usado sozinho, mas quando combinado com o carvacrol, o sinergismo tem sido observado contra *Bacillus cereus in vitro*. A maior eficiência do p-cimeno ao ser incorporado na bicamada lipídica do *Bacillus cereus*, muito provavelmente facilita o transporte do carvacrol através da membrana citoplasmática [Burt, 2004].

1.4.4. Carvona:

Quando testado num sistema de modelo lipossómico em concentrações acima do MIC, a carvona (2-metil-5-(1-metiletenil)-2ciclo-hexen-1-ona) dissipa o gradiente de pH e a membrana das células. A taxa de crescimento específico da *Escherichia coli*, do *Streptococcus thermophilus* e do *Lactococcus lactis* diminui com o aumento das concentrações da carvona, pelo que sugere que age pelo distúrbio do estado da energia metabólica das células. Em contraste, noutro estudo constatou-se que a carvona foi ineficaz na membrana externa da *Escherichia coli* e do *Salmonella typhimurium* e não afecta o “pool” do ATP intracelular [Burt, 2004].

1.4.5. Cinamaldeído:

Apesar de se saber que o cinamaldeído inibir o crescimento da *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium* em concentrações similares ao carvacrol e timol, não desintegra a membrana externa ou esgota o “pool” de ATP intracelular. Pensa-se que o grupo carbonilo se liga às proteínas, prevenindo a acção das descarboxilases dos aminoácidos no *Enterobacter aerogenes* [Burt, 2004].

1.4.6. Terpineno:

O γ -terpineno não antagoniza o crescimento do *Salmonella typhimurium*, ao passo que o α -terpineno inibe 11 das 25 espécies bacterianas estudadas [Burt, 2004].

1.5. Sinergismo e antagonismo entre os componentes dos óleos essenciais:

A actividade inerente de um óleo pode ser esperada relacionando a configuração química dos componentes, as proporções em que estão presentes e às interacções entre eles. Um efeito aditivo é observado quando o efeito combinado é igual à soma dos efeitos individuais. O antagonismo é observado quando o efeito de um ou ambos os componentes é menor quando são aplicadas em conjunto do que quando aplicadas individualmente. O sinergismo é observado quando o efeito das substâncias combinadas é maior do que a soma dos efeitos individuais [Burt, 2004]. Quanto às suas propriedades biológicas, tem que ser lembrado que os óleos essenciais são misturas complexas de numerosas moléculas, e pode-se por em questão se os seus efeitos biológicos são o resultado de um sinergismo de todas as moléculas ou se reflecte somente as das principais moléculas presentes nos níveis mais altos. Geralmente, os principais componentes reflectem as características biofísicas e biológicas dos óleos essenciais das quais foram isoladas, a amplitude dos seus efeitos é apenas dependente da sua concentração, quando foram testados sozinhos ou incluídos nos óleos essenciais. Deste modo, as funções sinérgicas de várias moléculas contidas num óleo essencial, em comparação à acção de um ou dois componentes principais do óleo, parecem ser questionáveis. Contudo, é possível que a actividade dos componentes principais seja modulada por outras moléculas principais. Além disso, é provável que diversos componentes dos óleos essenciais desempenhem um papel na definição da fragrância, da densidade, da textura, da cor e acima de tudo, a penetração das células, atracção lipofílica ou hidrofílicas e a fixação nas paredes e membranas das células, e distribuição celular. Esta última característica é muito importante porque a distribuição do óleo nas células determina diferentes tipos de reacções radicais produzidas, dependendo da sua compartimentação da célula. Neste sentido, para fins biológicos, é mais instrutivo o estudo de um óleo integral do que algum dos seus componentes, porque o efeito do sinergismo parece ser mais significativo [Bakkali *et al*, 2008].

1.6. Métodos para avaliação da actividade antimicrobiana:

Actualmente existem diversas técnicas de *screening* para definir se o extracto de uma determinada planta possui actividade antimicrobiana, desde as mais simples, que podem ser realizadas rotineiramente, até as mais sofisticadas, que muitas vezes se tornam indisponíveis em alguns laboratórios [Alves *et al*, 2008].

Os dois métodos mais utilizados para *screening* de extractos de plantas com potencial antimicrobiano são os de difusão em agar e de diluição em caldo [Alves *et al*, 2008].

1.6.1. Métodos de difusão em agar:

O teste de difusão em agar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é testado contra uma substância biologicamente activa num meio de cultura sólido, relacionando-se o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo testado com a concentração da substância ensaiada [Ostrosky *et al*, 2008].

A aplicação do método de difusão limita-se a microrganismos de crescimento rápido (aeróbios ou anaeróbios facultativos). A avaliação é efectuada comparativamente a um padrão de referência (controlo positivo). A zona ou halo de inibição de crescimento é medida, até à periferia onde há crescimento microbiano. De acordo com a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como:

↳ Sensíveis – quando o diâmetro do halo de inibição é igual a ± 3 mm que o halo de inibição do controlo positivo [Ostrosky *et al*, 2008];

↳ Moderadamente sensíveis – o halo de inibição é maior que 2 mm, mas menor que 3 mm que o halo de inibição do controlo positivo [Ostrosky *et al*, 2008];

↳ Resistentes – o diâmetro igual ou menor que 2 mm [Ostrosky *et al*, 2008].

Como controle positivo, aplica-se um quimioterápico padrão, e como controlo negativo a solução utilizada na preparação das diluições dos extractos [Ostrosky *et al*, 2008].

As condições de incubação recomendadas são: 35-37 °C para bactérias durante 24 a 48 horas e para fungos de 25 a 27 °C por 48 a 72 horas [Ostrosky *et al*, 2008].

As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em agar [Ostrosky *et al*, 2008].

1.6.1.1. *Teste de difusão em disco:*

O teste de difusão em disco é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute (antes designado por NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards)). O teste de difusão em disco consiste na aplicação de 10 µL da solução de agente antimicrobiano em discos de papel de filtro estéreis de 6 mm de diâmetro, nas diferentes concentrações a serem testadas. [Ostrosky *et al*, 2008].

A metodologia consiste em colocar os discos sobre o meio de cultura sólido previamente inoculado em placas de Petri com as respectivas concentrações microbianas aconselhadas, 10⁸ UFC/ml (Unidade Formadora de Colônia/ml) para bactérias, 10⁶ UFC/ml para leveduras e 10⁴/ml para esporulados. A disposição dos discos deve ser tal que a sua distância até a lateral da placa seja maior que 15 mm e de modo a não sobrepor as zonas de inibição. O pH do meio de cultura deve estar entre 7,2 e 7,4 e a espessura recomendada de agar é de aproximadamente 4 mm [Ostrosky *et al*, 2008].

1.6.1.2. *Cilindros de aço inoxidável:*

Esta técnica de aplicação envolve cilindros de aço inoxidável no meio de cultura solidificado já inoculado e a adição da solução em estudo nos cilindros [Ostrosky *et al*, 2008].

1.6.1.3. *Perfuração em agar:*

Na técnica de perfuração em agar, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros para a formação de poços, os quais são preenchidos com as substâncias a serem testadas [Ostrosky *et al*, 2008].

1.6.2. Método de diluição em caldo:

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo a testar no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano [Ostrosky *et al*, 2008].

Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Mínima Inibitória (CMI). As CMIs são excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos [Alves *et al*, 2008]. Propôs-se então uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados da CMI, utilizando a técnica de microdiluição, considerando como:

- ↳ *Forte inibição* – CMI até 500 µg/ml²;
- ↳ *Inibição moderada* – CMI entre 600 e 1500 µg/ml²;
- ↳ *Fraca inibição* – CMI acima de 1600 µg/ml²;

A actividade bactericida também pode ser determinada pelos métodos das diluições em caldo. A Concentração Mínima Bactericida (CMB), segundo este método, representa um índice artificial da actividade bactericida [Barry *et al*, 1999].

O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. A sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos e quando os agentes antimicrobianos a serem testados são pouco solúveis em solução aquosa (no caso da maioria dos óleos essenciais). Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada do microrganismo em teste, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado para a diluição da amostra e a suspensão microbiana. Duas metodologias podem ser seguidas: macrodiluição e microdiluição [Ostrosky *et al*, 2008].

² http://www.multiciencia.rei.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf

1.6.2.1. Macrodiluição:

A metodologia é realizada em tubos de ensaio com tampas de rosca ligeiramente soltas, tampas de metal de plástico, ou tampões de algodão. Preparam-se volumetricamente as diluições finais 1:2 do agente antimicrobiano a testar em caldo. O volume mínimo final necessário para cada solução é de 1 ml. Visto que haverá uma diluição de 1:2 dos agentes quando for acrescentado um volume equivalente de inóculo, as diluições de antimicrobiano são preparadas, com frequência, em concentrações 2× a concentração final desejada. Ou seja, isto vai resultar numa diluição de 1:2 de cada concentração de antimicrobiano e uma diluição de 1:2 do inóculo [Ferraro *et al*, 2003]. O tempo e as temperaturas de incubação, variam de acordo com o tipo de microrganismo a ser testado. Normalmente, usa-se uma temperatura de 36 °C ± 1 °C, durante 18-24 h para os microrganismos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp*. Após incubação examinam-se os tubos de ensaio e determinam-se a CMI e a CMB. A CMI e a CMB podem ser detectadas a “olho nu” ou através de aparelhos baseados em leitura óptica [Alves *et al*, 2008]. Por ser trabalhoso, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gerar grande quantidade de resíduos é usado um pequeno número de réplicas [Ostrosky *et al*, 2008].

1.6.2.2. Microdiluição:

A técnica de microdiluição é uma adaptação da técnica de macrodiluição. É denominada de microdiluição, porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de plástico estéreis, próprias para microdiluição, que possuem poços de fundo redondo ou cónico. Um investigador, utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a actividade antimicrobiana em extractos vegetais e observou inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto outras permaneciam em suspensão [Ostrosky *et al*, 2008].

1.6.3. Método do efeito do vapor do óleo essencial:

Esta técnica consiste em verificar se o vapor do óleo essencial tem efeito antimicrobiano contra um determinado microrganismo. Este teste é feito em placas com meio agar inoculado com o microrganismo a testar. Basicamente coloca-se uma determinada quantidade de óleo no centro da tampa da placa, e incuba-se a mesma invertida a 37°C durante 24h. Pode-se também utilizar discos de papel estéreis, saturados com óleo, que são colocados igualmente no centro da tampa da placa para se verificar tal efeito. A distância entre a amostra de óleo e o agar deve ser de $\cong 1$ cm [Lisin *et al*, 1999].

1.7. Factores que interferem nos métodos:

Tem-se desenvolvido métodos de investigação *in vitro* que produzam resultados confiáveis e possam ser reproduzidos e validados. Contudo, essa tarefa tem sido dificultada pelas peculiaridades que os óleos apresentam, tais como: volatilidade, insolubilidade em água e sua complexidade química, características que interferem significativamente nos resultados. Tais dificuldades tornam os resultados disponíveis na literatura difíceis de comparar. Por outro lado, os métodos usados diferem largamente e factores importantes que influenciam os resultados são frequentemente negligenciados [Nascimento *et al*, 2008]. Por isso, diversos são os factores que afectam a susceptibilidade microbiana e dos métodos de difusão e diluição. Há assim portanto, a necessidade do conhecimento das condições experimentais e padronização rigorosa na execução dos testes. Os aspectos importantes a serem considerados são:

1.7.1. Meios de cultura:

Os meios de cultura devem proporcionar um crescimento adequado dos organismos a serem testados e não conter substâncias que afectam a actividade antimicrobiana em estudo. Deve-se controlar rigorosamente o volume de agar transferido para a placa de Petri, e o meio de cultura deve ser distribuído de modo a evitar formação de estrias superficiais e bolhas. No método de difusão a espessura e concentração do agar podem influenciar os resultados dos ensaios. Entre os meios de cultura utilizados para teste de susceptibilidade de bactérias, tais como o meio de caseína de soja (TSA e TSB) e o meio líquido Luria-Bertani, o Muller-Hinton é o mais utilizado [Ostrosky *et al*, 2008]. Considera-se que este é o melhor meio para testes de sensibilidade a antibióticos contra bactérias porque, apresenta uma boa reprodutibilidade, possui baixos teores de inibidores de sulfonamida, trimetoprim e tetraciclina e produz crescimento satisfatório da maioria dos patógenos. Além disso, existe um grande conjunto de dados e experiências relativos a testes de sensibilidade antimicrobiana realizados com este meio [Ferraro *et al*, 2003].

Há substâncias no meio de cultura que influenciam a susceptibilidade do teste, a timidina antagoniza a actividade de sulfonamidas e trimetroprinas, conduzindo a um resultado falso de resistência a tais agentes. Se o meio contiver altas concentrações de

timidina, pode-se adicionar sangue lisado de cavalo ou timidina fosforilada para remover a timidina livre. Os cátions monovalentes Na^+ aumentam a actividade de bacitracina, ácido fusídico e novobiocina contra *Staphylococcus spp* e da penicilina contra *Proteus spp*. Cátions bivalentes tais como Mg^{2+} e Ca^{2+} reduzem a actividade de aminoglicosídeos e polimixinas contra *Pseudomonas spp* e da tetraciclina contra uma série de organismos [Ostrosky *et al*, 2008].

1.7.2. pH:

O pH do sistema deve ser compatível com o crescimento microbiano, com a actividade e a estabilidade das substâncias testadas. O aumento da acidez do meio diminui a actividade antibacteriana de substâncias, tais como, a estreptomicina, e por outro lado, provoca o aumento da actividade de substâncias ácidas como a penicilina [Ostrosky *et al*, 2008].

A atmosfera com concentração de CO_2 elevada, deve ser evitada, já que altera o pH da superfície, podendo por isso, afectar a actividade antimicrobiana de alguns agentes [Ostrosky *et al*, 2008].

1.7.3. Disponibilidade de oxigénio:

Conforme o metabolismo do microrganismo a testar, aeróbios, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos, as condições de disponibilidade desse gás podem influenciar na sua multiplicação. Nos trabalhos desenvolvidos para a determinação da actividade da estreptomicina utilizando *Staphylococcus aureus*, por diluição em tubos, verificou-se que houve pouca influência da disponibilidade de oxigénio [Ostrosky *et al*, 2008].

1.7.4. Inóculo:

A susceptibilidade dos agentes antimicrobianos é dependente da quantidade do inóculo. A padronização do inóculo é necessária e a quantidade de inóculo deverá ser estabelecido para cada método desenvolvido. No teste de susceptibilidade da metilina contra *Staphylococcus*, esse padrão deve ser de 10^6 UFC/ml. Para os testes de diluição

em caldo, o padrão é de $5 \cdot 10^5$ UFC/ml no início do período de incubação [Ostrosky *et al*, 2008].

A preparação do inóculo nos métodos de diluição e difusão deve ser feita a partir de 4 ou 5 colónias da cultura pura do microrganismo a testar. O padrão de leitura 0,5 na escala McFarland corresponde à densidade de aproximadamente 10^8 UFC/ml. Alternativamente, o inóculo pode ser ajustado fotométricamente ou por diluição padronizada do caldo nutriente, se a densidade de tais culturas for razoavelmente constante. As placas devem ser inoculadas num período máximo de 15 minutos após a padronização do inóculo, de modo a que a densidade celular não se altere [Ostrosky *et al*, 2008].

Estudos da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais, na sua maioria, não fornecem detalhes sobre a quantidade, o tipo de microrganismo utilizado e o espectro desta actividade, dificultando a sua reprodutibilidade e a comparação de dados. Além disso, a escolha dos microrganismos a testar apresenta uma tendência de se utilizar linhagens de diferentes géneros, o que resulta numa variação significativa entre o diâmetro dos halos de inibição, tornando difícil a comparação. Por isso, sugere-se que o teste da acção antimicrobiana dos óleos essenciais seja realizado com isolados múltiplos para cada espécie testada [Nascimento *et al*, 2008].

1.7.5. Condições de incubação:

A incubação dos microrganismos deve ser feita a 35-37 °C para o crescimento de bactérias e 25 a 27 °C para fungos. No método de diluição, as condições de crescimento dos microrganismos nos tubos devem ser semelhantes, propiciando-se a mesma temperatura e agitação quando necessária. No método de difusão as placas devem ser incubadas com o cuidado de se manter a temperatura homogénea na estufa. Condições alternativas só devem ser utilizadas se forem essenciais para o crescimento do microrganismo em teste [Ostrosky *et al*, 2008].

