



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Bioactividade de Óleos Essenciais
Avaliação da actividade antimicrobiana de três
químios tipos de óleos essenciais de *Lippia alba*

Rui David Caeiro Coca

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Industrial
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Pedro Miguel Mendonça Rocha
Co-orientador: Prof. Doutor Jesus Miguel L. Rodilla

Covilhã, Outubro de 2015

Dedicatória

Dedicado aos que me criaram e mimaram, a uns pais de excelência e às memórias dos meus avós. Pela educação que me proporcionaram e que moldou a pessoa que me orgulho de ser.

Agradecimentos

A longa jornada que agora termino, não é um capricho do acaso, mas sim uma vontade colectiva de compreensão, solidariedade e amizade. Educar um filho é uma tarefa hercúlea, tomar decisões para o futuro de quem se ama ainda mais, mas hoje compreendo tudo o que me ensinaram e agradeço todas as palmadas, castigos, reprimendas, TPC's à meia noite, exigência para ser o melhor e principalmente por nunca sequer me deixarem deambular pela hipótese de desistir, desistir era tabu para quase tudo se bem me lembro, a típica frase, “se começaste, agora tens que acabar”. Sei que chegou um momento em que tiveram que me deixar tomar as minhas decisões, hesitei, um pouco perdido, mas o serviço que fizeram foi bem feito e eu soube organizar-me e tomar as melhores opções. Obrigado mãe, obrigado pai, só quero poder ser como vocês.

Com a maturidade que já possuo, ou deveria possuir dizem alguns, pude verdadeiramente apreciar o empenho e a dedicação de alguns dos professores que tive, especialmente nesta recta final do percurso académico, seria de mau tom ou de muitas linhas gastas escrever tantos nomes. Um enorme obrigado a todos vós, não só pelo que me ensinaram, mas pela maneira como o fizeram, em perspectiva foram quase uns segundos pais para mim, também gostaria de um dia ser como vós.

Muitos amores e muitos amigos preencheram este caminho, alguns que se vão perdendo no tempo ou na distancia, mas nunca no coração, outros que vivem no meu coração todos os dias e com quem partilho mais assiduamente a minha vida. Existe em nós um pedacinho de cada pessoa que conhecemos, é por isso que nos lembramos delas, seria vasta a lista de nomes a quem deveria agradecer, mas no âmbito em que se inserem os agradecimentos, relembro todos os que me acompanharam nestes últimos anos académicos, nomeadamente os que partilharam os meus passos e companhia, o Coelho, a Mariana, Maria, Nadina, Patrícia, Margarida, obrigado pela viagem e camaradagem, obrigado pelo apoio e sentido de entreajuda. Destaco também o grupo com quem hoje me orgulho de trabalhar, não só foram importantes na minha formação durante o estagio profissional, como são seres humanos extraordinários, a quem me orgulho de chamar amigos, obrigado Celina, Estela, Diana e indubitavelmente os meus orientadores Prof. Dr. Pedro Rocha e Prof. Dr. Jesus Rodilla.

Para o fim, e pelo facto de ser a mais importante, o meu pilar emocional, a outra metade da minha vida, a minha mulher, a minha companheira, obrigado por existires e me compreenderes. Fizeste e fazes de mim uma pessoa melhor. Sim vamos ficar velhos, mas juntos. Obrigado mor!

Resumo

Em todas as eras e civilizações se relatam ou registaram os efeitos benéficos do uso de plantas, não só a nível medicinal como cosmético ou até insecticida. Esse conhecimento, tem vindo a ser o ponto de partida para o estudo dos óleos essenciais dessas plantas, que são misturas complexas de 30 a 70 compostos distintos e em variadas concentrações. Dos muitos princípios activos que o óleo pode exibir, um deles começou a ganhar relevância no estudo de quase todos os óleos, a sua acção antibacteriana, tendo sido desenvolvidos vários métodos e técnicas para avaliar essa propriedade, designados de métodos *screening*.

Desde que se estudam as propriedades antibacterianas dos óleos essenciais, constatou-se que, além de ser possível existir uma sinergia entre vários constituintes que justificam uma actividade demonstrada, também se começou a perceber que variações no meio ambiente em que as plantas se desenvolvem influenciam a constituição dos óleos produzidos por uma mesma espécie de planta. Assim, actividades demonstradas por uma planta, poderão não ser uniformes na mesma espécie, nomeadamente se têm origens geográficas diferentes.

O objectivo deste trabalho visa estudar químiotipos de óleos essenciais da espécie *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, testando as suas actividades antibacterianas frente a estirpes de interesse relevante, nomeadamente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os testes de *screening* são os mais utilizados hoje em dia, difusão por cavidades (poços) em placa de agar, efeito do vapor em placa de agar para determinação dos halos de inibição e macrodiluição em caldo para determinação de CMI's e CMB's.

Os resultados mostram forte inibição para as estirpes Gram-positiva *S. aureus* (ATCC 25923) e Gram-negativa *E. coli* (ATCC 25922) com valores similares para os ensaios por difusão por cavidades onde se destacou o químiotipo Dihidrocarvona. Nos ensaios por efeito vapor só os dois químiotipos Linalol obtiveram bons resultados frente a essas estirpes. Para CMI e CMB, os melhores resultados são, pelos três químiotipos testados, frente a *S. aureus*, todos na proporção de 1:64, Linalol (I) 28,15-14,06 mg/mL, Dihidrocarvona 28,43-14,21 mg/mL e para o Linalol (II) 27,18-13,59 mg/mL. Para *E. coli* temos CMI superiores às encontradas para *S. aureus* em todos os químiotipos, Linalol (I) 225-112,50 mg/mL, Dihidrocarvona 56,87-28,43 mg/mL e para Linalol (II) obtivemos ensaios não concordantes ([108,75-54,37] e [54,37-27,18]), sendo a variação entre 108,75 e 27,18 mg/mL, mas que provavelmente se encontrará mais perto de 54,37 mg/mL. A bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* (ATCC 27853), mostrou-se resistente nos ensaios em placa de agar para todos os químiotipos, mas constatou-se com agrado a determinação da sua CMI, em todos os químiotipos. Linalol (I) com uma CMI entre 225-112,50 mg/mL, Dihidrocarvona com 227,50-113,75 mg/mL e Linalol (II) com 217,50-108,75.

Palavras-chave

Lippia ; *Lippia alba* ; Óleos essenciais ; Químiotipo ; Antimicrobiano ; Antibacteriano;

Abstract

The benefits in the use of plants have been recorded in all civilizations throughout all eras, not only as medicine but also as cosmetics or insecticides. That knowledge, propagated through generations, is now the starting point for researchers in the study of a plant essential oils, which are complex mixtures of about 30 to 70 different constituents in different concentrations. Many activities can be related to the use of essential oils, but one in particular began to gain some focus, being common to many essential oils, their antibacterial activity. There have been developed and adapted many methods and technics to determine the antibacterial activity of essential oils, which are commonly referred as *screening* methods.

From all the years studying essential oils antibacterial activities, researchers began to understand that, not only there is a possibility of a synergistic effect between constituents of the oil which justify a specific activity, but also the surrounding environment in which the plant develops and grow can have a significant influence in the constituents of the oils produce by plants of the same species. Activities demonstrated by an oil from a specific plant, may not be verified in plants of the same species, particularly if they have different geographical origins.

The objective of this work was to study the potential antibacterial activities of three chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown against representative bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The screening tests are the most commonly used nowadays, diffusion in cavities in agar plate and the effect of vapor on agar plate to determine inhibition halos and macrodilution to determine the CMI's and CMB's.

The results show a strong inhibition against the Gram-positive *S. aureus* (ATCC 25923) and the Gram-negative *E. coli* (ATCC 25922), both with similar values for the diffusion in cavities for all chemotypes, where the chemotype Dihidrocarvona reported the best results. In the vapor test only the Linalol chemotypes showed good results for those two strains. For the MIC and MBC's, the best results were against *S. aureus*, at 1:64 for all chemotypes, Linalol (I) 28,15-14,06 mg/mL, Dihidrocarvona 28,43-14,21 mg/mL and for Linalol (II) 27,18-13,59 mg/mL. The MIC for *E. coli* are higher than for *S. aureus* in all chemotypes, Linalol (I) 225-112,50 mg/mL, Dihidrocarvona 56,87-28,43 mg/mL and for Linalol (II) were obtained two non-according intervals ([108,75-54,37] and [54,37-27,18]), indicating MIC near 54,37 mg/mL. *P. aeruginosa* (ATCC 27853), showed resistance in the diffusion in cavities and vapor tests, for all chemotypes, but surprisingly, able to determine MIC's. Linalol (I) 225-112,50 mg/mL, Dihidrocarvona 227,50-113,75 mg/mL and Linalol (II) 217,50-108,75 mg/mL.

Keywords

Lippia ; *Lippia alba* ; Essential oils ; Chemotype ; Antimicrobial ; Antibacterial; Antifungal

Índice

Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Acrónimos	xx
Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	5
2.1 Óleos essenciais	5
2.1.2 Constituintes dos óleos essenciais	5
2.1.2.1 Terpenos	9
2.1.2.2 Compostos aromáticos	17
2.2 <i>Lippia alba</i>	19
2.2.1 Características e taxonomia botânica	23
2.2.2 Químios e diversidade	25
2.3 Microbiologia	29
2.3.1 Bacteriologia	31
2.3.1.1 Estrutura da célula bacteriana	35
2.3.1.2 Comparação entre Gram-positivas e Gram-negativas	37
2.3.1.3 <i>Escherichia coli</i>	41
2.3.1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
2.3.1.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	47
2.3.2 Agentes antimicrobianos	49
2.3.2.1 Antibiótico Gentamicina	51
2.3.2.2 Antibiótico Penicilina	53
2.4 Avaliação da actividade antimicrobiana	55
2.4.1 Sinergismo e antagonismo	57
2.4.2 Métodos e técnicas de avaliação de actividade antimicrobiana	59
2.4.2.1 Métodos de diluição em caldo	59
2.4.2.1.1 Macrodiluição	61
2.4.2.1.2 Microdiluição	61
2.4.2.1.3 Teste da resazurina	63
2.4.2.2 Métodos de difusão em placa de agar	65
2.4.2.2.1 Perfuração de cavidades cilíndricas	67
2.4.2.2.2 Cilindros de aço inoxidável	67
2.4.2.2.3 Difusão em discos de papel	69
2.4.2.2.4 Efeito de vapor do óleo essencial em placa de agar	69
2.4.2.3 Interferentes nos métodos de avaliação antibacteriana	71