1.7.6. Emulsionador e o óleo essencial utilizado:

Nos ensaios com óleos essenciais, deve-se considerar que os óleos são potencialmente voláteis, insolúveis em água, viscosos e complexos. Além disso, podem formar uma suspensão turva que impede a determinação visual da eficácia

antimicrobiana do óleo (caso do método de diluição em caldo), devido à insuficiente dissolução dos componentes testados. Sendo assim, a falta de padronização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana tem sido um dos obstáculos encontrados para a realização deste tipo de estudo [Nascimento *et al*, 2008].

Outro problema que surge é quando se utiliza a técnica de difusão em agar, pois a difusão irregular dos componentes lipofílicos dos óleos resulta em concentrações desiguais do óleo no agar, causando a formação de regiões com actividade antimicrobiana variável [Nascimento *et al*, 2008].

Visando melhorar a qualidade dos procedimentos com óleos essenciais, tornou-se comum a utilização de solventes, detergentes, ou agentes emulsionadores, para facilitar a dispersão dos mesmos num meio de cultura. Estes agentes podem causar mudanças nas propriedades físico-químicas no sistema de teste. Isto permite assim assegurar que o óleo, o agente antimicrobiano, entre em contacto com o microrganismo em teste. Os agentes mais comuns usados são o Tween 80, o Tween 20, o Etanol e o dimetilsufóxido (DMSO) [Mann e Markham, 1998]. As propriedades físicas e químicas desses agentes são importantes para auxiliar na visualização da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais, no entanto, deve-se levar em consideração que ao se introduzir um agente emulsionador, este está sujeito a possíveis interacções com a substância em teste, bem como possuir actividade antimicrobiana. Esses efeitos podem ser acentuados ou minimizados dependendo do modo de preparação da solução óleo - agente emulsionador [Nascimento *et al*, 2008].

A interferência do agente emulsionador na susceptibilidade da bactéria ao óleo essencial pode ser explicada pela possível influência que este exerce sobre o crescimento bacteriano e/ou sobre a permeabilidade da membrana celular. Os emulsionadores podem agir antagonicamente ou sinergicamente com os componentes activos do óleo. Altas concentrações de Tween, por exemplo, podem aumentar a actividade antibacteriana produzindo resultados falsos-positivos ou reduzir a bioactividade do óleo (falsos-negativos). Esse último efeito, é possivelmente causado pela formação de micelas que dificultariam o contacto directo do óleo com os microrganismos. Para minimizar esses efeitos, alguns autores propuseram que os emulsionadores Tween 20, Tween 80 e outros, sejam utilizados em concentrações que variem entre 0.5 a 20% em solução com o óleo. Para o Tween 80 especificamente, recomenda-se a concentração específica de 0.02% a fim de padronizar o método de diluição em caldo para a determinação da CMI, estando os valores destes relacionados com o agente

emulsionador usado [Nascimento *et al*, 2008]. Relativamente ao etanol, certos estudos revelaram que concentrações baixas do mesmo, aproximadamente 5%, têm efeitos potenciados na actividade de alguns agentes antimicrobianos. A incorporação de agar bacteriológico, de concentrações de 0.15-0.20% (w/v), em caldo nutritivo, na técnica de diluição em caldo, é uma vantagem, porque relativamente a outros agentes dispersantes, o agar estabiliza emulsões formadas, ou seja, estabiliza a mistura óleo-água [Mann e Markham, 1998].

Em relação à particularidade do óleo, algumas pesquisas a respeito da sua composição mostram que mesmo variações genéticas intraespecíficas da espécie vegetal podem alterar o teor do princípio activo presente no óleo. Outros factores, tais como, o clima, solo, época e forma de plantio, adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, tempo e condições ambientais, proveniência do material da planta (fresco ou seco), técnica de extracção, fonte botânica, tratos culturais e colheita e padrões de variação geográfica (latitudes e longitudes) afectam a composição química dos óleos, podendo provocar alterações na actividade antimicrobiana [Nascimento *et al*, 2008].

O volume e a concentração dos óleos são parâmetros essenciais que devem ser considerados na validação do efeito antimicrobiano, pois podem afectar os resultados do sistema-teste. Por isso, nos estudos em que se utilizam cavidades no meio de cultura, é necessário que estas contenham um volume mínimo de óleo que possibilite a visualização da inibição. Existe ainda um volume óptimo, a partir do qual não se observa um aumento do diâmetro do halo de inibição. Entretanto, a significância destes volumes na descrição da actividade antimicrobiana de um óleo essencial não se encontra totalmente esclarecida. Quando cilindros, cavidades cilíndricas e discos de diâmetros similares são usados para o mesmo óleo, diâmetros de inibição iguais são encontrados. Isto é relevante porque a aplicação de volumes difere largamente [Nascimento *et al*, 2008].

Segundo Alves *et al*. (2008), a técnica dos poços (cavidades cilíndricas) mostra ser mais satisfatória para a detecção da actividade antibacteriana do que a técnica dos discos, visto proporcionar uma maior facilidade de contacto entre as amostras e os microrganismos testados.

1.8. Recursos utilizados para melhoria da leitura do diâmetro do halo no método de difusão em agar:

A espessura e a uniformidade do agar são essenciais para a boa interpretação dos resultados. Quando ocorrem halos de pequenas dimensões, o recurso utilizado é a diminuição do volume do meio, o que leva a diminuição da espessura do meio na placa. A pré-incubação é utilizada quando se visa diminuir a dimensão do halo e a pré-difusão para aumentar a zona de inibição [Ostrosky *et al*, 2008].

1.9. Microorganismos:

Estima-se que a Terra foi formada há cerca de 4,8 milhões de anos e que os primeiros seres vivos, as *bactérias*, organismos ancestrais de todas as formas de vida na Terra, apareceram há 3,4 mil milhões de anos. As bactérias representam cerca de 4800 espécies, distinguindo-se por serem os menores e mais simples seres do planeta Terra³.

As bactérias pertencem ao Domínio Bactéria, Reino Monera, apresentando células procariotas e devido ao facto de conseguirem suportar elevadas pressões osmóticas, elevadas temperaturas e pH elevado, podem ser encontradas em todos os meios, ou seja, no ar, na água, no solo ou até mesmo no interior de organismos. Se o Reino Monera se extinguisse da Terra todos os restantes reinos se extinguiriam, pois haveria interrupção dos ciclos químicos³.

São várias as espécies de bactérias com aspectos negativos e positivos, podendo ser parasitas e transmitir doenças a outros organismos, ou podendo apresentar-se como úteis na digestão de celulose em ruminantes, produzir derivados de leite, reciclar matéria na natureza, entre outros. Apesar de muitas das espécies de bactérias serem patogénicas, muitas delas são imprescindíveis³.

1.9.1. *Escherichia coli*:

A espécie *Escherichia coli* pertence ao Domínio Bactéria, Filo Protobacteria, Ordem Enterobacteriales e Género *Escherichia*. A *Escherichia coli* assume a forma de um bacilo/bastonete (figura 7); é Gram-negativa, possui por isso a parede celular pouco espessa, sendo mais complexa que as Gram-positivas pelo facto de apresentar uma membrana externa que cobre a fina camada de peptidoglicano, actuando como barreira selectiva para a entrada e saída de algumas substâncias da célula, esta membrana externa é constituída por fosfolípidos, lipoproteínas e LPS. Estes últimos LPS activam o sistema imunitário de forma desproporcionada e a vasodilatação excessiva provocada pelas citosinas produzidas pode conduzir ao choque

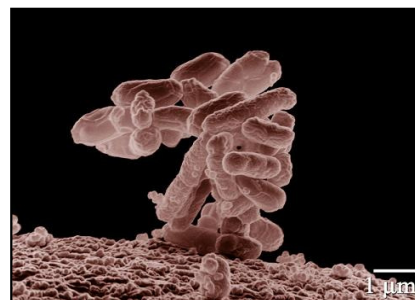


Figura 7 – *Escherichia coli* em forma de bacilo³.

³ www.esac.pt/abelho/MicroAmbiental/trabalhos_alunos/20707007_34_56_Escherichia_coli.pdf [consultado em 20 de Março de 2010].

séptico e morte em casos de septicemia; não forma esporos; a sua mobilidade é feita através de flagelos (figura 8), contudo, podem ser imóveis³.

Estas bactérias são anaeróbias facultativas, ou seja, possuem mecanismos que lhes permitem utilizar o oxigénio, e por outro lado, conseguem-se desenvolver na sua ausência; utilizam D-glicose e outros carboidratos com a formação de ácido e gás; são oxidase negativas e lactase positivas (a lactase é uma enzima fermentadora de açúcares

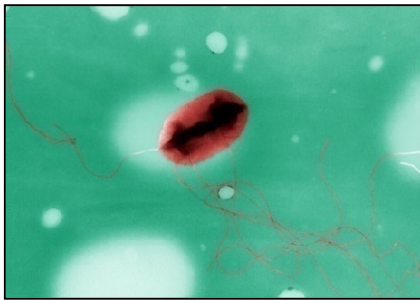


Figura 8 – *Escherichia coli* com flagelos³.

responsável pela flatulência nos humanos, especialmente após o consumo de leite e seus derivados); possuem fímbrias (figura 9), que permitem a sua fixação impedindo assim o arrastamento por fezes (urina ou diarreia)³.

A *Escherichia coli* é um membro comum na flora do intestino grosso no homem e animais.

Enquanto estas bactérias não adquirirem factores de

virulência permanecem benignas comensais. A maioria das estirpes da *Escherichia coli* são inofensivas, contudo, algumas podem ter efeitos negativos tanto para o Homem como a nível ecológico. Alguns tipos de *Escherichia coli* actuam como agentes patogénicos que podem causar diarreia, infecções do sistema urinário, doenças respiratórias e pneumonia, entre outros. É de realçar que muitas destas bactérias são utilizadas como marcadores para a contaminação

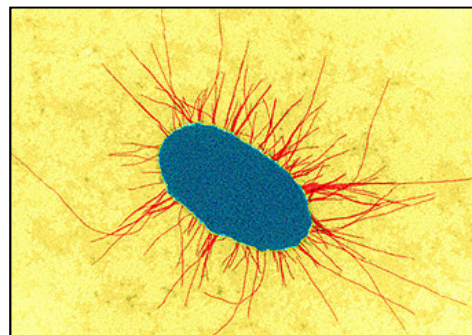


Figura 9 - *Escherichia coli* com fímbrias³.

das águas, uma vez que se encontram no intestino grosso (fezes), e quando presentes na água indicam poluição/contaminação de origem fecal, sendo por isso considerada um coliforme fecal. Deste modo, quando se faz a análise da água e estão presentes coliformes fecais, significa que naquele local houve descarga de esgotos recentemente, aumentando a probabilidade de lá existirem ovos e larvas de parasitas intestinais, devido ao facto destas formas também poderem ser excretadas juntamente com as fezes³.

1.9.2. *Salmonella*:

A *Salmonella* tem em seu nome uma referência ao cientista chamado Daniel Elmer Salmon, que associou a doença à bactéria pela primeira vez. São bactérias gram-negativas, em forma de bacilo, na sua maioria móveis (com flagelos peritríquios), não esporulado, não capsulado, sendo que a maioria não fermenta a lactose. Ela pertence à mesma família proteobacterial da *Escherichia coli*, a família *Enterobacteriaceae*, trivialmente denominada de bactéria “entérica”. A *Salmonella* é quase tão bem estudada como a *Escherichia coli* de um ponto de vista estrutural, bioquímico e molecular, e tão mal compreendida como a *Escherichia coli* do ponto de vista ecológico. Esta vive no tracto intestinal de animais de sangue quente e frio. Algumas bactérias são ubiqüitinizadas e outras são adaptadas especialmente para um determinado hospedeiro. No humano, a *Salmonella* é a causa de duas doenças chamada salmonelose: febre entérica (tifóide), resultante da evasão de bactérias na corrente sanguínea, e gastroenterite aguda, decorrente de uma infecção/intoxicação de origem alimentar⁴.

O seu aparecimento no homem é sempre patogénico e a sua transmissão é feita por ingestão de água ou alimentos contaminados (tais como o leite). Possuem 2 sistemas de secreção SPI1 e SPI2. SPI1 insere nas células M das placas de Peyer do intestino delgado as proteínas bacterianas Sips ou Ssps, do que resulta um pregueamento da membrana celular por rearranjo da actina. Esta membrana pregueada envolve a bactéria e captura a *Salmonella*, que se replica no interior do fagossoma, levando a morte da célula hospedeira, e espalhando-se para invadir as células vizinhas. As *Salmonellas* medeiam a produção de prostaglandinas e estimulam a andenilciclase levando a secreção activa. Elas possuem um gene de tolerância ao ácido (ATR), o que lhes permite sobreviver ao pH ácido do estômago e do fagossoma. São catalase e superóxido dismutase positivas, o que lhes permite resistir à morte intracelular. Produzem ácido e gás a partir de glicose a manitol. São urease, lactose e sacarose negativas. Geralmente produzem H₂S⁵.

⁴<http://www.textbookofbacteriology.net/salmonella.html> [consultado em 20 de Março de 2010].

⁵http://users.med.up.pt/cc04-10/MicroTextosApoio/3_bacilos_Gram-.pdf [consultado em 20 de Março de 2010].

1.9.3. *Staphylococcus aureus*:

O *Staphylococcus* (em grego staphyl significa cacho de uvas e coccus significa grânulo) é uma bactéria Gram-positiva. Ao microscópio eles aparecem redondos sob a forma de cachos de uva. Existem várias espécies de *Staphylococcus* em que a maior parte é inofensiva e residem normalmente na pele e membranas mucosas dos humanos e outros órgãos. Eles são um pequeno componente da flora microbiana do solo⁶.



Figura 10 – *Staphylococcus aureus*⁷.

O *Staphylococcus* pode causar uma variedade de doenças no humano quer através da produção de toxinas ou através da invasão. Por exemplo, a causa mais comum da intoxicação alimentar é as toxinas do *Staphylococcus*. O crescimento da bactéria em alimentos armazenados de forma inadequada, o processo de cozimento mata-los mas as toxinas produzidas são resistentes ao calor. O *Staphylococcus* pode crescer em alimentos com actividade da água relativamente baixa (tais como o queijo e o salame)⁶.

Uma espécie nociva é o *Staphylococcus aureus*. É uma bactéria também conhecida por Estafilococos dourados. Esta bactéria pode ser encontrada nos seres humanos (pele, cortes infectados, borbulhas, nariz e garganta) que se multiplica à temperatura ambiente⁷. Estas bactérias podem sobreviver em superfícies secas aumentando a chance de transmissão. Pode causar doenças que vão desde infecções cutâneas menores (tais como espinhas e celulite) e abscessos, a doenças potencialmente fatais, como a pneumonia, meningite, endocardite e septicemia. As infecções pode ser transmitida através do contacto com o pus de uma ferida infectada, contacto pele a pele com uma pessoa infectada, e do contacto com objectos como toalhas, lençóis, roupas ou equipamento atlético usado por uma pessoa infectada⁶.

No laboratório o *Staphylococcus aureus* é diferenciado da maioria dos outros estafilococos pelo teste de coagulase, uma vez que são *Staphylococcus* coagulase positivos⁶.

⁶ http://www.bionewsonline.com/i/what_is_staphylococcus_aureus.htm [consultado em 20 de Março de 2010].

⁷ <http://www.ambientesauade.pt/contents/html/File/Staphylococcus%20aureus.pdf> [consultado em 20 de Março de 2010].

1.10. Susceptibilidade dos organismos Gram-positivos e Gram-negativos aos óleos essenciais:

Como já foi referido, os óleos essenciais e os seus componentes são conhecidos por serem activos contra uma ampla variedade de microrganismos, incluindo as bactérias Gram-negativas e bactérias Gram-positivas [Chung *et al*, 2007]. Os óleos essenciais são ligeiramente mais activos contra as bactérias Gram-positivas do que as bactérias Gram-negativas. É talvez de esperar que os organismos Gram-negativos sejam menos susceptíveis às acções antibacterianas, já que possuem uma membrana externa em torno da parede celular, o que restringe a difusão de componentes hidrofóbicos através do seu revestimento lipopolissacárido. Os componentes individuais dos óleos essenciais, exibem diferentes graus de actividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e sabe-se que a composição química dos óleos essenciais a partir de uma espécie de planta particular pode variar de acordo com a origem geográfica e o período de colheita. É portanto possível que a variação na composição entre lotes de óleos essenciais é suficiente para causar uma variabilidade no grau de susceptibilidade das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [Burt, 2004].