Capítulo 3 - Objectivo	77
Capítulo 4 - Material e procedimentos	79
4.1 Óleos essenciais de <i>Lippia alba</i>	79
4.2 Meios de cultura	79
4.3 Microrganismos teste	81
4.4 Densidade do inóculo	83
4.5 Métodos difusão em agar	85
4.5.1 Difusão em agar por perfuração de cavidades cilíndricas	85
4.5.2 Difusão em agar por efeito de vapor em placa	87
4.5.3 Determinação de Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida por macrodiluição em caldo	87
Capítulo 5 - Resultados e discussão	89
5.1 Constituição dos óleos essenciais de <i>Lippia alba</i>	89
5.2 Actividade antibacteriana de <i>Lippia alba</i>	101
5.2.1 Halos de inibição pela técnica do poço	105
5.2.2 Halos de inibição pela técnica do efeito de vapor em placa de agar	109
5.2.3 CMI e CMB dos óleos testados	113
5.3 Tratamento estatístico	127
Capítulo 6 - Conclusões	135
6.1 Trabalho futuro	141
Capítulo 7 - Bibliografia	143

Lista de Figuras

	Pag.
Figura 2.1 Estruturas químicas de alguns dos principais terpenos e compostos aromáticos presentes nos óleos essenciais.	7
Figura 2.2 Estruturas químicas de alguns componentes dos óleos essenciais, terpenos, sesquiterpenos e terpenóides.	11
Figura 2.3 Rotas metabólicas da biossíntese dos terpenos.	15
Figura 2.4 Estruturas químicas de alguns compostos aromáticos com actividade antimicrobiana comprovada.	17
Figura 2.5 Principais componentes isolados do óleo essencial de <i>lippia alba</i> aplicados em fármacos.	21
Figura 2.6 Imagens de <i>Lippia alba</i> .	25
Figura 2.7 Representação de algumas morfologias bacterianas	35
Figura 2.8 Representação da constituição e estrutura das paredes celulares Gram-positivas e Gram-negativas.	39
Figura 2.9 <i>Escherichia coli</i>	41
Figura 2.10 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	43
Figura 2.11 <i>Staphylococcus aureus</i> .	47
Figura 2.12 Gentamicina e Penicilina.	53
Figura 2.13 Visualização da montagem macrodiluição e microdiluição.	61
Figura 2.14 Esquema da transformação da resazurina em resorufina.	63
Figura 2.15 Exemplos de ensaios com resazurina.	63
Figura 2.16 Exemplos de agar com cavidades.	67
Figura 2.17 Exemplos de dispensador e ensaio com cilindros de aço inoxidável.	67
Figura 2.18 Exemplos de ensaios de difusão por discos de papel.	69
Figura 2.19 Exemplos de ensaios pela técnica de vapor e os halos de inibição causados.	69
Figura 4.1 Extração por arraste de vapor; GC-ME.	79
Figura 4.2 Placas Petri em vidro e meio de cultura agar em placa(MH2).	79
Figura 4.3 Estirpe ATCC.	81
Figura 4.4 Culturas Mãe após incubação.	81
Figura 4.5 Aparelho de medição da turvação para padronização de inóculos e tubos com suspensões bacterianas.	83
Figura 4.6 Utensilio para realizar poços, aspecto de placa inoculada e com óleo a testar e da placa de controlos antes de incubarem.	85
Figura 4.7 Exemplo de esquema seguido na macrodiluição durante o trabalho efectuado	87
Figura 5.1 GC-ME do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> , químiotipo Linalol (I)	89
Figura 5.2 GC-ME do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> , químiotipo Dihidrocarvona	93
Figura 5.3 GC-ME do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> , químiotipo Linalol (II)	97
Figura 5.4 Traçado do diâmetro dos halos em poços e em vapor	101

Lista de Tabelas

	Pag.
Tabela 1 Classificação de terpenos e alguns exemplos	11
Tabela 2 Constituição percentual dos compostos presentes no óleo de <i>Lippia alba</i> , químiotipo Linalol (I).	91
Tabela 3 Constituição percentual dos compostos presentes no óleo de <i>Lippia alba</i> , químiotipo Dihidrocarvona.	95
Tabela 4 Constituição percentual dos compostos presentes no óleo de <i>Lippia alba</i> , químiotipo Linalol (II).	99
Tabela 5 Susceptibilidade dos microrganismos por comparação dos halos inibitórios	101
Tabela 6 Halos inibitórios do óleo <i>Lippia alba</i> , químiotipo Linalol (I) pela técnica dos poços, em triplicado.	105
Tabela 7 Halos inibitórios do óleo <i>Lippia alba</i> , químiotipo Dihidrocarvona pela técnica dos poços, em triplicado.	105
Tabela 8 Halos inibitórios do óleo <i>Lippia alba</i> , químiotipo Linalol (II) pela técnica dos poços, em triplicado.	107
Tabela 9 Halos inibitórios dos controlos positivos e negativo pela técnica dos poços	107
Tabela 10 Halos inibitórios por efeito de vapor com o óleo <i>Lippia alba</i> , químiotipo Linalol (I), em triplicado.	109
Tabela 11 Halos inibitórios por efeito de vapor com o óleo <i>Lippia alba</i> , químiotipo Dihidrocarvona, em triplicado.	109
Tabela 12 Halos inibitórios por efeito de vapor com o óleo <i>Lippia alba</i> , químiotipo Linalol (II), em triplicado.	111
Tabela 13 Resultados de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial Linalol (I), 1 ° ensaio	115
Tabela 14 Resultados de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial Linalol (I), 2 ° ensaio	115
Tabela 15 Resultados de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial Dihidrocarvona, 1 ° ensaio	117
Tabela 16 Resultados de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial Dihidrocarvona, 2 ° ensaio	117
Tabela 17 Resultados de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial Linalol (II), 1 ° ensaio	119
Tabela 18 Resultados de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial Linalol (II), 1 ° ensaio	119

	Pag.
Tabela 19 CMI e CMB reais e observadas, e concentrações correspondentes do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> , químiotipo Linalol (I).	121
Tabela 20 CMI e CMB reais e observadas, e concentrações correspondentes do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> , químiotipo Dihidrocarvona	123
Tabela 21 CMI e CMB reais e observadas, e concentrações correspondentes do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> , químiotipo Linalol (II).	125
Tabela 22 Resultados dos halos de inibição no ensaio da difusão por perfuração de cavidades (poços) em placa de agar. Média e desvio padrão para os triplicados efectuados para cada estirpe, com cada um dos químiotipos.	127
Tabela 23 Resultados dos halos de inibição no ensaio do efeito do vapor em placa de agar. Média e desvio padrão para os triplicados efectuados para cada estirpe, com cada um dos químiotipos.	129
Tabela 24 Comparação entre os halos de inibição pela técnica da perfuração de cavidades (poços) em agar e efeito vapor. Médias com o devido desvio padrão para halos de inibição e concentrações por cavidade e efeito vapor em todas as diluições.	131
Tabela 25 Comparação entre os halos de inibição pela técnica da perfuração de cavidades (poços) em agar e as CMI e CMB reais. Médias com o devido desvio padrão para halos de inibição e concentrações por cavidade em todas as diluições.	133

Lista de Acrónimos

ATCC	American Type Culture Collection
GC-ME	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetilsufóxido
Gram -	Bactérias Gram negativas
Gram +	Bactérias Gram positivas
McF	Unidades McFarland
MH	Muller Hinton
NaCl	Cloreto de Sódio (Soro fisiológico)
UBI	Universidade da Beira Interior
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

Capítulo 1 - Introdução

De todas as praticas medicinais de que o Homem tem vindo a recorrer ao longo da sua existência, são sem duvida as que fazem uso de plantas as que mais bem sucedidas foram e que ficaram registadas por muitos povos e civilizações. O relato do uso de plantas e dos seus óleos remonta a 13000-25000 a.C., nas cavernas de Lascaux em França, onde se descobriram pinturas que exemplificavam o uso de plantas em ferimentos. Relatos ainda das primeiras civilizações egípcias, cerca de 4500 a.C., que as usavam quotidianamente para produzir balsamos e perfumes, da sua pasta também produziam comprimidos e supositórios. A preparação mais conhecida designava-se “Kaphi” e servia para embalsamar e como insecticida [Farzana *et al*, 2015].

Hoje, essas plantas que têm dado provas de actividade medicinal tem visto os seus princípios activos escrutinados pelos avanços na medicina, biologia e química que estudam agora os seus óleos essenciais. O uso dos óleos essenciais na indústria farmacêutica fundamenta-se nas suas propriedades analgésicas, desinfetantes e antissépticas [Ehlert *et al*, 2013]. Esses óleos são produtos voláteis resultantes do metabolismo secundário das plantas, compostos denominados por metabolitos secundários. Os terpenos e os compostos aromáticos encontram-se entre os mais abundantes [Simões *et al*, 1999]. Uma planta pode conter muitos metabolitos secundários, mas apenas os compostos que se encontram em maior concentração são geralmente isolados e estudados. A análise dos compostos constituintes e princípios activos é uma tarefa muito longa e complexa [Silva, 2010].

Os estudos actuais centram-se na laboriosa correlação desses metabolitos secundários com as diferentes actividades medicinais relatadas da planta. Embora já se conheçam inúmeros metabolitos responsáveis por determinadas actividades, supõe-se que, embora um só possa ser responsável pela actividade, é geralmente uma sinergia entre dois ou mais compostos químicos existentes no óleo [Burt, S., 2004; Rocha P. *et al*, 2012].

Biólogos e microbiólogos profetizam, a ineficácia a curto prazo de muitos dos antibióticos conhecidos, devido a resistências adquiridas por parte de muitas populações bacterianas e visto não se sintetizarem novos antibióticos há algum tempo [Baquero e Blázquez, 2004]. Os óleos essenciais apresentam actividade antibacteriana contra uma grande variedade de bactérias, incluindo espécies resistentes a antibióticos [Arruda *et al*, 2006]. Mas mesmo com este conhecimento de determinadas espécies de plantas e das suas propriedades, a obtenção, viável, de novos medicamentos e antibióticos está ainda distante, ainda não se conseguem obter com a sustentabilidade nem com a eficácia com que se produzem os de origem sintética [Baquero e Blázquez, 2004].

Apesar de algumas plantas serem muito estudadas pelas substâncias que contêm, estima-se que apenas 10% das 250.000 espécies tenham sido caracterizadas em termos farmacológicos e químicos. Na maioria dos casos, não há validação científica dos produtos naturais utilizados, especialmente em países em desenvolvimento [Díaz *et al*, 2008].

Este trabalho visa, particularmente, as actividades antibacterianas relatadas de 3 óleos essenciais com químiotipos diferentes, da espécie *Lippia alba*, os microrganismos susceptíveis a essa acção e a possível aplicação por parte da indústria (farmacêutica, cosmética ou alimentar) ao compará-lo com antibióticos comumente usados.