1.11. Óleos essenciais:

1.11.1. *Guaiac wood*: Óleo de *Bulnesia sarmientoi* (Palo Santo):

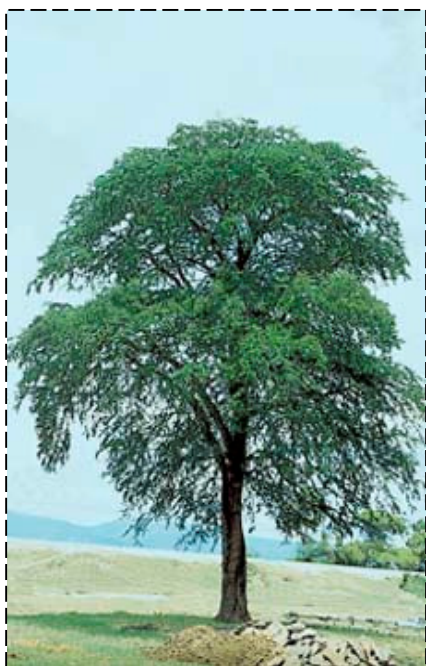


Figura 11 – *Bulnesia sarmientoi*

[Adaptado de:

<http://www.achetudo.info/Arvores/Arvores.gif/pausanto.jpg> (Consultado em 8 Abril de 2010)].

Bulnesia sarmientoi Lorentz ex Griseb. (“Palo Santo”), que pertence à família *Zygophyllaceae*, é uma árvore do Chaco Boreal Sul-americano. As serrinas produzidos como subprodutos do processamento da madeira destilam-se para preparar um óleo essencial conhecido como óleo de guaiaco (guaiacwood oil), que é utilizado como ingrediente de perfumes e em usos medicinais externos. Este óleo apresenta uma composição de uma grande complexidade, é constituído por um número importante de sesquiterpenos estruturalmente semelhantes, sendo caracterizados à volta de 40 sesquiterpenos, e com muitos isómeros [Dellacassa *et al*, 2006⁸]. Como compostos maioritários, este óleo possui o guaiaco e bulnesol, de cerca de 85% do óleo essencial obtida da *Bulnesia sarmientoi*⁹. Para a caracterização da actividade biológica do óleo

essencial de *Bulnesia sarmientoi* e dos seus componentes principais foram realizados diversos estudos. Estes estudos revelaram que o óleo essencial apresentou uma actividade repelente importante sobre os pulgões frente às duas espécies testadas (*Myzus persicae* e *Rhopalosiphum padi*), apresentou também uma actividade anti-fúngica muito boa frente as três espécies de *Fusarium* testadas, sendo o *Fusarium solani* e o *Fusarium moniliforme* os mais sensíveis e também que o óleo essencial e os seus componentes maioritários não apresentaram actividade antialimentaria (antifeedant) ou tóxica frente as larvas de *Spodoptera littoralis* [Dellacassa *et al*, 2006⁸].

⁸ http://www.ivsboe.padtec.ufc.br/CDSimposio/quimicaeatividadesbiologicasdosoleosessenciais/Resumo_DellacassaE.pdf [consultado em 5 de Abril de 2010].

⁹ <http://www.bojensen.net/EssentialOilsEng/EssentialOils13/EssentialOils13.htm> [consultado em 5 de Abril de 2010].

1.11.2. *Schinus molle*:

Schinus molle pertence à família *Anacardiaceae* e é também conhecida como anacaita ou aroeira-mansa. É uma espécie heliófita e com características xerofíticas, é usualmente empregada em paisagismo ou arborização das ruas. É originária do Peru e encontra-se nativa no Brasil, Uruguai, Argentina e outros países da região Andina [Santos *et al*, 2007]. Esta espécie é uma árvore atractiva com um



Figura 12 – *Schinus molle* [Adaptado de: http://ag.arizona.edu/pima/gardening/aridplants/Schinus_molle.html (consultado em 8 de Abril de 2010)].

tronco forte, suportando uma copa completa e densa. Cresce rapidamente, cerca de 1m por ano para uma altura de 20 m, com um diâmetro de tronco que varia de 30 a 80 cm. Encontra-se a crescer num amplo espectro de solos de areias de argila, e desenvolve-se bem em encostas íngremes secas, ravinas, vales e áreas compostas de solos pedregosos e rasos. O *Schinus molle* cresce em altitudes de 1000 a 3400 m e cresce bem a temperaturas que variam de 15 a 28 °C¹⁰.

O interesse pela espécie se dá pelo seu metabolismo secundário que produz entre outros compostos, flavonóides, taninos e óleos essenciais, com aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos e perfumaria. As suas folhas e frutos contêm óleos essenciais picantes que são bastante utilizados na medicina popular, sendo conhecida na Costa Rica como “chile” ou “pimenta da Califórnia” [Santos *et al*, 2007]. Este óleo apresenta propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antiespasmódicas, antipiréticas, antitumorais, analgésicas, antidepressivas e cicatrizantes [Santos *et al*, 2007; Rhouma *et al*, 2009]. Segundo as suas propriedades antibacterianas, num estudo realizado por Rhouma A. *et al* (2009), o *Schinus molle* demonstrou ter uma potencial fonte de componentes que são efectivos contra *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi* e *Bacillus subtilis*.

A composição química do óleo essencial consiste principalmente em hidrocarbonetos monoterpênicos, alguns sesquiterpenos e fenóis. No entanto, a composição química de plantas de mesma espécie irá depender de diversos factores, tais

¹⁰ <http://www.rngr.net/publications/ttsm/species/PDF.2004-03-16.2734/> [consultado em 7 de Abril de 2010].

como estado fenológico da planta, factores geográficos (localização), ecológicos (habitat), variabilidade genética (expressa através dos quimiotipos), processo de extracção empregado, entre outros [Santos *et al*, 2007].

1.11.3. *Lippia alba*:

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown pertence à família *Verbenaceae* que possui cerca de 175 géneros e 2800 espécies, difundidas nos trópicos e subtropicais nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e poucas espécies no Hemisfério Norte [Aguiar e Costa, 2005]. A *Lippia alba* está presente abundantemente entre o sul dos Estados Unidos da América (Florida) e o norte da Argentina. Os nomes locais e tradicionais são numerosos na América Latina, devido ao uso tradicional generalizado, e são geralmente derivadas a partir do seu cheiro aromático e das suas propriedades medicinais. O nome mais comum da *Lippia alba* utilizado no Brasil é *cidreira*, mas este nome também pode ser usado por



Figura 13 – *Lippia alba* [Adaptado de Hennebelle *et al*, 2008].

17 ervas com aroma a limão com usos similares [Hennebelle *et al*, 2008]. Também é conhecida pelo nome de chá de tabuleiro, cidrila, alecrim selvagem, cidreira brava, falsa melissa, carmelitana, salva do Brasil, salva, salva limão, alecrim do campo e salva brava [Aguiar e Costa, 2005].

Um número inacreditável de sinónimos é encontrado para a *Lippia alba*. Pertence ao género *Lippia*, *Lantana*, *Phyla*, *Verbana* e *Zapania*. A explicação pode estar na variabilidade de espécies e mais geralmente na complexidade inerente à família *Verbenaceae*. Tem sido estabelecida uma taxa de sete espécies de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: *Lippia alba* f. *alba* Moldenke, *Lippia alba* f. *intermedia* Moldenke, *Lippia alba* f. *Macrophylla* Moldenke, *Lippia alba* f. *scabra* Moldenke, *Lippia alba* var.

globiflora (L'Hér) Moldenke, *Lippia alba* var. *carterae* Moldenke e *Lippia alba* var. *lanceolata* (Griseb.) Múlgura [Hennebelle *et al*, 2008].

A *Lippia alba* é um arbusto aromático, cujo aroma está relacionado aos constituintes predominantes nos óleos essenciais, os quais podem variar qualitativamente e quantitativamente, em função de diversos factores, tais como: estações do ano, época de floração, idade da planta, quantidade de água circulante, resultante da precipitação, factores geográficos e climáticos [Aguiar *et al*, 2008]. Trata-se de um arbusto que mede até 2 m de altura, com ramos finos, esbranquiçados, arqueados e quebradiços. As folhas são opostas, elípticas de largura variável, com bordos serrados e ápice agudo. As flores são reunidas em inflorescências capituliformes de eixo curto [Aguiar e Costa, 2005].

O óleo essencial *Lippia alba* tem um conteúdo relativamente elevado de carvona, entre 30 e 35%. Outro componente químico importante do óleo essencial *Lippia alba* é o limoneno, sendo que mais de 25% do óleo essencial é limoneno¹¹.

Em 1991, Cáceres *et al*, citaram pela primeira vez a actividade antimicrobiana dos extractos etanólicos das folhas frente ao *Staphylococcus aureus*; dez anos mais tarde, a acção antimicrobiana de soluções extractivas hidrolcoólicas a 80% foi verificada frente a este microrganismo; Sena Filho *et al*. (2006) confirmou a actividade antimicrobiana de extractos etanólicos da raiz de *Lippia alba* frente a *Staphylococcus aureus*. Extractos brutos, óleos essenciais e mel do néctar das flores mostraram actividade antibiótica para diferentes microrganismos. Mais recentemente, Duarte *et al*. (2005), referiram a actividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas de *Lippia alba* sobre *Candida albicans*. Noutros estudos, foi observada uma moderada actividade do óleo essencial contra *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans* [Hennebelle *et al*, 2008].

Além das acções antimicrobianas outras propriedades têm sido atribuídas a *Lippia alba* quando utilizada na forma de chás, macerada em compressa e banhos. Entre as propriedades atribuídas à espécie destaca-se as acções antiespasmódica, antipirética, antiinflamatória, diaforética, analgésica e sedativa. Tais propriedades devem-se aos seus constituintes activos, dentre eles o óleo essencial [Aguiar *et al*, 2008].

¹¹ <http://www.unctad.org/biotrade/docs/biotradebrief-lippiaalba.pdf> [consultado em 9 de Abril de 2010].

1.11.4. *Lavandula luisieri*:



Figura 14 – *Lavandula luisieri* [Adaptado de: <http://www.flickr.com/photos/ruirodrigues/285058574/> (consultado em 8 de Abril de 2010)].

Lavandula luisieri (Rozeira) Rivaz-Martinez é vulgarmente conhecida por rosmaninho e é uma espécie endémica da Península Ibérica que pertence à família *Lamiaceae* (Labiatae). Esta espécie é comum no sul de Portugal e no sudoeste da Espanha, tendo já sido estudada nalgumas zonas de Portugal, sendo uma delas a Beira Interior. Embora os óleos essenciais de outras espécies da *Lavandula* apresentem uma importância na indústria da fragrância, os componentes voláteis da *Lavandula luisieri* têm recebido pouca atenção [Sanz *et al*, 2004; ¹²].

Os factores do clima, sobretudo a luz e a temperatura, possuem grande influência sobre o conteúdo de princípios activos, além da sua acção sobre o desenvolvimento das plantas. A *Lavandula luisieri* adapta-se a climas mediterrâneos assim como a altitudes de 0 a 1000m. No que diz respeito ao tipo de solo a sua adaptação é feita em solos graníticos e raramente em calcários. Certos investigadores associam a adaptação desta planta a solos pobres, rochosos, áridos e habitualmente em áreas com climas mediterrânicos. Referem ainda, que o pH óptimo para o género *Lavandula* está compreendido entre 7,0-9,0. As *Lavandulas* não toleram solos encharcados¹².

Muitos estudos foram publicados sobre composição química do óleo essencial de *Lavandula stoechas* L., mas muito poucos reportam os estudos do óleo essencial de *Lavandula luisieri*¹². Certos estudos têm demonstrado que a *Lavandula luisieri* tem uma composição atípica, única no reino vegetal. Descobriu-se, juntamente com 8-cineole, lavandulol, linalool e os seus acetatos, uma série de compostos com uma estrutura de 1,2,2,3,4-pentamethylcyclopentane (necrodano), tais como α -necrodol e

¹² http://repositorio.ipcb.pt/bitstream/10400.11/65/1/Adapta%CC%80o_a_o_Cultivo_e_Valoriza%CC%80o%20Lavandula%20luisieriFINAL1.pdf [consultado em 7 de Abril de 2010].

acetato de α -necrodilo [Sanz *et al*, 2004; ¹³]. Estes derivados só tinham sido encontrados na secreção defensiva de um besouro (*Necrodes surinamensis*) [Sanz *et al*, 2004], o que sugere um papel de defesa potencial da planta por estes compostos¹².

Relativamente à sua actividade antimicrobiana, Baldovini *et al.* (2005) revelaram que o óleo essencial e extractos mostraram ter actividades similares, que são significativamente boas contra *Candida albicans* e contra bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* e *Streptococcus pyogenes*.

1.11.5. *Mentha cervina*:

Mentha é um género de cerca de 25 espécies da família *Lamiaceae*. As espécies de *Mentha* têm uma distribuição cosmopolita através da Europa, África, Ásia, Austrália e norte da América. São plantas aromáticas com elevado valor comercial e industrial, usado na indústria alimentar, especiarias, na perfumaria e nas preparações farmacêuticas. Algumas são usadas na medicina popular como um antispasmódico, carminativo e os



Figura 15 – *Mentha cervina* [Adaptado de: http://www.santonine.fr/santonine/boutique/3245/mentha_cervina.htm (consultado em 8 de Abril de 2010)].

seus óleos essenciais são usados como secretolítico/mucolítico e tem sido conhecido por ter propriedades antibacterianas e antifúngicas desde a antiguidade [Gonçalves *et al*, 2007].

Mentha cervina é uma espécie do género *Mentha* que também pode ser denominado de Hart's Pennyroyal e pelo seu nome comum Português *hortelã-daribeira*. Esta planta é uma espécie emblemática da gastronomia tradicional Portuguesa mas tem-se verificado o desaparecimento desta espécie em meio selvagem [Silva *et al*, 2009].

Mentha cervina é uma planta que é característica de tipos de habitats de lagoas temporárias Mediterrâneas e de águas oligotróficas a mesotróficas com vegetação

¹³ http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_200409/ai_n9432458/?tag=content;coll (consultado em 7 de Abril de 2010).

Littorelletea uniflorae e/ou *Isoeto-Nanojuncetea* [Silva *et al*, 2009], e cresce selvagem em zonas pedregosas às margens dos rios [Gonçalves *et al*, 2007].

Análises químicas mostraram que o pulegona, isomenthona e limoneno são os principais componentes dos óleos essenciais da *Mentha cervina*, e isto explica o seu uso tradicional na cozinha bem como para fins medicinais – particularmente para problemas digestivos e respiratórios [Silva *et al*, 2009].

1.11.6. *Thymus mastichina*:



Figura 16 – *Thymus Mastichina*

[Adaptado de:
http://www.florasilvestre.es/mediterranea/Lamiaceae/Thymus_mastichina.htm (consultado em 8 de Abril de 2010)].

O género *Thymus* pertence á família *Lamiaceae*, distribui-se largamente na Península Ibérica e é uma espécie que está em risco [Pina-Vaz *et al*, 2004]. Em Portugal, pode ser encontrada 11 espécies de *Thymus* [Faleiro *et al*, 2003]. É um grupo taxonomicamente complexo de plantas aromáticas tradicionalmente usadas para fins medicinais devido às suas propriedades antisepticas, antispasmodicas e antitussico, no entanto, poucos estudos têm sido realizados sobre as propriedades antimicrobianas desta espécie em Portugal [Faleiro *et al*, 2003; Pina-Vaz *et al*, 2004]. Os óleos essenciais do *Thymus* mostram um polimorfismo químico generalizado [Pina-Vaz *et al*, 2004].

O *Thymus mastichina* ou popularmente conhecido por bela-luz ou sal-puro é um pequeno arbusto sub-lenhoso que mede até 50 cm de altura e que possui flores brancas agrupadas numa “cabeça” globosa terminal¹⁴. Em Portugal, o *Thymus mastichina* está distribuída por todo o país, excepto em regiões calcárias, o seu florescimento dá-se de Abril a Junho [Faleiro *et al*, 2003]. Surge em locais descampados, pedregosos e secos, sobretudo em zona de muito mato. Esta planta de forte aroma a eucalipto possui numerosas propriedades medicinais podendo ser utilizada em fresco ou em seco, em

¹⁴ <http://www.biobrassica.pt/document/attachment/4/tomilho-bela-luz.pdf> (consultado em 7 de Abril de 2010).

infusão nos casos de gripes, constipações, má digestão, dores de garganta e rouquidão. Na cozinha, as suas folhas além de serem um bom substituto do sal, realçam o sabor dos pratos de carne, enchidos, queijos, sopas e saladas. Também é óptimo para aromatizar azeites e vinagres. Adapta-se bem ao cultivo exigindo solos com boa exposição, de preferência viradas a Sul, bem drenados. Espécie muito rústica, pouco exigente em água, bastante resistente à geada e às doenças e pragas¹⁴. Relativamente à composição do óleo essencial do *Thymus mastichina*, alguns autores referiram que o camfor, 1,8-cineole, linalool e 1,8-cineole/linalool, são os componentes principais deste óleo. Segundo estes autores, o linalool e o 1,8-cineole/linalool só são encontrados na Estremadura (Portugal), enquanto o 1,8-cineole está bem distribuída pelo país [Faleiro *et al*, 2003].

Os óleos essenciais do *Thymus* são conhecidos por possuírem propriedades antibacterianas, sendo as bactérias Gram-positivas, geralmente, as mais susceptíveis do que as gram-negativas. A actividade antibacteriana dos óleos essenciais do *Thymus* Português foi primeiramente descrita a partir do *Thymus mastichina* e do *Thymus albicans*. A actividade bacteriana dos óleos essenciais isolados a partir das folhas destas espécies, foram testadas com duas bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e uma bactéria gram-negativas (*Salmonella spp*). As cadeias do *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* são mais susceptíveis aos óleos essenciais do *Thymus albicans* do que o óleo essencial do *Thymus mastichina*. Em contraste, a *Salmonella spp* é mais susceptível para os óleos essenciais *Thymus mastichina*. Estas diferenças podem ser explicadas pela diferente composição de ambos os óleos essenciais. Noutro estudo, os óleos essenciais isolados a partir das partes aéreas de floração do *Thymus mastichina* (colhido em duas regiões geográficas diferentes: Algarve e Estremadura), foram avaliados contra três bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella spp*), contra duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e contra uma levedura (*Candida albicans*). Os microrganismos testados, mostraram susceptibilidades diferentes para os óleos essenciais do *Thymus mastichina*. A *Escherichia coli* e o *Staphylococcus aureus* mostraram ser mais susceptível para o óleo das folhas do *Thymus mastichina* de ambas a regiões. A *Salmonella spp* foi também susceptível aos óleos essenciais das folhas do *Thymus mastichina* mas do Algarve. Este estudo mostrou que o óleo das folhas do *Thymus mastichina* teve as maiores actividades contra a *Escherichia coli* [Figueiredo *et al*, 2008].

1.12. Antibióticos antibacterianos:

O termo antibiótico foi criado por Waksman em 1942 para denominar todos os compostos naturais produzidos por microrganismos, que inibem o crescimento microbiano ou que têm efeito microbicida. Para serem usados na terapêutica estes compostos não devem ter efeitos deletérios significativos sobre o hospedeiro infectado. Os antibióticos antibacterianos são produzidos por actinomicetes, fungos e bactérias [Sousa, 2006].

1.12.1. Penicilina G:

Em 1928, Alexander Fleming descobre um fungo *Penicillium notatum* produtor de uma substância, penicilina, com propriedades antibacterianas. A penicilina G é produzida inicialmente por *Penicillium notatum* e actualmente, em larga escala, por mutantes de *Penicillium chrysogenum*. Esta penicilina é a benzilpenicilina. Ela pode apresentar-se sob a forma de sal sódico ou potássico os quais se apresentam como pós secos moderadamente hidrocópicos, o que obriga à sua conservação em ambiente isento de humidade. O calor inactiva estes antibióticos pelo que a sua esterilização é feita por intermédio de radiações ou por meio de gases, como o óxido de etileno [Sousa, 2006].

Segundo o seu espectro antibacteriano, a penicilina G é praticamente sem actividade contra bactérias Gram-negativas. É activa contra *Staphylococcus spp* β -lactamase (-), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, outros *Streptococcus spp*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Treponema pallidum*, *Neisseria spp*, e *Haemophilus influenzae* β -lactamase (-). Este antibiótico actua inibindo a síntese do peptidoglicano [Sousa, 2006].

1.12.2. Gentamicina:

A gentamicina é produzida naturalmente por *Micromonospora purpúrea* e é constituída por vários produtos, contendo as formas farmacêuticas injectáveis, aproximadamente, iguais proporções de gentamicina C₁, C_{1a} e C₂, com potência similar [Sousa, 2006].

Segundo o seu espectro antibacteriano, a gentamicina é um antibiótico de largo espectro, activo contra *Staphylococcus aureus* e bacilos Gram-negativos, incluindo a *Pseudomona aeruginosa*. Contra estirpes bacterianas susceptíveis, a gentamicina é geralmente mais eficaz que os outros aminoglicosídeos. Por exemplo, a gentamicina é cerca de 4 vezes mais activa que a estreptomina e a amicacina contra *Staphylococcus aureus*. Tem moderada actividade contra *Streptococcus spp.* A gentamicina e a penicilina actuam sinergicamente contra *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Contudo, a gentamicina é cerca de 5 vezes menos activa que a tobramicina contra estirpes de *Pseudomona aeruginosa*. Em virtude da sua larga utilização terapêutica tem-se assistido a um número crescente de estirpes bacterianas resistentes à gentamicina. Quando a resistência bacteriana é devida à produção de enzimas modificadores, a maioria das estirpes resistentes à gentamicina são susceptíveis à amicacina e à isepamicina. Quando as estirpes bacterianas exibem impermeabilidade à gentamicina, manifestam geralmente o mesmo efeito sobre todos os outros aminoglicosídeos, sendo por isso, geralmente, resistente a todos os aminoglicosídeos-aminociclitolis [Sousa, 2006].

2 – OBJETIVOS

O principal objectivo deste trabalho foi determinar a actividade antibacteriana dos óleos essenciais *Guaiaco wood* (e *Bulnesol*), *Schinus molle*, *Lavandula luisieri* (obtido das folhas e das flores), *Mentha cervina*, *Lippia alba* e *Thymus mastichina* contra estirpes Gram-negativas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella spp* (estirpe selvagem obtida a partir de um ensaio clínico de uma coprocultura) e uma estirpe Gram-positiva de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), utilizando o método de difusão em agar com cavidades cilíndricas (poços) para a determinação dos halos de inibição, o método de macrodiluição para a determinação das CMI e CMB e o teste em placa para a determinação do efeito de vapor.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Óleos essenciais:

Os óleos essenciais usados para os ensaios de actividade antibacteriana foram:

- ↳ O óleo de *Bulnesia sarmientoi* (guaiaco wood e bulnesol) (óleo comercial obtido por extracção com vapor de água da madeira de *Bulnesia sarmientoi* e proveio da região do Chaco, Paraguai);
- ↳ O *Schinus molle* (óleo obtido dos extractos das folhas por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger; proveio da zona de Santa Fé, Argentina);
- ↳ O óleo de *Lavandula Luisieri* obtido dos extractos das flores e também das folhas (óleo obtido por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger proveio da zona de Malcata – Serra de Malcata);
- ↳ A *Lippia alba* (óleo obtido dos extractos das folhas por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger; proveio da zona de Santa Fé, Argentina);
- ↳ A *Mentha cervina* (óleo obtido dos extractos das folhas+flores por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger; proveio da zona de Castelo Branco);
- ↳ O *Thymus mastichina* (óleo obtido dos extractos das folhas+flores por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger; proveio da zona de Castelo Branco).

As plantas que dão origem aos óleos foram recolhidas na época de floração de cada zona. Estes óleos essenciais foram gentilmente cedidos pelo Prof. Jesus M. Rodilla e pela Prof^a Lúcia Silva, da Universidade da Beira Interior.

3.2. Microrganismos:

Os organismos testados foram o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a *Escherichia coli* (ATCC 25922) provenientes da American Type Culture Collection (ATCC) e uma estirpe selvagem de *Salmonella spp*, obtida de uma coprocultura, no laboratório de análises clínicas Brito Rocha Lda. As culturas puras de cada microrganismo que se testou, foram mantidas em slant (preparado no laboratório) no meio Muller-Hinton Agar (MHA) (Ref. 784397 - OXOID LTD).

3.3. Meios de cultura:

Para os ensaios da actividade antibacteriana, os meios de cultura utilizados foram o MH2 (Ref. 43301; MH2 – BioMérieux SA) e o caldo Muller-Hinton Broth (MHB) (Ref. 724245 - OXOID LTD). O meio MH2 é um meio que já se encontra preparado em placas e que possui 4 mm de espessura. A preparação do meio MHB foi feita de acordo com as instruções do fabricante. No método de diluição em caldo pela técnica de macrodiluição para a determinação da CMI e da CMB, utilizou-se o meio MHB suplementado com 5% de DMSO, para possibilitar uma melhor solubilização do óleo com o meio. A posterior contagem de colónias foi feita no meio sólido MH2. Para o teste do efeito do vapor dos óleos essenciais, utilizou-se também o agar MH2.

3.4. Preparação da densidade do inóculo:

Como a densidade do inóculo influencia o resultado dos ensaios, então padronizou-se a quantidade de inóculo a ser utilizada, a fim de assegurar a reprodutibilidade analítica.

Após recuperação das estirpes liofilizadas da ATCC, seguindo as instruções do fabricante, e da estirpe selvagem *Salmonella spp* (colónias puras guardadas em slant de MHA), inocularam-se pelo método de estrias, três placas de MH2 (uma para cada microrganismo). Incubou-se a $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ / 18-24 h.

De modo a obter-se um inóculo correspondente a uma concentração bacteriana aproximada de 5×10^5 UFC/ml, procedeu-se do seguinte modo:

3.4.1. Método de difusão em agar:

Retiraram-se algumas colónias do microrganismo a testar para 5 ml do caldo MHB, de modo a obter uma turvação correspondente ao padrão de McFarland de 0,5 (10^8 UFC/ml, num comprimento de onda de 550 nm, $T \cong 74,9\%$, $A \cong 0,125$). Como branco usou-se o caldo MHB (transmitância de 100%). De seguida, diluiu-se a suspensão de 10^8 UFC/ml para 10^6 UFC/ml. Esta última suspensão bacteriana foi

diluída a metade, de modo a obter a concentração bacteriana pretendida de 5×10^5 UFC/ml de acordo com a norma M02-A10 da CLSI.

Utilizou-se sempre como solução de diluição o meio MHB.

Todo este processo foi realizado em câmara de segurança biológica de modo a garantir o máximo de condições de esterilidade.

3.4.2. Método de Macrodiluição – Determinação da MIC e da MBC:

Procedeu-se do mesmo modo que para o método de difusão em agar, com as seguintes alterações:

- ↳ O meio líquido usado para o acerto da concentração bacteriana de 5×10^5 UFC/ml foi o MHB suplementado com 5% de DMSO;
- ↳ O Branco foi o meio líquido MHB suplementado com 5% de DMSO.

3.5. Avaliação da actividade antibacteriana:

A avaliação da actividade antimicrobiana foi realizada através do método de difusão em agar com perfuração do agar, de modo a obter cavidades cilíndricas (poços) com uma altura aproximada de 4 mm e diâmetro de 5 mm. Este método permite-nos ter uma ideia da potencial actividade antimicrobiana do óleo essencial em estudo, através da leitura dos halos de inibição com um microscópio estereoscópico.

Como controlos positivos, utilizaram-se os antibióticos penicilina G na concentração de 0,05 mg/ml (acção contra Gram-positivos), da Sigma-Aldrich, e gentamicina na concentração de 10 mg/ml (acção de largo espectro), da Sigma-Aldrich. Como controlo negativo foi utilizado o DMSO, Fisher Scientific.

Para óleos essenciais que apresentaram halo de inibição pela técnica de difusão em agar, procedeu-se de seguida à determinação do CMI e CMB pela técnica de macrodiluição em caldo MHB + 5% DMSO. Como controlo positivo utilizou-se o caldo MHB + 5% DMSO inoculado e sem o óleo essencial. Como controlo negativo (esterilidade), utilizou-se o caldo MHB + 5% DMSO, sem inóculo, e com o óleo essencial.

3.5.1. Procedimento do método de difusão em agar pela técnica do poço:

Para este procedimento, seguiu-se a metodologia de difusão em agar com o uso de discos proposta pela CLSI (M02-A10), mas em vez de usarmos discos estéreis de papel, perfurou-se o agar de modo a obter cilindros com aproximadamente 4 mm de altura e 5 mm de diâmetro. O inóculo utilizado foi de aproximadamente de 5×10^5 UFC/ml.

O protocolo prático foi realizado do seguinte modo:

A partir do inóculo do microrganismo a testar, espalhou-se uniformemente com um swab (zaragatoa) estéril sobre a placa de agar MH2 (tendo o cuidado de pressionar o swab contra a parede do tubo, de modo a eliminar o excesso de inóculo). Deixou-se em repouso durante 15 minutos de modo a que o meio de cultura absorva o inóculo. De seguida, os poços foram confeccionados com um dispositivo de modo a obter poços de 5,0 mm de diâmetro e 4 mm de altura. Posteriormente, os poços foram completamente preenchidos com 70 μ L dos óleos essenciais a serem testados, do controle negativo e do controle positivo. Após um período de repouso de 15 minutos à temperatura ambiente, o que permite a difusão dos óleos, controle negativo e positivo, as placas foram incubadas a uma temperatura média de 37 °C durante 18-24 h. Após este período de incubação, foram anotados os resultados. Os ensaios foram realizados em triplicado (sempre que possível) para cada óleo e estirpe utilizadas(os). Todo este processo foi realizado em condições de esterilidade.

3.5.2. Procedimento do método dos vapores:

A técnica seguida para o estudo do efeito dos vapores dos óleos essenciais nos microrganismos a testar baseou-se na metodologia proposta por Lisin et al. (1999).

O protocolo prático foi realizado do seguinte modo:

Espalhou-se uniformemente com um swab estéril o inóculo do microrganismo a testar sobre a placa de agar MH2. Deixou-se em repouso durante 15 minutos de modo a que o meio de cultura absorva o inóculo. De maneira a realizar um teste comparativo (volume de óleo a testar) com o método de difusão em agar, adicionou-se 70 μ l do óleo no centro da tampa da placa de Petri a uma distância de aproximadamente 1 cm do agar inoculado. Inverteu-se a placa e deixou-se a incubar a uma temperatura média de 37 °C

durante 18-24 h. Ao fim do período de incubação, anotou-se o efeito do óleo no crescimento bacteriano. Processo realizado em condições estéreis.

3.5.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB) pela técnica da macrodiluição em caldo:

A determinação CMI e da CMB foi adaptada da técnica de macrodiluição, de acordo com a metodologia M07-M8, proposta pelo CLSI.

3.5.3.1. Diluições consecutivas de 1:2 dos óleos essenciais da *Lavandula luisieri* (das folhas e das flores):

Prepararam-se 4 tubos estéreis. No tubo 1 (tubo inicial) colocou-se 0,5 ml do inoculo 5×10^5 UFC/ml preparado em caldo MHB + 5% DMSO e 0,4 ml do caldo MHB + 5% DMSO. Nos tubos nº 2, 3 e 4 adicionou-se 0,5 ml do inoculo 5×10^5 UFC/ml (preparado em MHB + 5% DMSO). De seguida, no tubo nº1, adicionou-se 0,1 ml do óleo essencial a testar perfazendo-o num volume total de 1 ml. Homogeneizou-se no vortex, e transferiu-se 0,5 ml para o tubo nº 2. Realizaram-se deste modo as diluições consecutivas de 1:2 até ao tubo nº 4 (neste ultimo descartou-se 0,5ml). Todos os tubos (incluindo o controlo positivo e controlo negativo) foram a incubar com agitação (incubadora orbital, 125 rpm) durante 18-24 h à temperatura de aproximadamente 37 °C. Após o tempo de incubação, os tubos foram visualmente examinados. De seguida, inoculou-se 0,1 ml de cada tubo pelo método de espalhamento em placas de Petri com o meio de cultura MH2. Incubou-se a aproximadamente 37 °C durante 18-24 h e procedeu-se à contagem das colónias. Todos os ensaios foram realizados em câmara de segurança biológica, em condições estéreis e em triplicado (ver figura 17 na página seguinte).