O estudo de agentes antimicrobianos tem uma enorme abrangência, sendo o ponto crucial em vários sectores do campo farmacêutico e cosmético e existem vários métodos para testar a sua actividade sendo a difusão em agar por discos de papel ou cavidade cilíndricas, macrodiluição em caldo os mais recorrentes [Ostrosky *et al*, 2008]. De facto, os estudos efectuados até à data mostram a espécie *Lippia alba* como espécie de grande versatilidade e potencial económico [Aguiar *et al*, 2008; Albuquerque *et al*, 2007; Neves, L.A. *et al*, 2008].

Capítulo 2 -Revisão Bibliográfica

2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ser extraídos de diversas partes das plantas, raízes, caules, folhas, consoante a espécie, tipo de estudo e extração que se pretenda efectuar. As extracções mais comumente usadas são por destilação e pelo uso de solventes orgânicos, visto os óleos serem compostos hidrofóbicos. Geralmente são designados de “óleo essencial de”, precedidos do nome da planta de onde são extraídos [Burt S., 2004; Neves, L.A. *et al*, 2008].

São amplamente conhecidos desde a antiguidade pelas propriedades aromáticas, relaxantes, analgésicas e sedativas a eles associados [Laciar, *et al*, 2009]. Alguns destacaram-se por outro tipo de actividades como as antioxidantes e anti-inflamatórias, antifúngicas, antimicrobianas e insecticidas e na preservação de alimentos [Chung *et al*, 2007; Bakkali *et al*, 2008]. Outros são usados na União Europeia, principalmente na comida, como aromas, em perfumes e nos produtos farmacêuticos pelas suas propriedades funcionais [Burt S., 2004].

Conhecem-se até ao momento cerca de 3000 óleos essenciais, dos quais 10% tem interesse económico e comercial, em foco os que são aplicados na indústria farmacêutica, mas também nas indústrias agronómica, alimentar e cosmética, nesta última com destaque para os perfumes e produtos higiénicos. A aromaterapia continua a demonstrar benefícios, bem como os óleos destinados a massagens corporais ou a banhos relaxantes. Na sua essência, os óleos essenciais estão presentes nas plantas como mecanismos de defesa, contra bactérias, fungos e insectos ou mesmo herbívoros. No caso destes últimos, reduz-lhes a apetência por aquela planta específica [Bakkali *et al*, 2008].

2.1.2 Constituintes dos óleos essenciais

Os constituintes dos óleos essenciais extraídos têm complexas misturas de variados compostos químicos, cerca de 30 a 70, principalmente terpenóides e, em especial, monoterpenos [C_{10}] e sesquiterpenos [C_{15}], embora diterpenos [C_{20}] também possam ser encontrados. Entre estes também se encontram uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular (lineares, ramificados e insaturados), ácidos, álcoois, aldeídos, lactonas e, excepcionalmente, compostos que contenham azoto ou enxofre, como cumarinas e os seus homólogos fenilpropanóides [Chung *et al*, 2007] [Bakkali *et al*, 2008]. Os terpenos são os responsáveis químicos pelas propriedades medicinais e aromáticas da planta, actividades antibacteriana e antimicrobianas. Os principais componentes dos óleos estudados são os terpenos e compostos aromáticos (Fig. 2.1) [Dorman H., Deans S., 2000; Burt, S., 2004].