3.5.3.2. Diluições consecutivas de 1:2 dos óleos essenciais da *Thymus mastichina*:

Procedeu-se do mesmo modo que para o ponto anterior, com a seguinte alteração:

- ↳ No tubo n^o1, adicionou-se 0,125 ml do óleo essencial de *Thymus mastichina*.

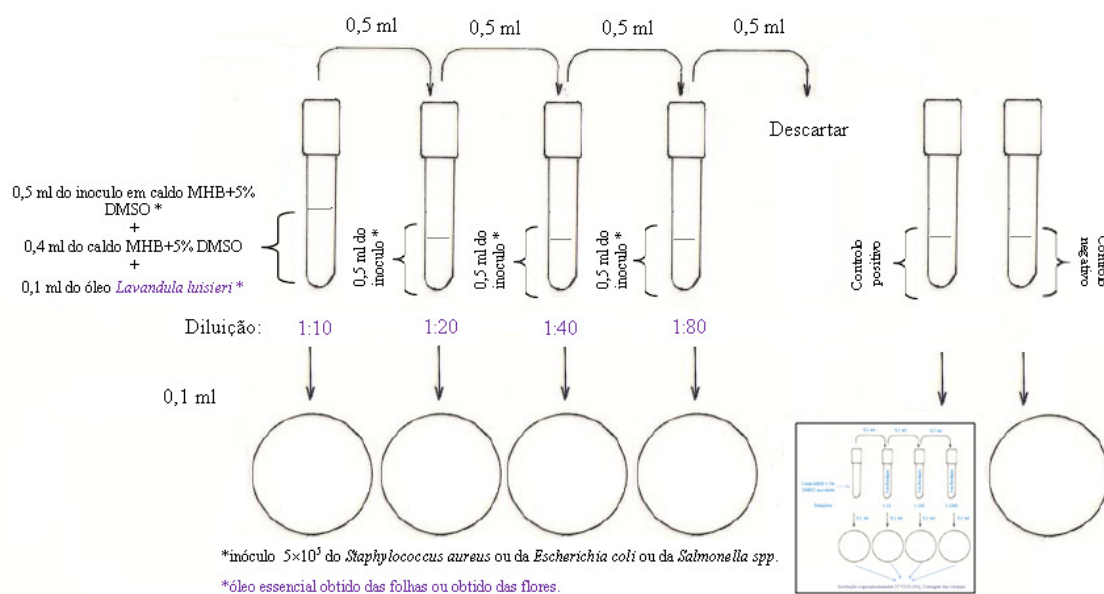


Figura 17 – Esquema de representação do ensaio das diluições consecutivas de 1:2 dos óleos essenciais da *Lavandula luisieri*, para a determinação da CMI e da CMB.

3.5.3.3. Controlo positivo e do inóculo (tubo n^o5):

O controlo positivo é constituído apenas pelo caldo MHB + 5% DMSO inoculado. Em todos os casos, após o período de incubação, a concentração bacteriana do controlo positivo foi confirmada do seguinte modo:

A partir do tubo nº5, realizaram-se 3 diluições de 1:10 em soro fisiológico estéril, e inoculou-se 0,1 ml de cada diluição por espalhamento no meio MH2. Incubou-se cada placa a aproximadamente 37 °C durante 18-24 h. Procedeu-se à contagem das colónias em cada placa. Deste modo confirmou-se a concentração do inoculo que variou entre 10^5 UFC/ml e 10^6 UFC/ml.

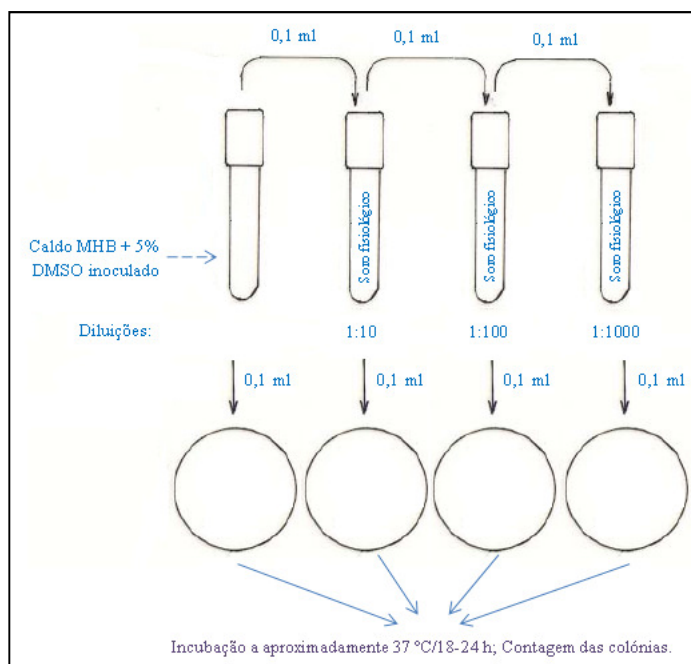


Figura 18 – Esquema de representação do ensaio com o controlo positivo para a confirmação da concentração do inoculo.

3.5.3.4. *Controlo negativo (tubo nº6):*

O tubo nº6 corresponde ao controlo negativo, ou de esterilidade, e é constituído por 0,1 ml do óleo essencial e 0,4 ml do caldo MHB + 5% DMSO. A confirmação da esterilidade foi feita por cultura em placa.

3.5.4. **Ensaio realizado:**

As metodologias usadas nesta tese tiveram como base uma vasta consulta bibliográfica, de onde constatámos uma grande variedade de técnicas utilizadas. As metodologias apresentadas nesta tese tiveram como suporte muitos ensaios experimentais que aqui não são descritos e que possibilitaram a optimização (no nosso entender) prática.

3.6. Análise estatística:

A análise dos dados foi realizada usando o programa GraphPad Prism 5.0. Um valor de probabilidade de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição dos óleos essenciais:

O óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi* é um óleo comercial que foi obtido por extracção com vapor de água da madeira. Os restantes óleos essenciais testados foram obtidos por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger.



Figura 19 – Colector de destilação segundo a Farmacopeia Europeia. Destilador Clevenger [Alquézar e Coloma, 2009].

A composição, de cada óleo extraído da planta, foi adquirida através do método de espectrometria de massa.

Os dados da composição e informações referentes à extracção e análise dos óleos essenciais testados, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Jesus M. Rodilla e pela Prof^a Lúcia Silva, da Universidade da Beira Interior.

4.1.1. **Óleo de *Bulnesia sarmientoi*:**

Na tabela 1 encontram-se indicados os 36 componentes identificados do óleo essencial de *Bulnesia sarmientoi*, representando um total de 82,89 % do óleo. Os componentes maioritários deste óleo essencial são o Guaiaco (20,44%) e o Bulnesol (34,72%) (Tabela 1). Estes dois componentes foram testados em conjunto para a determinação da sua actividade antibacteriana, contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp*, por serem os compostos maioritários deste óleo essencial.

Tabela 1 – Composição dos óleos essencial de *Bulnesia sarmientoi*.

			<i>Continuação</i>		
	Componentes	%		Componentes	%
1	<i>α-Guaieno</i>	0,2	19	<i>10-epi-γ-eudesmol</i>	1,32
2	<i>β-Caryophylleno</i>	0,1	20	Álcool	0,37
3	<i>Sesquiterpene oxide</i>	1,21	21	<i>γ-Eudesmol</i>	2,58
4	<i>Sesquiterpene oxide</i>	0,44	22	NI	0,23
5	<i>β-Guaieno</i>	0,13	23	Alcohol	0,68
6	NI	0,45	24	Alcohol	0,1
7	<i>Guaioxide</i>	0,55	25	<i>α-Eudesmol</i>	3,68
8	<i>α-Bulneseno</i>	1,1	26	Alcohol	0,88
9	<i>Sesquiterpene oxide</i>	0,5	27	<i>7-epi-α-Eudesmol</i>	3,25
10	<i>Sesquiterpene oxide</i>	0,15	28	<i>(-)-Hanamyol</i>	2,51
11	<i>Sesquiterpene oxide</i>	0,18	29	<i>Bulnesol</i>	34,72
12	<i>Elemol</i>	0,55	30	<i>Bulnesol isomer</i>	0,8
13	<i>Germacrene-B</i>	0,31	31	Alcohol	0,4
14	<i>Guaiaco</i>	20,44	32	Alcohol	0,3
15	Álcool	0,8	33	Alcohol	0,1
16	<i>Eudesm-5-en-11-ol</i>	0,70	34	NI	0,18
17	<i>β-Eudesmol</i>	1,25	35	<i>Hanamyol Isomer</i>	0,58
18	<i>Guaiaco isomer</i>	1,2	36	<i>Hanamyol Isomer</i>	0,13
			Total		82,89

4.1.2. Óleo de *Schinus molle*:

Foram identificados 28 componentes do óleo essencial *Schinus molle*, dos quais o Sabineno (39,27%) e o β -pineno (39,27%) são os maioritários num total de 91,63% do óleo essencial (Tabela 2).

Estudos anteriores demonstraram que o β -pineno e também o Sabineno pertencem aos compostos maioritários do óleo essencial de *Schinus molle*. Mas existe uma grande variação dos compostos maioritários consoante os factores ambientais (altitude, temperatura, luminosidade, solo, interacções animais-plantas e plantas-

plantas) e dos factores antrópicos que a planta é sujeita, o que pode exercer variações nas rotas metabólicas das plantas [Santos *et al.*, 2007].

Tabela 2 – Composição do óleo essencial de *Schinus molle*.

			Continuação		
	Componentes	%		Componentes	%
1	<i>thujeno</i>	1,48	16	<i>β-elemeno</i>	1,97
2	<i>α-pineno</i>	5,32	17	<i>β-cariofileno</i>	3,84
3/4	<i>Sabineno + β-pineno</i>	39,27	18	<i>α-humuleno</i>	0,52
5	<i>mirceno</i>	1,72	19	<i>alloaromadendreno</i>	0,85
6	<i>α-terpineno</i>	1,34	20	<i>germacreno-D</i>	7,06
7	<i>orto-cymol (o-cymeno)</i>	1,46	21	<i>β-selineno</i>	0,54
8	<i>L-limoneno</i>	4,18	22	<i>germacreno-B</i>	3,87
9	<i>γ-terpineno</i>	2,39	23	<i>α-muuroleno</i>	0,35
10	<i>cis-sabinol</i>	0,16	24	<i>germacreno-A</i>	0,6
11	<i>α-terpinoleno</i>	0,51	25	<i>γ-cadineno</i>	1,22
12	<i>um álcool (no identificado)</i>	0,42	26	<i>δ-cadineno</i>	1,14
13	<i>terpinen-4-ol</i>	5,5	27	<i>espathulenol</i>	3,91
14	<i>α-terpineol</i>	0,62	28	<i>óxido de cariofileno</i>	1,02
15	<i>α-copaeno</i>	0,37		Total	91,63

4.1.3. Óleo de *Lippia alba*:

Em 26 compostos identificados no óleo essencial de *Lippia alba*, o L-linalool (38,48%) e o Isómero da dihidrocarvona (18,94%), são os compostos maioritários de 95,56% no total do óleo essencial (Tabela 3).

Segundo estudos realizados sobre a planta de *Lippia alba*, provenientes de vários locais, indicam que a carvona e o limoneno são dois dos compostos maioritários do óleo essencial da mesma¹¹. Uma análise da composição do óleo essencial de *Lippia alba* realizada por Bahl *et al.*, em 2000, para plantas cultivadas na Índia, mostrou que nessas

plantas o maior constituinte do óleo essencial (65%) foi o linalool. O linalool também foi referido por Mallavarapu *et al.* (2000), como o componente maioritário do óleo essencial das folhas de *Lippia alba*, entre os 38 componentes identificados no estudo. Os autores referiam que sendo o linalool presente em grande concentração, as folhas da planta podem ser consideradas como uma boa fonte de monoterpene alcoólico com valor aromático para perfumes e sabores de alimentos [Aguiar e Costa, 2005].

A composição química da *Lippia alba*, pode ser relacionada com a composição dos óleos essenciais com aspectos agronómicos, tais como, cultivo das plantas a sombra ou ao sol, época de colheita e avaliação do rendimento do óleo essencial em diferentes épocas do ano [Aguiar e Costa, 2005].

Tabela 3 – Composição do óleo essencial de *Lippia alba*.

			Continuação		
	Componentes	%	Componentes	%	
1	<i>sabineno</i>	0,16	14	<i>germacreno-D</i>	0,52
2	<i>1-octen-3-ol</i>	0,15	15	<i>β-elemeno</i>	2,66
3	<i>mirreno</i>	0,29	16	<i>β-cariofileno</i>	5,26
4	<i>L-limoneno</i>	3,55	17	<i>germacreno-B</i>	1,63
5	<i>1,8-cineol</i>	1,5	18	<i>α-humuleno</i>	0,64
6	<i>cis-ocimeno</i>	0,12	19	<i>trans-cariofileno</i>	0,1
7	<i>trans-β-ocimeno</i>	0,49	20	<i>(z)-β-farneseno</i>	0,99
8	<i>óxido de linalool</i>	0,13	21	<i>β-cubeneno</i>	3,86
9	<i>L-linalool</i>	38,48	22	<i>γ-elemeno</i>	1,3
10	<i>dihidrocarvona</i>	7,96	23	<i>nerolidol</i>	0,53
11	<i>isómero da dihidrocarvona</i>	18,94	24	<i>δ-cadinol</i>	3,19
12	<i>acetato de sabinilo</i>	0,57	25	<i>óxido de cariofileno</i>	1,2
13	<i>α-copaeno</i>	0,54	26	<i>no identificado</i>	0,8
			Total	95,56	

4.1.4. Óleo da *Lavandula luisieri*:

No óleo essencial de *Lavandula luisieri* foram identificados 25 componentes, num total de 75,28% do óleo essencial. O Acetato de Trans- α -Necrodilo (23,98 %) e a Fenchona (10,94%) foram os compostos maioritários identificados do óleo essencial (Tabela 4).

Como já se referiu, o óleo essencial de *Lavandula luisieri* tem uma composição atípica, única no reino vegetal. Pode-se verificar na tabela 4 que o óleo da *Lavandula luisieri*, que foi proveniente da Serra da Malcata, possui uma série de compostos com uma estrutura de 1,2,2,3,4-pentamethylcyclopentane (necrodano), o que sugere um papel de defesa potencial da planta por estes compostos [Sanz *et al*, 2004;^{12,13}].

A Fenchona, aparece como sendo um dos compostos maioritários do óleo essencial de *Lavandula luisieri* ou então pode aparecer em baixas concentrações deste mesmo óleo. Na espécie *Lavandula*, é considerado com um dos componentes principais [Sanz *et al*, 2004].

Tabela 4 – Composição do óleo essencial de *Lavandula luisieri*.

			Continuação		
	Componentes	%	Componentes	%	
1	<i>p-cymeno</i>	1.09	14	<i>Acetato de cis-necrodilo</i>	4.34
2	<i>1,8-cineol</i>	1.27	15	<i>Acetatos de Necrodilo</i>	1.70
3	<i>Uma ciclohexenona</i>	1.80	16	<i>Acetato de γ-terpenilo</i>	0.69
4	<i>Fenchona</i>	10.94	17	<i>C₁₀H₁₈O₃ ?</i>	1.83
5	<i>linalool</i>	1.94	18	<i>(-) Isoledeno ?????</i>	-----
6	<i>Alcanfor</i>	3.19	19	<i>210 (168-125-107-43)</i>	0.80
7	<i>X150Isom</i>	1.09	20	<i>β-cariofileno</i>	0.73
8	<i>Trans-α-Necrodilo</i>	1.44	21	<i>β-Selineno</i>	0.46
9	<i>Epi-β-Necrodilo</i>	1.56	22	<i>δ-Cadineno</i>	0.77
10	<i>Lavandulol</i>	1.08	23	<i>Oxido de cariofileno</i>	0.90
11	<i>X150</i>	4.57	24	<i>viridiflorol</i>	4.79
12	<i>C₁₀H₁₆O₂</i>	2.21	25	<i>Globulol</i>	2.11
13	<i>Acetato de Trans-α-Necrodil</i>	23.98	Total 75,28		

4.1.5. Óleo de *Mentha cervina*:

Foram identificados 21 componentes do óleo essencial de *Mentha cervina*, sendo o Pulegona (80,4%) o composto maioritário, num total de 99,4% do óleo essencial (Tabela 5). Este óleo essencial é composto, quase na sua totalidade, pelo componente maioritário, o pulegona.

Análises químicas anteriores, demonstraram que a pulegona pertence aos principais componentes presentes no óleo essencial de *Mentha cervina* [Silva *et al*, 2009; Gonçalves *et al*, 2007].

Tabela 5 – Composição do óleo essencial de *Mentha cervina*.

			<i>Continuação</i>		
	Componentes	%		Componentes	%
1	<i>α</i> -Pinene	0,4	12	<i>Menthone</i>	1,6
2	<i>Camphene</i>	t	13	<i>Isomenthone</i>	8,9
3	<i>β</i> -Pinene	0,3	14	<i>cis-p-Menth-2-en-1-ol</i>	0,6
4	<i>Sabinene</i>	t	15	<i>trans-isopulegona</i>	0,4
5	<i>α</i> -Phelandrene	0,4	16	<i>cis-isopulegona</i>	0,7
6	<i>Limoneno</i>	3,3	17	<i>E-Caryophyllene</i>	0,3
7	<i>1,8-Cineole</i>	0,1	18	<i>Pulegona</i>	80,4
8	<i>Z-b-Ocimene</i>	0,2	19	<i>Piperitenone</i>	0,7
9	<i>E-b-Ocimene</i>	0,1	20	<i>Caryophyllene oxyde</i>	t
10	<i>p-Cymene</i>	t	21	<i>Eugenol</i>	0,3
11	<i>3-Octanol</i>	0,7		Total	99,4

t = vestígios

4.1.6. Óleo de *Thymus mastichina*:

Dos 49 compostos identificados do óleo de *Thymus mastichina*, o 1-8 Cineole (8,63%) é o composto maioritário, dos 39,18 % do total do óleo essencial (Tabela 6). Outros compostos também se podem destacar para este óleo essencial de *Thymus mastichina*, tais como o α -Pinoeno (2,07%), o β – Pinoeno (2,92%), o Linalool (2,61%) e o Mircenol (2,28%) e o p-Ment-1-en-8-ol (3,22%) comparativamente com os outros componentes existentes.

A composição dos óleos essenciais isolados a partir das partes aéreas da *Thymus mastichina* está de acordo com o que alguns autores relatam para algumas espécies de Portugal. Estes autores referem três tipos de óleo principais, de acordo com os componentes maioritários presente nestes óleos: o 1-8 Cineole, o linalool e o 1-8 Cineole/Linalool. Segundo estes autores, o Linalool e o 1-8 Cineole/Linalool são somente encontrados em plantas provenientes da Estremadura (Portugal) [Faleiro *et al*, 2003]. Pode-se sugerir que o Linalool não se encontra somente na composição dos óleos essenciais provenientes da Estremadura (Portugal), mas também noutras zonas, tais como a de Castelo Branco, já que o óleo essencial utilizado nos testes de actividade antibacteriana proveio dessa mesma zona.

Tabela 6 – Composição do óleo essencial de *Thymus mastichina*.

			Continuação		
	Componentes	%			
1	<i>Hex-2-enal</i>	0,05	25	<i>3-Metil-hepta-1,6-dien-3-ol</i>	1,48
2	<i>α-Tujeno</i>	0,12	26	<i>Mirtenal</i>	0,1
3	<i>α-Pineno</i>	2,07	27	<i>Mircenol</i>	2,28
4	<i>Canfeno</i>	0,93	28	<i>Mirtenol</i>	0,47
5	<i>Sabineno</i>	0,72	29	<i>p-Ment-1-en-8-ol</i>	3,22
6	<i>β – Felandreno</i>	0,47	30	<i>Formiato de isobornilo</i>	0,23
7	<i>β – Pineno</i>	2,92	31	<i>Cefrol</i>	0,07
8	<i>β – Mirceno</i>	1,02	32	<i>Nerol</i>	0,26
9	<i>Octan-3-ol</i>	0,05	33	<i>Geraniol</i>	0,21
10	<i>1-8 Cineol</i>	8,63	34	<i>Acetato de Bornilo</i>	0,11
11	<i>β – Cis – Ocimeno</i>	1,02	35	<i>Acetato de nerilo</i>	0,05
12	<i>α – Terpineno</i>	0,4	36	<i>Propionato de Isobornilo</i>	0,03
13	<i>β – Cis – Terpineol</i>	0,29	37	<i>Acetato de Geraniol</i>	0,06
14	<i>Terpinoleno</i>	0,06	38	<i>Cariofileno</i>	0,52
15	<i>2-Careno</i>	0,1	39	<i>Aromadendreno</i>	0,06
16	<i>Óxido de linalol</i>	0,1	40	<i>Propionato de Geranilo</i>	0,15
17	<i>Etanoato de non-3-enilo</i>	0,05	41	<i>γ-Elemeno</i>	0,43
18	<i>Linalol</i>	2,61	42	<i>Elemol</i>	0,86
19	<i>β-Pinona</i>	0,05	43	<i>Butirato de Geranilo</i>	0,2
20	<i>L- Pinocarveol</i>	0,13	44	<i>Óxido de Cariofileno</i>	0,18
21	<i>Cânfora</i>	1,05	45	<i>Viridifloral</i>	0,42
22	<i>Pinocarvona</i>	0,12	46	<i>Globulol</i>	1,16
23	<i>Borneol</i>	0,51	47	<i>γ-Eudesmol</i>	0,12
24	<i>4- Terpineol</i>	1,91	48	<i>α-Eudesmol</i>	0,32
			49	<i>Eudesm-7(11)-en-4-ol</i>	0,81
			Total		38,18

4.2. Actividade antibacteriana dos óleos essenciais:

A determinação da actividade antimicrobiana, dos óleos essenciais contra os microrganismos testados, foi realizada através de três métodos: o método de difusão em agar, pela técnica do poço, o método de difusão em vapor e o método das diluições pela técnica de macrodiluição para determinação das CMI e das CMB, que estão descritos anteriormente (ponto 3.5).

Na técnica de difusão em agar, após as 18-24h de incubação das placas com os microrganismos e óleos a serem testados, foram feitas as medições dos halos de inibição. Os resultados foram obtidos medindo o comprimento das extremidades do halo de acordo com o representado na figura (figura 21). A figura 20, mostra a não existência de inibição bacteriana, já na figura 21 verifica-se inibição do crescimento bacteriano, evidenciando um halo de inibição uniforme.

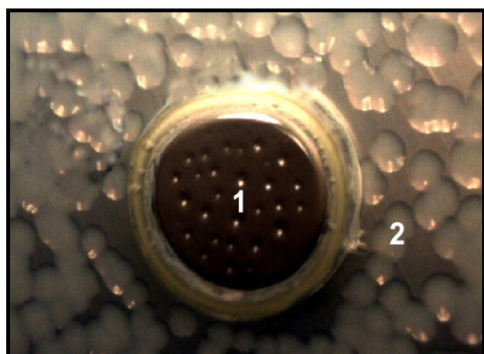


Figura 20 – Resultado do ensaio com o óleo essencial guaiaco + bulnesol contra o *Staphylococcus aureus*, pela técnica dos poços. Em 1, poço com 70 µl de óleo essencial; e em 2, crescimento bacteriano após 18-24h de incubação a uma temperatura de 37 °C.

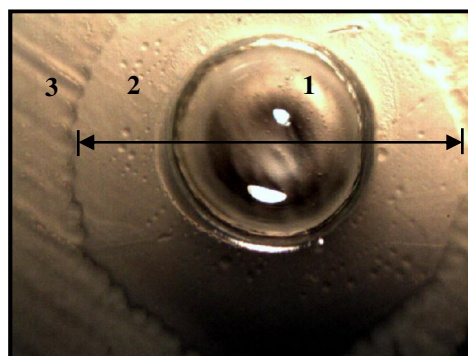


Figura 21 – Resultado do ensaio com o óleo essencial *Lippia alba* contra o *Salmonella spp*, pela técnica dos poços. Em 1, poço com 70 µl de óleo essencial; em 2, halo de inibição bacteriana; e em 3, crescimento bacteriano após 18-24h de incubação a uma temperatura de 37 °C.

No método dos vapores, os resultados foram adquiridos segundo a medição do halo de inibição bacteriana, provocado pelos vapores dos óleos essenciais. Esta medição foi feita do mesmo modo que para os halos de difusão em agar (figura 22).

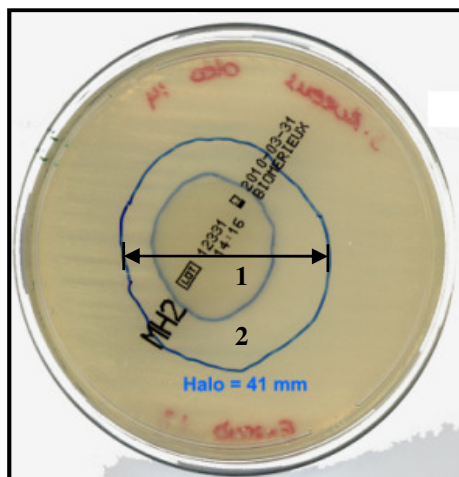


Figura 22 – Resultado do ensaio com o óleo essencial *Lavandula luisieri* dos extractos das flores contra o *Staphylococcus aureus*, pelo método de vapor. Em 1, dispersão de 70 µl do óleo colocado na tampa da placa de Petri após 18h/37°C; e em 2, inibição bacteriana, medição do halo de inibição.

Segundo o método de diluição em caldo, macrodiluição, os resultados foram obtidos através de observação visual dos tubos, verificando a turbidez dos tubos nas diferentes diluições do óleo essencial, e da contagem de UFC nas placas de Petri, para se determinar as CMI e as CMB dos óleos essenciais testados.

4.2.1. Halos de inibição pelo método dos vapores:

De modo a testar a acção dos óleos essenciais nas estirpes seleccionadas, nomeadamente, de forte inibição, inibição moderada, fraca inibição ou sem inibição, seguiram-se os critérios dos halos de inibição, abaixo descritos, classificando os microrganismos como:

↳ Sensíveis – quando o diâmetro do halo de inibição é igual a ± 3 mm que o halo de inibição do controlo positivo [Ostrosky *et al*, 2008];

↳ Moderadamente sensíveis – quando o halo de inibição é maior que 2 mm, mas menor que ± 3 mm que o halo de inibição do controlo positivo [Ostrosky *et al*, 2008];

↳ Resistentes – o diâmetro é igual ou menor que 2 mm [Ostrosky *et al*, 2008].

Portanto, tendo como controlos positivos os antibióticos Gentamicina (largo espectro) e a Penicilina G (Gram-positivos), e comparando os halos de inibição dos óleos essenciais testados com os halos dos antibióticos, sugere-se que o óleo essencial que mostrou maior efeito inibidor de vapor, relativamente à estirpe Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25922) foi o *Schinus molle*. O óleo *Lavandula luisieri* (extractos das folhas e flores) apresentou uma forte inibição contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 mas inferior a *Schinus molle*. Relativamente ao óleo *Lippia alba* consideramos que apresentou uma inibição moderada (se comparado com Penicilina G) ou forte (se comparado com Gentamicina) contra a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25922. Os óleos (*Guaiaco + Bulnesol*), *Mentha cervina* e *Thymus mastichina* não apresentaram qualquer efeito de vapor relativamente à estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25922.

Quanto à estirpe *Escherichia coli* ATCC 25923, o óleo *Lavandula luisieri* (folhas e flores) apresentou um forte efeito de vapor, enquanto que o óleo *Lippia alba* apresentou um efeito de vapor moderado. Os restantes óleos não apresentaram efeito de vapor relativamente a esta estirpe.

Nenhum óleo apresentou efeito de vapor, relativamente à estirpe *Salmonella spp.*

Tabela 7 – Halos de inibição da actividade antibacteriana do vapor dos óleos essenciais, *Schinus molle*, *Lippia alba*, *Lavandula luisieri*, *Mentha cervina*, *Thymus mastichina* e (*Guaiaco + Bulnesol*), contra os microrganismos testados, segundo o método dos vapores.

Microorganismos	Halos de inibição (mm)						
	<i>Schinus molle</i> (Extracto bruto)	<i>Lippia alba</i> (Extracto bruto)	<i>Lavandula luisieri</i> (Extracto bruto)		<i>Mentha cervina</i> (Extracto bruto)	<i>Thymus mastichina</i> (Extracto bruto)	<i>Guaiaco + Bulnesol</i> (Extracto bruto)
			Folhas	Flores			
<i>Escherichia coli</i>	0	20	31	30	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	FI	30	40	41	0	0	0
<i>Salmonella spp</i>	0	0	0	0	0	0	0

FI – Forte Inibição, placa de Petri sem crescimento.

Para os ensaios do efeito de vapor não foram realizados triplicados devido às limitações das quantidades desfavoráveis dos óleos essenciais.

4.2.2. Halos de inibição pela técnica do poço:

Seguindo os critérios dos halos de difusão referidos em 4.2.1., os óleos *Schinus molle*, *Lippia alba*, *Lavandula luisieri* (folhas) e *Lavandula luisieri* (flores) apresentaram forte inibição contra a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, o que está de acordo com os valores obtidos para os ensaios de vapor. O óleo essencial de *Mentha cervina* apresentou uma inibição moderada (se comparado com Penicilina G) ou forte (se comparado com Gentamicina) contra a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25922. De realçar que este óleo não apresentou efeito de vapor relativamente a esta estirpe. O óleo *Thymus mastichina* apresentou uma actividade moderada contra esta estirpe. O óleo (*Guaiaco* + *Bulnesol*) não apresentou actividade contra esta estirpe. Relativamente à estirpe *Escherichia coli* ATCC 25923, os óleos *Thymus mastichina* e *Mentha cervina*, foram os que apresentaram maior efeito (forte inibição). O óleo *Lippia alba* também apresentou um forte efeito inibidor mas menor que *Thymus mastichina* e *Mentha cervina*. Os óleos *Lavandula luisieri* (flores) e *Lavandula luisieri* (folhas) apresentaram um efeito inibidor moderado sobre *Escherichia coli* ATCC 25923, mas realçando um efeito inibidor ligeiramente maior para o óleo proveniente das flores. De realçar que para estes dois óleos foram utilizadas diluições superiores, comparativamente à *Lippia alba*, *Thymus mastichina* e *Mentha cervina*, o que em trabalhos futuros, seria interessante utilizar as mesmas concentrações de óleos (limitações devido à quantidade disponível de óleo), pois possivelmente, *Lavandula luisieri* (flores) e *Lavandula luisieri* (folhas) poderiam apresentar maiores halos de inibição. O extracto bruto de *Schinus molle* apresentou um fraco efeito inibidor relativamente a *Escherichia coli* ATCC 25923, estando de acordo com os valores obtidos nos ensaios de efeito de vapor. O óleo (*Guaiaco* + *Bulnesol*) não apresentou actividade contra esta estirpe. Quanto à estirpe de *Salmonella spp*, os óleos *Thymus mastichina* e *Mentha cervina* apresentaram efeitos inibidores moderados e semelhantes. *Lavandula luisieri* (flores) e *Lavandula luisieri* (folhas) apresentaram um efeito inibidor fraco/moderado, mas realçando um efeito inibidor ligeiramente maior para o óleo proveniente das flores. O óleo *Lippia alba* apresentou um efeito inibidor ligeiramente inferior a *Lavandula luisieri* (folhas). O óleo (*Guaiaco* + *Bulnesol*) não apresentou actividade contra esta estirpe.

Certamente que a actividade antibacteriana do óleo essencial de *Lavandula luisieri* pode ser explicada pelo óleo possuir na sua composição um composto com uma

estrutura de 1,2,2,3,4-pentamethylcyclopentane (necrodano), mais exactamente o Acetato de Trans- α -Necrodilo. A actividade biológica deste óleo perante a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, observada neste trabalho, coincide com o resultado obtido por Baldovini *et al.* (2005), o qual revelou ter actividades significativamente boas contra *Staphylococcus aureus*.