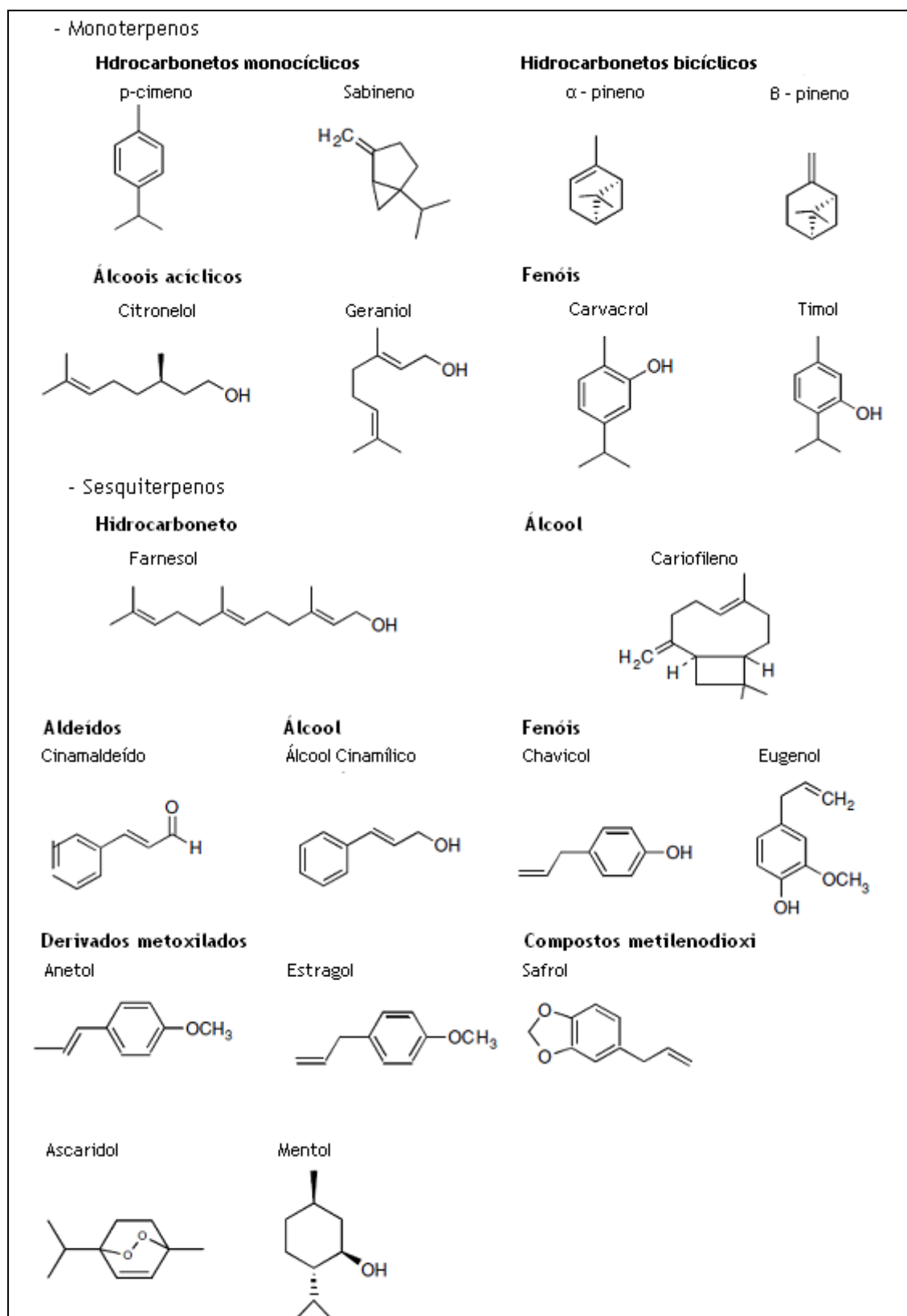


Figura 2.1 - Estruturas químicas de alguns dos principais terpenos e compostos aromáticos presentes nos óleos essenciais [Adaptado de Bakkali *et al*, 2008]

2.1.2.1 Terpenos

Podem ser encontrados em todas as partes das plantas superiores: sementes, flores, frutos, folhas, raízes e madeira, como também se podem encontrar em algas, limos, líquenes, insetos e microrganismos. Os compostos deste tipo, na forma de óleos ou extractos, são desde a antiguidade usados como constituintes de aromas, conservantes, perfumes, remédios, sabões e pigmentos [Banthorpe, *et al*, 1994]. Das várias bioactividades que os terpenos apresentam, destacam-se a antibacteriana, antifúngica e actividades contra vírus e protozoários em que se presume que o seu mecanismo, pouco compreendido, esteja envolvido na ruptura das membranas celulares pelos seus componentes lipofílicos [Cowan, 1999].

Também designados como terpenóides ou isoprenóides, são provavelmente, o grupo mais numeroso de produtos naturais derivados das plantas, nas quais se encontram descritas à volta de vinte mil estruturas [Martini, 2011]. Estes compostos são construídos a partir de unidades de cinco átomos de carbono, o isopreno. O sistema de classificação dos terpenos é muito simples: são agrupados segundo o número de átomos de carbono do esqueleto carbonado, sendo este sempre múltiplo de cinco [C_5]. Caso um terpeno contenha um grupo com oxigénio designa-se terpenóide. [Bakkali *et al*, 2008] (Tabela 1). Os terpenóides têm como precursor unidades de acetato tal como os ácidos gordos, mas diferenciam-se destes últimos por serem extensamente ramificados e ciclizados, possuindo também actividade contra diversos microrganismos como bactérias, fungos, vírus e protozoários [Cowan, 1999]. Como interagem com compostos lipofílicos, os terpenóides destabilizam a integridade e por consequência a permeabilidade da membrana. A incapacidade de reter iões K^+ é evidência de dano na membrana e é geralmente seguida de lise celular [Korock *et al*, 2007].

Os monoterpenos provêm do acoplamento de duas unidades de isopreno [C_{10}], conferindo-lhes uma grande variabilidade estrutural, representando cerca de 90% do óleo essencial. Apresentam-se em variados grupos funcionais [Bakkali *et al*, 2008] (Fig. 2.2):

- **Hidrocarbonetos** acíclicos (mirceno, ocimeno), monocíclicos (terpinenos, p-cimeno e os felandrenos) e bicíclicos (pinenos, canfeno, sabineno)
- **Álcoois** acíclicos (geraniol, linalol, lavanduol), monocíclicos (mentol, carveol, α -terpineol) e bicíclicos (borneol, tuian-3-ol, fenchol)
- **Aldeidos** acíclicos (geranial, neral, citronelal)
- **Cetonas** acíclicas (tagetona), monocíclicas (mentona, carvona, piperitona) e bicíclicas (tujona, pinocrvona, canfora)
- **Éteres** (mentofurano, 1,8-cineole)
- **Ésteres** acíclicos (propionato, acetato de citronelilo), monocíclicos (acetatos de mentilo ou α -terpinilo) e bicíclicos (acetato de isobornilo)

Tabela 1.1 - Classificação de terpenos e alguns exemplos

Esqueleto	Subgrupo	Exemplos
C₁₀	Monoterpenos	Mirceno, linalol, geraniol, limoneno, mentol, cânfora, tujona, α -pineno
	• Lineares	
	• Monocíclicos	
C₁₅	Sesquiterpenos	Farnesenos, Ácido abscísico, α -vetivona, poligodial, patchulol
	• Lineares	
	• Monocíclicos	
	• Bicíclicos	
	• Tricíclicos	
C₂₀	Diterpenos	Fitol, vitamina A, Ácido labdonólico, Ácido abiético, giberelinas, neocembreno
	• Lineares	
	• Monocíclicos	
	• Bicíclicos	
	• Tricíclicos	
	• Tetracíclicos	
	• Macrocíclicos	