Segundo estudos realizados anteriormente, indicaram que a actividade do *Schinus molle* pode ser atribuída devido aos monoterpenos hidrocarbonados (compostos maioritários), uma vez que segundo Karock *et al.* (2007), estes compostos apresentam uma actividade de forte a moderada contra bactérias Gram-positivas e actividades mais débeis contra bactérias Gram-negativas. Estes dados coincidem com o presente trabalho.

Estudos sobre a *Thymus mastichina*, demonstraram que existe diferenças na actividade antibacteriana deste óleo, e que pode ser explicada pela diferente composição que o óleo pode apresentar devido à sua proveniência [Figueiredo *et al.*, 2008].

A actividade de todos estes óleos pode dever-se aos compostos maioritários que estão presentes em cada óleo essencial.

Tabela 8 – Halos de inibição da actividade antibacteriana dos extractos dos óleos essenciais, dos controlos positivos e do controlo negativo contra os microrganismos testados, pelo método de difusão em agar.

Produtos a testar	Concentração do produto (mg/70µl)	Difusão em placa - Halos de inibição (mm) -Triplificados								
		<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Salmonella spp</i>		
Controlo positivo: Gentamicina	0,1	24,2	24,0	24,0	29,0	29,0	29,2	24,2	24,0	24,1
Média / Mediana		24,07 / 24,00			29,07 / 29,00			24,10 / 24,10		
Controlo positivo: Penicilina G	0,0005	0,0	0,0	0,0	48,0	48,2	48,2	0,0	0,0	0,0
Média / Mediana		0			48,13 / 48,20			0		
Controlo negativo: DMSO	Sol. Concentrada	0,2	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,2	0,0	0,2
Média / Mediana		0,07 / 0,0			0,10 / 0,10			0,13 / 0,20		
Óleos essenciais										
<i>Guaiaco + Bulnesol</i>	Extracto bruto	11,0	11,6	11,4	15,0	15,2	15,3	0,0	1,0	0,0
Média / Mediana		11,33 / 11,40			15,17 / 15,20			0,33 / 0,0		
<i>Schinus molle</i>	Extracto bruto	9,8	9,8	9,9		FI		1,8	2,0	2,0
Média / Mediana		9,83 / 9,80						2,00 / 1,93		
<i>Lippia alba</i>⁽¹⁾	16,1 (Dil. 4x)	29,2	30,2	31,0		FI		6,1	6,0	6,0
Média / Mediana		30,10 / 30,20						6,03 / 6,00		
<i>Lavandula luisieri</i> (folhas)⁽¹⁾	61,6 (Dil. 8x)	17,6	17,9	17,4		FI		8,9	8,4	8,8
Média / Mediana		17,63 / 17,60						8,70 / 8,80		
<i>Lavandula luisieri</i> (flores)⁽¹⁾	61,6 (Dil. 8x)	22,1	22,0	22,3		FI		11,1	10,8	11,2
Média / Mediana		22,13 / 22,10						11,03 / 11,01		
<i>Mentha cervina</i>^(1,2)	Dil. 8x	40,1	40,5	40,0	28,8	29,0	29,0	21,0	22,0	20,0
Média / Mediana		40,10 / 40,10			28,93 / 29,00			21,00 / 21,00		
<i>Thymus mastichina</i>	Extracto bruto	39,9	40,2	40,0	17,6	17,4	17,8	22,0	22,3	22,1
Média / Mediana		40,03 / 40,00			17,60 / 17,60			22,13 / 22,10		

Todos os valores apresentam significância (P) <0,05 o que se considera que todos os valores têm significado.

Sol. – Solução; Dil. – Diluição; FI – Forte Inibição, crescimento bacteriano visual, apenas na periferia do meio de cultura.

⁽¹⁾ Limitações na execução dos ensaios analíticos, devido à pouca quantidade de óleo essencial disponível.

⁽²⁾ Devido à pouca quantidade de óleo essencial disponível, não foi possível a determinação da densidade.

4.2.3. CMI e CMB – Método de Macrodiluição:

A determinação da CMI e da CMB, foi realizada segundo a metodologia descrita anteriormente, pela técnica de macrodiluição (ponto 3.5.3). Um dos problemas desta técnica, é o facto de ser muito trabalhosa e exigir algum tempo para a sua realização. Havendo pouco tempo para a realização deste projecto, sabendo que esta técnica consome algum tempo e havendo pouca quantidade dos óleos essenciais em estudo, só foi possível a realização destes ensaios para os óleos *Lavandula luisieri* (flores), *Lavandula luisieri* (folhas) e *Thymus mastichina*.

Os resultados encontram-se nas tabelas 9 a 14. A interpretação e critérios para as CMI e CMB foram os seguintes: o primeiro tubo a apresentar turvação visível a olho nu é considerado como a $CMI_{OBSERVADA}$. Por conseguinte, a CMI_{REAL} irá situar-se entre a $CMI_{OBSERVADA}$ e a diluição adjacente mais baixa.

Relativamente à CMB, esta é sempre considerada menor ou igual à CMI, dado que representa o efeito bactericida no crescimento bacteriano em meio de cultura sólido, correspondente à inibição de no mínimo 99,9% do inoculo original. Dado que nos nossos ensaios, foi usado um inoculo de $\cong 5 \times 10^5$ UFC/ml, consideramos como CMB as placas que tenham um crescimento bacteriano $\leq 0,1\%$ do inoculo, ou seja, o corresponde a ≤ 500 UFC/ml.

A título de exemplo, vamos interpretar os resultados experimentais obtidos para o extracto de folhas de *Lavandula luisieri*. Para a estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922, o primeiro tubo a apresentar turvação foi o corresponde à diluição 80x (11 mg/ml) sendo esta considerada a $CMI_{OBSERVADA}$. Como não foram realizadas diluições intermédias entre as diluições 40x e 80x, consideramos que a CMI_{REAL} irá situar-se entre ambas, correspondendo às concentrações de 22 mg/ml e 11 mg/ml respectivamente.

No caso da estirpe *Salmonella spp*, consideramos a $CMB_{OBSERVADA}$ a correspondente à diluição 40x, dado que esta apresenta um crescimento em placa de 150 UFC/ml (inferior a 0,1% do inoculo original). Visto que não foram realizadas diluições intermédias entre as diluições 40x e 80x, não temos a garantia de que, por exemplo, a diluição 60x apresentasse uma contagem inferior a 500 UFC/ml. Por este motivo, consideramos a CMB_{REAL} situada entre as diluições 40x e 80x, correspondendo às concentrações de 22 mg/ml e 11 mg/ml, respectivamente.

Este foi o raciocínio seguido nesta tese para a interpretação das CMI e CMB para os óleos e estirpes testadas, cujas conclusões se apresentam no capítulo 5 “Conclusões”.

Tabela 9 – Resultados dos ensaios de macrodiluição com o óleo essencial *Lavandula luisieri* dos extractos de folhas. A vermelho indica a CMI.

Diluição (Óleo)	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella spp</i>		C +		C -	
	T	CP	T	CP	T	CP	T	CP	T	CP
							PT	10 ⁵ - 10 ⁶	AT	0
10x	AT	0	AT	0	AT	0	Tubo = diluição 10x			
20x	AT	0	AT	0	AT	0	Volume óleo = 100 µL			
40x	AT	0	AT	0	AT	150	[Óleo] = 88 mg/ml (d=0,88)			
80x	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	AT	0	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	Volume de inoculo = 500 µL			
160x	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	Volume de caldo diluente = 400 µL			

T – Turvação nos tubos; CP – Contagem em placa (UFC/ml); C + – Controlo positivo; C - – Controlo negativo; PT – Presença de turvação (observação visual); AT – Ausência de turvação (observação visual).

Tabela 10 – CMI e CMB reais e observadas, e concentrações correspondentes do óleo essencial de *Lavandula luisieri* do extracto das flores, conforme os resultados da tabela 9.

	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella spp</i>	
	Diluição	[Óleo]	Diluição	[Óleo]	Diluição	[Óleo]
Valores observados						
CMI	80x	11 mg/ml	160x	5,5 mg / ml	80x	11 mg/ml
CMB	40x	22 mg/ml	80x	11 mg/ml	40x	22 mg/ml
Valores reais						
CMI	[80x; 40x]	[11–22] mg/ml	[160x; 80x]	[5,5–11] mg/ml	[80x ; 40x]	[11–22] mg/ml
CMB	[80x; 40x]	[11–22] mg/ml	[160x; 80x]	[5,5–11] mg/ml	[80x ; 40x]	[11–22] mg/ml

[Óleo] – Concentração do óleo.

Tabela 11 – Resultados dos ensaios de macrodiluição com o óleo essencial *Lavandula luisieri* dos extractos de flores. A vermelho indica a CMI.

Diluição (Óleo)	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella spp</i>		C +		C -	
	T	CP	T	CP	T	CP	T	CP	T	CP
							PT	10 ⁵ - 10 ⁶	AT	0
10x	AT	0	AT	0	AT	0	Tubo = diluição 10x			
20x	AT	0	AT	0	AT	0	Volume óleo = 100 µL			
40x	AT	0	AT	0	AT	0	[Óleo] = 88 mg/ml (d=0,88)			
80x	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	PT	1,3 x 10 ⁴	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	Volume de inoculo = 500 µL			
160x	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	Volume de caldo diluente = 400 µL			

T – Turvação nos tubos; CP – Contagem em placa (UFC/ml); C + – Controlo positivo; C - – Controlo negativo; PT – Presença de turvação (observação visual); AT – Ausência de turvação (observação visual).

Tabela 12 – CMI e CMB reais e observadas, e concentrações correspondentes do óleo essencial de *Lavandula luisieri* do extracto das flores, conforme os resultados da tabela 11.

	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella spp</i>	
	Diluição	[Óleo]	Diluição	[Óleo]	Diluição	[Óleo]
Valores observados						
CMI	80x	11 mg/ml	80x	11 mg/ml	80x	11 mg/ml
CMB	40x	22 mg/ml	40x	22 mg/ml	40x	22 mg/ml
Valores reais						
CMI	[80x ; 40x]	[11–22] mg/ml	[80x ; 40x]	[11–22] mg/ml	[80x ; 40x]	[11–22] mg/ml
CMB	[80x ; 40x]	[11–22] mg/ml	[80x ; 40x]	[11–22] mg/ml	[80x ; 40x]	[11–22] mg/ml

[Óleo] – Concentração do óleo.

Tabela 13 – Resultados dos ensaios de macrodiluição com o óleo essencial *Thymus mastichina*. A vermelho indica a CMI.

Diluição (Óleo)	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella spp</i>		C +		C -	
	T	CP	T	CP	T	CP	T	CP	T	CP
							PT	10 ⁵ - 10 ⁶	AT	0
8x	AT	0	AT	0	AT	0	Tubo = diluição 8x			
16x	AT	60	AT	0	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	Volume óleo = 125 µL			
32x	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	PT	10 ³ - 10 ⁴	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	[Óleo] = 82,5 mg/ml ; (d=0,66)			
64x	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	PT	10 ⁵ - 10 ⁶	Volume de inoculo = 500 µL			
							Volume de caldo diluente = 375 µL			

T – Turvação nos tubos; CP – Contagem em placa (UFC/ml); C + – Controlo positivo; C - – Controlo negativo; PT – Presença de turvação (observação visual); AT – Ausência de turvação (observação visual).

Tabela 14 – CMI e CMB reais e observadas, e concentrações correspondentes do óleo essencial de *Thymus mastichina*, conforme os resultados da tabela 13.

	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella spp</i>	
	Diluição	[Óleo]	Diluição	[Óleo]	Diluição	[Óleo]
Valores observados						
CMI	32x	20,6 mg/ml	32x	20,6 mg/ml	16x	41,2 mg/ml
CMB	16x	41,2 mg/ml	16x	41,2 mg/ml	8x	82,5 mg/ml
Valores reais						
CMI	[32x ; 16x]	[20,6-41,2] mg/ml	[32x ; 16x]	[20,6-41,2] mg/ml	[16x ; 8x]	[41,2-82,5] mg/ml
CMB	[32x ; 16x]	[20,6-41,2] mg/ml	[32x ; 16x]	[20,6-41,2] mg/ml	[16x ; 8x]	[41,2-82,5] mg/ml

[Óleo] – Concentração do óleo.

4.3. Comparação entre os halos de inibição e a CMI e CMB:

Tabela 15 – Comparação dos halos de inibição obtidos pela técnica de difusão em agar com as CMI e CMB, do óleo essencial *Lavandula luisieri* do extracto das folhas.

<i>Lavandula luisieri</i> (Extracto de folhas)					
	Halo de inibição – difusão em agar – poços			CMI (real)	CMB (real)
	Óleo diluído 8x				
	Media (mm)	[Óleo] (mg/ml)	[Óleo] (mg/70 µL)	[Óleo] (mg/ml)	[Óleo] (mg/ml)
<i>Escherichia coli</i>	17,63	110	7,7	[11 – 22]	[11 – 22]
<i>Staphylococcus aureus</i>	SC	110	7,7	[5,5 – 11]	[5,5 – 11]
<i>Salmonella spp</i>	8,70	110	7,7	[11 – 22]	[11 – 22]

[Óleo] – Concentração do óleo.

Tabela 16 – Comparação dos halos de inibição obtidos pela técnica de difusão em agar com as CMI e CMB, do óleo essencial *Lavandula luisieri* do extracto das flores.

<i>Lavandula luisieri</i> (Extracto de flores)					
	Halo de inibição – difusão em agar – poços			CMI (real)	CMB (real)
	Óleo diluído 8x				
	Media (mm)	[Óleo] mg/ml	[óleo] mg/70 µL	[Óleo] (mg/ml)	[Óleo] (mg/ml)
<i>Escherichia coli</i>	22,13	110	7,7	[11 – 22]	[11 – 22]
<i>Staphylococcus aureus</i>	SC	110	7,7	[11 – 22]	[11 – 22]
<i>Salmonella spp</i>	11,03	110	7,7	[11 – 22]	[11 – 22]

[Óleo] – Concentração do óleo.

Tabela 17 – Comparação dos halos de inibição obtidos pela técnica de difusão em agar com as CMI e CMB, do óleo essencial *Thymus mastichina*.

<i>Thymus mastichina</i>					
	Halo de inibição – difusão em agar – poços			CMI (real)	CMB (real)
	Óleo (extracto bruto)				
	Media (mm)	[Óleo] mg/ml	[óleo] mg/70 µL	[Óleo] (mg/ml)	[Óleo] (mg/ml)
<i>Escherichia coli</i>	40,03	660	46,2	[20,6 – 41,2]	[20,6 – 41,2]
<i>Staphylococcus aureus</i>	17,60	660	46,2	[20,6 – 41,2]	[20,6 – 41,2]
<i>Salmonella spp</i>	22,10	660	46,2	[41,2 – 82,5]	[41,2 – 82,5]

[Óleo] – Concentração do óleo.

Tabela 18 – Resumo dos ensaios efectuados.

Halo (mm)	Ensaio do efeito de vapores	Ensaio de halos - Difusão em agar	CMI / CMB (mg / ml)	
Staphylococcus aureus ATCC 25922				
> 50	<i>Schinus molle</i>	<i>Schinus molle</i> ; <i>Lavandula luisieri</i> (folhas) e (flores); <i>Lippia alba</i>	[5,50-11,0]	<i>Lavandula luisieri</i> (folhas)
[40-41]	<i>Lavandula luisieri</i> (folhas) e (flores)	[11,0-22,0]	<i>Lavandula luisieri</i> (flores)
[28-30]	<i>Lippia alba</i>	<i>Mentha cervina</i>	[20,6-41,2]	<i>Thymus mastichina</i>
[15-18]	(<i>Guaiaco+Bulnesol</i>); <i>Thymus mastichina</i>		
0	(<i>Guaiaco+Bulnesol</i>); <i>M. cervina</i> ; <i>T. mastichina</i>		
Escherichia coli ATCC 25923				
40	<i>Mentha cervina</i> ; <i>Thymus mastichina</i>	[11,0-22,0]	<i>Lavandula luisieri</i> (folhas)
[30-31]	<i>Lavandula luisieri</i> (folhas) e (flores)	<i>Lippia alba</i>	[11,0-22,0]	<i>Lavandula luisieri</i> (flores)
22,1	<i>Lavandula luisieri</i> (flores)	[20,6-41,2]	<i>Thymus mastichina</i>
20	<i>Lippia alba</i>		
17,6	<i>Lavandula luisieri</i> (folhas)		
[9-12]	<i>Schinus molle</i> ; (<i>Guaiaco+Bulnesol</i>)		
0	Restantes óleos		
Salmonella spp (estirpe selvagem)				
[21-22]	<i>Thymus mastichina</i> ; <i>Mentha cervina</i>	[11,0-22,0]	<i>Lavandula luisieri</i> (folhas)
[6-11]	<i>Lavandula luisieri</i> (folhas) e (flores); <i>Lippia alba</i>	[11,0-22,0]	<i>Lavandula luisieri</i> (flores)
[0-2]	Todos os óleos essenciais testados	(<i>Guaiaco+Bulnesol</i>); <i>Schinus molle</i>	[41,2-82,5]	<i>Thymus mastichina</i>

4.4. Modo de acção bacteriana:

O modo de acção antibacteriana dos óleos essenciais reflecte em como estes conduzirão à morte da célula (microrganismo). Esta acção pode ser sugerida pela composição de cada óleo essencial.