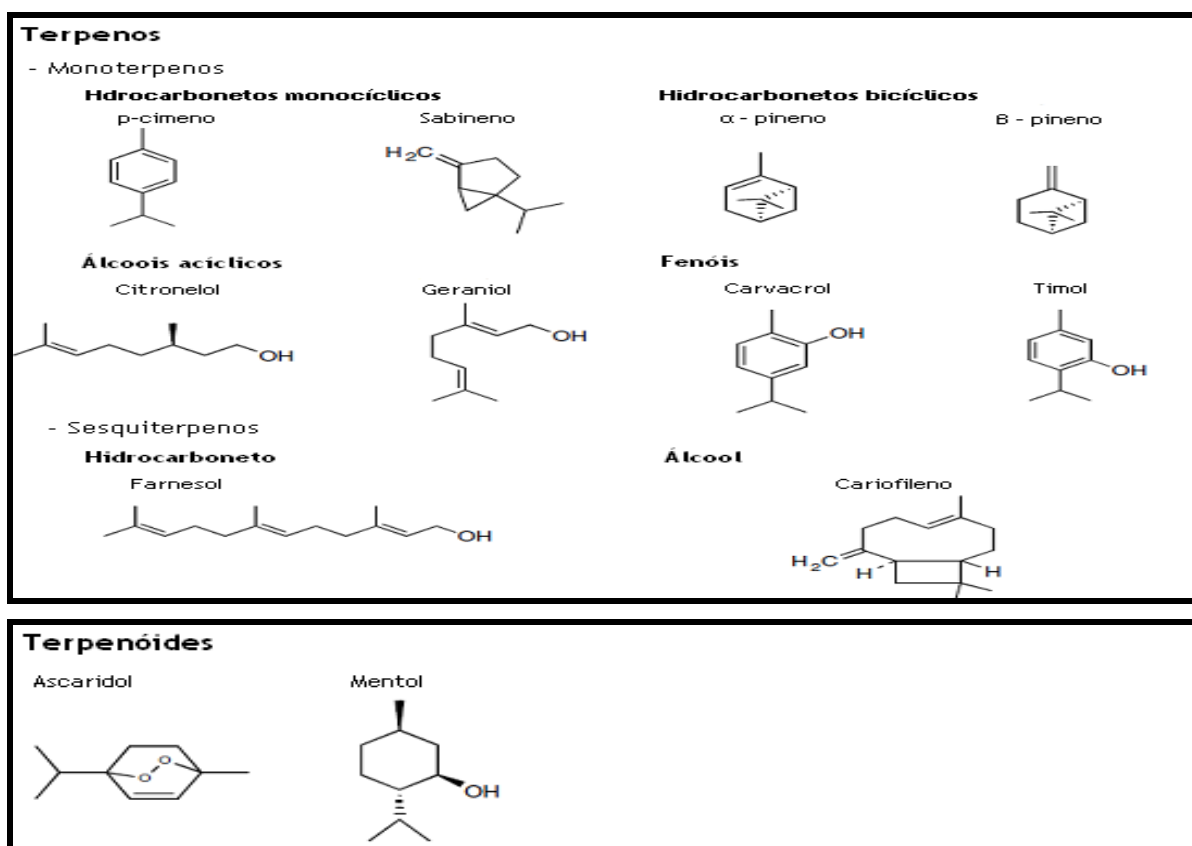


Figura 2.2: Estruturas químicas de alguns componentes dos óleos essenciais, terpenos, sesquiterpenos e terpenóides. [Adaptado de Bakkali *et al*, 2008]

- **Peróxidos** (ascariolo)
- **Fenóis** (timol, carvacrol)

Os monoterpenos são considerados a maior classe de metabolitos secundários, especiais pelo seu considerável valor económico. Em pequenas concentrações apresentam sabor e aroma agradáveis, alvo de enorme interesse na indústria alimentar, embora principalmente provenientes de plantas também se podem encontrar em animais e microrganismos [Martini, 2011]. Durante o tempo de vida da planta são, por exemplo, os responsáveis por atrair determinados insectos polinizadores e combaterem infecções microbianas ao apresentarem acção bacteriostática e frequentemente bactericida [Banthorpe, *et al*; 1994]. Frequentemente utilizados em balsamos ou em banhos de imersão, por se saber aliviarem dores de cabeça, dores torácicas devido a infecções pulmonares e dores musculares em geral, pois são rapidamente absorvidos pela pele e pelos pulmões através dos seus vapores. Isto deve-se ao facto de serem moléculas lipofílicas capazes de facilmente atravessar paredes celulares [Martini, 2011].

Os sesquiterpenos são monoterpenos aos quais se acoplou mais uma unidade de isopreno, perfazendo a totalidade de três unidades isopreno [C_{15}], através da condensação do PPI com PPG, formando pirofosfato de farnesila (PPF) (Fig. 1.3), constituem a maior classe de terpenoides em espécies vegetais [Martini, 2011]. Do mesmo modo que os monoterpenos, os sesquiterpenos podem dividir-se em [Bakkali et al, 2008] :

- **Hidrocarbonetos** (cadinenos, azuleno, logifoleno, farnesenos, curcumenos)
- **Álcoois** (carotol, cedrol, farnesol, β -santalol, patchoulol)
- **Cetonas** (β -vetinona, turmeronas, germacrona)
- **Epóxidos** (óxido cariofileno, epóxi-humuleno)

A biossíntese dos terpenos passa pela síntese do precursor difosfato de isopentenilo (IPP) e pode acontecer por duas vias, a via do ácido mevalônico ou a via do fosfato de metileritritol. Embora plantas e animais possam ambos produzir o duplo isopreno geranyl-PP, fazem-no por rotas metabólicas distintas, os animais pela rota do mevalonato e as plantas pela rota do fosfato de metileritritol (MEP)(Fig. 2.3) [Dewick, 2001; Bakkali *et al.*, 2008].