Pensa-se que a actividade antibacteriana dos óleos essenciais não seja atribuída a um só mecanismo específico, mas que existem vários alvos na célula, devido aos vários componentes existentes nos óleos essenciais. Nem todos estes mecanismos se realizam em separado. Alguns são afectados como uma consequência de outro mecanismo. Os compostos aos quais se sabe exactamente o seu mecanismo de acção são o timol, o carvacrol, o eugenol, o p-cimeno, a carvona, o cinamaldeído e o terpineno [Burt, 2004]. O único óleo essencial testado em que poderíamos relacionar a acção destes compostos é a *Mentha cervina*, uma vez que na sua composição possui eugenol (0,7%). Este composto poderá promover a deterioração da parede celular e consequentemente lise celular, mas devido às baixas concentrações do eugenol no óleo essencial de *Mentha cervina*, isto pode não se verificar.

4.5. Projectos futuros:

A área das bioactividades de óleos essenciais é muito vasta e trabalhosa. Dado que nesta tese se estudou a actividade antibacteriana de cada óleo essencial no seu todo, seria interessante no futuro aprofundar as bioactividades destes óleos essenciais, tendo em conta os seguintes pontos:

- ↳ Estudar as actividades antibacterianas de cada componente maioritário dos óleos essenciais;
- ↳ Estudar a existência de possíveis interacções entre os componentes maioritários dos óleos essenciais, verificando se agem antagónica ou sinergicamente;
- ↳ Estudar a existência de possíveis interacções entre o óleo essencial e o emulsionante, verificando se agem antagónica ou sinergicamente, testando com vários tipos de emulsionantes;

- ↳ Estudar o modo de acção bacteriana de cada componente maioritário dos óleos essenciais;
- ↳ Aperfeiçoar os métodos de ensaio, de modo a tentar obter valores concordantes entre os ensaios de vapor e difusão em agar com a determinação das CMI e CMB.

5 – CONCLUSÃO

Esta tese consistiu em verificar as actividades antibacterianas dos óleos essenciais de *Bulnesia sarmientoi* (*Guaiaco* + *Bulnesol*), *Schinus molle*, *Lavandula luisieri*, *Mentha cervina*, *Lippia alba* e *Thymus mastichina* contra os microrganismos de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella spp* (obtida de uma coprocultura), através de três técnicas diferentes.

As actividades antibacterianas, avaliadas pelas técnicas de vapor e difusão em agar (método de poços), demonstraram, valores satisfatórios e fiáveis, mas consideramos que não houve uma plena concordância com os ensaios de macrodiluição para a determinação das CMI e CMB, no respeitante aos valores de concentrações obtidas (concentrações de CMI e CMB mais elevadas comparativamente ao método de difusão em agar). De qualquer modo, é de referir a dificuldade na apresentação de critérios de CMI e CMB para óleos essenciais de origem vegetal, a falta de informação na literatura e a grande dificuldade na solubilização dos óleos. Na página 22 desta tese referem-se alguns critérios, mas são relativos ao método de microdiluição, o que no nosso entender não devem ser aplicados ao método de macrodiluição, pois ambas as técnicas apresentam muitas variáveis relativamente aos ensaios deste tipo de óleos.

As metodologias apresentadas nesta tese tiveram como suporte muitos ensaios experimentais que aqui não são descritos e que possibilitaram a optimização prática. Isto permitiu concluir que a técnica de difusão em agar pela técnica dos poços descrita nesta tese, é mais sensível comparativamente com a técnica dos discos (ensaios realizados não descritos nesta tese), mostrando ser a técnica mais satisfatória para a detecção da actividade antibacteriana.

Extracto bruto do óleo essencial (*Guaiaco* + *Bulnesol*):

- ↳ Consideramos que dos óleos testados foi dos que apresentou mais baixa actividade antibacteriana.
- ↳ Apresentou actividade fraca/moderada contra *Escherichia coli* ATCC 25923/*Staphylococcus aureus* 25922, respectivamente.
- ↳ Não apresentou actividade antibacteriana contra *Salmonella spp*.

Extracto bruto do óleo essencial *Schinus molle*:

- ↳ Muito forte actividade antibacteriana (vapores e difusão em agar) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25922.

-
- ↳ Fraca actividade antibacteriana (vapores e difusão em agar) contra as estirpes Gram-negativas testadas.

Extracto bruto e extracto diluído 4x do óleo essencial *Lippia alba*:

- ↳ Actividade antibacteriana moderada (vapores) e forte (difusão em agar, dil. 4x) contra *Escherichia coli*.

Extracto bruto do óleo essencial *Thymus mastichina* e extracto diluído 8x de *Mentha cervina*:

- ↳ *Mentha cervina* apresentou uma inibição moderada (se comparado com Penicilina G) ou forte (se comparado com Gentamicina) contra a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25922.
- ↳ *Thymus mastichina* apresentou uma inibição fraca (se comparado com Penicilina G) ou moderada (se comparado com Gentamicina) contra a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25922.

Extractos diluídos 8x dos óleos essenciais (folha e flores) de *Lavandula luisieri*:

- ↳ Ambos os extractos apresentaram uma fraca actividade antibacteriana contra *Salmonella spp.*
- ↳ Relativamente a *Escherichia coli* ATCC 25923, o extracto de flores apresentou uma actividade antibacteriana moderada, ligeiramente superior ao extracto de folhas.

Relativamente aos ensaios de determinação de CMI e CMB, concluímos:

Dada a quantidade disponível, só foi possível a realização destes ensaios para os óleos *Lavandula luisieri* (flores), *Lavandula luisieri* (folhas) e *Thymus mastichina*. Os valores obtidos de CMI e CMB, permitem-nos concluir a presença de actividade antibacteriana destes óleos contra as estirpes testadas nesta tese.

Nesta técnica, à medida que se realizaram os ensaios experimentais, verificou-se algumas desvantagens: o facto de esta técnica ser muito trabalhosa e consumir muito tempo; e ocorrer a formação de uma suspensão turva, pelo óleo essencial, que impede a determinação visual e espectofotométrica da eficácia antimicrobiana do óleo, devido à

insuficiente dissolução dos componentes testados, que se verificou para diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:10.

- **Estirpe Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25922):**

- ↳ Os óleos (diluições 8x) *Lavandula luisieri* (flores) e *Lavandula luisieri* (folhas) foram os que apresentaram valores reais de CMI e CMB mais baixos.
- ↳ *Thymus mastichina* (extracto bruto) apresentou valores reais de CMI e CMB mais altos, sendo consistente com os valores obtidos pelo método de difusão em agar.

- **Estirpes Gram-negativas:**

- ↳ Os óleos (diluições 8x) *Lavandula luisieri* (flores) e *Lavandula luisieri* (folhas) apresentaram valores reais de CMI e CMB idênticos ([11–22] mg/ml para ambas as estirpes, mais baixos, relativamente a *Thymus mastichina*. De modo a verificar se os valores obtidos de CMI e CMB são consistentes com os ensaios de difusão em agar realizados, dever-se-ão realizar em estudos posteriores, diluições intermédias.

Dos extractos brutos, nenhum óleo apresentou efeitos de vapor antibacterianos contra a estirpe *Salmonella spp* (obtida de uma coprocultura). Apenas apresentaram efeitos antibacterianos significativos contra *Escherichia coli* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* 25922, devido ao efeito dos vapores dos seguintes óleos essenciais: *Schinus molle*, *Lippia alba* e *Lavandula luisieri*. Relativamente aos ensaios de difusão em agar, os extractos dos óleos essenciais *Schinus molle*, *Lavandula luisieri* (folhas e flores) e *Lippia alba* apresentaram um efeito inibidor muito forte contra a estirpe Gram-positiva. Relativamente às estirpes Gram-negativas, os óleos que deram melhores resultados foram *Thymus mastichina* e *Mentha cervina*, apresentando uma antibacteriana forte contra *Escherichia coli* ATCC 25923 e moderada contra a estirpe *Salmonella spp*.

Relativamente à composição identificada de cada óleo essencial, destaca-se a do óleo de *Thymus mastichina*. Pode-se concluir que, o composto Linalool também pode

ter origem em óleos essenciais obtidos desta planta noutros locais, Castelo Branco, e não só na região da Estremadura (Portugal), como alguns autores o indicam.

6 – BIBLIOGRAFIA

- Aguiar J.S. e Costa M.C.C.D., 2005. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 8 (1), 79-84.
- Aguiar J.S., Costa M.C.C.D, Nascimento S.C. e Sena K.X.F.R., 2008. Actividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18 (3), 436-440.
- Alquézar J.B. e Coloma A.G., 2009. Insecticidas y repelentes de insectos de origem natural. *Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria*, 1ª Edição, Pag. 25.
- Alves E.G., Vinholis A.H.C., Casemiro L.A, Furtado N.A.J.H., Silva M.L.A., Cunha W.R. e Martins C.H.G., 2008. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da actividade antibacteriana de extractos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim. Nova*, 31 (5), 1224-1229.
- Bahl, J.R., Garg S.N., Singh S.C., Bansal R.P., Naqvi A.A., Kumar S., 2000. Composition of linalool rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 15 (3), 199-200.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. e Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- Baldovini N., Lavoine-Hanneguelle S., Ferrando G., Dusart G., Lizzani-Cuvelier L., 2005. Necrodane monoterpeneoids from *Lavandula luisieri*. *Phytochemistry*, 66, 1651–1655.
- Barry A.L., Craig W.A., Nadler H., Reller L.B., Sanders C.C. e Swenson J.M., 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial Agents; Appoved Guideline. NCCLS, M26-A, Vol. 19, N° 18.
- Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223– 253.
- Cáceres A., Alvarez A.V., Ovando A.E.O., Samayoa B.E., 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *J. Ethnopharmacol.*, 31, 193-208.

- Chung, Kyong-hwan, Kang K., Kim J., Kim J. e Lee K., 2007. Antibacterial Activity of Essential Oils on the Growth of *Staphylococcus aureus* and Measurement of their Binding Interaction Using Optical Biosensor. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17 (11), 1848–1855.
- Cowan M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564-582.
- Delgado F., Oliveira R., Coloma A.G., Mohamed N., Soria A.C., Sanz J., Burillo J., Rodilla J., Silva L. e Reina M., Adaptação ao Cultivo e Valorização de *Lavandula luisieri*.
- Dellacassa E., Martínez N., Davyt D., Castillo L., González-Coloma A., Giménez C., Cabrera R., Silva, L. e Rodilla J.M., 2006. Óleo essencial de guaiaco: composição e bioactividade.
- Duarte M.C.T., Figueira G.M., Sartoratto A., Rehder V.L.G., Delarmelina C., 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 97, 305-311.
- Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venâncio F., Tavares R., Brito J.C., Figueiredo A.C., Barroso J.G. e Pedro L.G., 2003. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 35–40.
- Fan Z.Q., Wang S.B., Mu R.M., Wang X.R., Liu S.X. e Yuan X.L., 2009. A Simple, Fast, Solvent-Free Method for the Determination of Volatile Compounds in *Magnolia grandiflora* Linn. *Journal of Analytical Chemistry*, 64 (3), 289–294.
- Ferraro M.J., Wikler M.A., Craig W.A., Dudley M.N., Eliopoulos G.M., Hecht D., W., Hindler J., Reller L.B., Sheldon A.T., Swenson J.M., Tenover F.C., Testa R.T. e Weinstein M.P., 2003. *Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico; Norma aprovada – Sexta edição*, NCCLS, M7-A6, Vol.23, No. 2, pag.11.
- Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Salgueiro L., Miguel M.G. e Faleiro M.L., 2008. Portuguese *Thymbra* and *Thymus* Species Volatiles: Chemical Composition and Biological Activities. *Current Pharmaceutical Design*, 14, 3120-3140.

- Gonçalves M.J., Vicente A.M., Cavaleiro C. e Salgueiro L., 2007. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Mentha cervina* from Portugal. *Natural Product Research*, 21 (10), 867–871.
- Hennebelle T., Sahpaz S., Joseph H. e Bailleul F., 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 211–222.
- Korock A.R., Juliani H.R. e Zygadlo J.A., 2007. Bioactivity of essential oils and their components. *Flavours and Fragrances*, 87-115.
- Lisin G., Safiyev S. e Craker L.E., 1999. Antimicrobial activity of some essential oils. *Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicines, Toxicology*, Eds. V. Martino *et al.*, Acta Hort. 501, ISHS.
- Madureira M.C., 2009. A Etnofarmacologia e a descoberta de novos medicamentos. *Farmacêuticos em diálogo*, N°3, Ordem dos Farmacêuticos.
- Mallavarapu, G.R., Bahl J.R., Bansal R.P., Garg S.N., Ramesh S., Kumar S., 2000. Essential oil of *Lippia alba*, a rich source of linalool. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 22 (1B), 765-7.
- Mann C.M. e Markham J.L., 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 538–544.
- Nascimento P.F.C., Nascimento A.C., Rodrigues C.S., Antonioli A.R., Santos P.O., Júnior A.M.B. e Trindade R.C., 2007. Actividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifactorial dos métodos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17 (1), 108-113.
- Ostrosky E.A., Mizumoto M.K., Lima M.E.L., Kaneko T.M., Nishikawa S.O., Freitas B.R., 2008. Métodos para avaliação da actividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18 (2), 301-307.
- Pina-Vaz C., Rodrigues C.G., Pinto E., Costa-de-Oliveira S., Tavares C., Salgueiro L., Cavaleiro C., Gonçalves M.J., Martinez-de-Oliveira J., 2004. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *JEADV*, 18, 73–78.

- Rhouma A., Daoud H.B., Ghanmi S., Salah H.B, Romdhane M. e Demak M., 2009. Antimicrobial activities of leaf extracts of *Pistacia* and *Schinus* species against some plant pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 91 (2), 339-345.
- Santos A.C.A., Rossato M., Agostini F., Almeida M.L., Pauletti G.F., Serafini L.A., Moyna P. e Dellacassa E., 2007. Caracterização química de populações de *Schinus molle* L. do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biociências*, 5 (2), 1014-1016.
- Sanz J., Soria A.C. e García-Vallejo M.C., 2004. Analysis of volatile components of *Lavandula luisieri* L. by direct thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1024, 139–146.
- Sena Filho J.G., Melo J.G.S., Saraiva A.M., Gonçalves A.M., Psiottano M.N.C., Xavier H.S., 2006. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16, 506-509.
- Silva V., Póvoa O., Espírito-Santo M.D., Vasconcelos T. e Monteiro A., 2009. *Mentha cervina* communities in Portugal. *LAZAROA*, 30, 73-79.
- Sousa J.C., 2006. Manual de Antibióticos Antibacterianos. *Universidade Fernando Pessoa*, 2ªEdição, Pag. 201-204 e 394-398.
- Wikler M.A., Cockerill F.R., Bush K., Dudley M.N., Eliopoulos G.M., Hardy D.W., Hecht D.W., Ferraro M.J., Swenson J.M., Hindler J.F., Patel J.B., Powell M., Turnidge J.D., Weinstein M.P. e Zimmer B.L., 2009. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard – Tenth Edition*. CLSI, M02-A10, Vol.29, N°1.