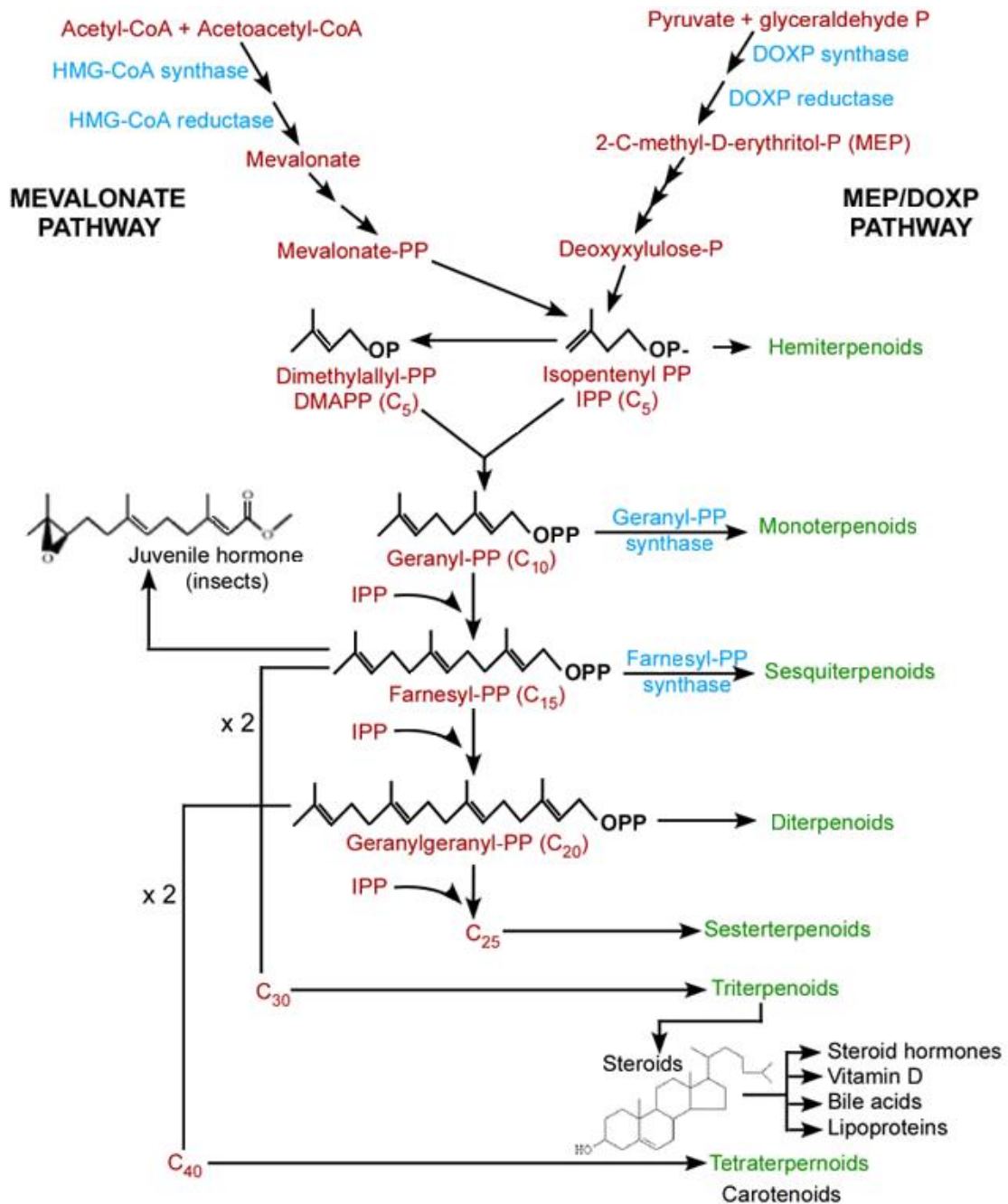


Figura 2.3 - Biossíntese dos terpenos. Componentes chave a vermelho, enzimas a azul, e os principais grupos de terpenos que crescem em unidades de isopreno a verde [Adaptado de Dewick, 2001].

2.1.2.2 Compostos aromáticos

Os compostos aromáticos derivam do fenilpropano, mas menos frequentemente que os terpenos não aromáticos, podendo a sua biossíntese coexistir com a dos terpenos. Entre eles encontram-se, aldeídos (cinamaldeído), álcoois (álcool cinâmico), fenóis (chavicol, eugenol), derivados metoxilados (anetole, elemicina, estragole, metil eugenóis) componentes metilenodioxílicos (apiole, miristicine, safrole) (Fig. 2.4). Os compostos aromáticos mais relevantes usados hoje extraem-se do estragão, noz-moscada, cravo, erva-doce, anis, salsa, canela e algumas famílias botânicas (*Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*) [Bakkali *et al.*, 2008].

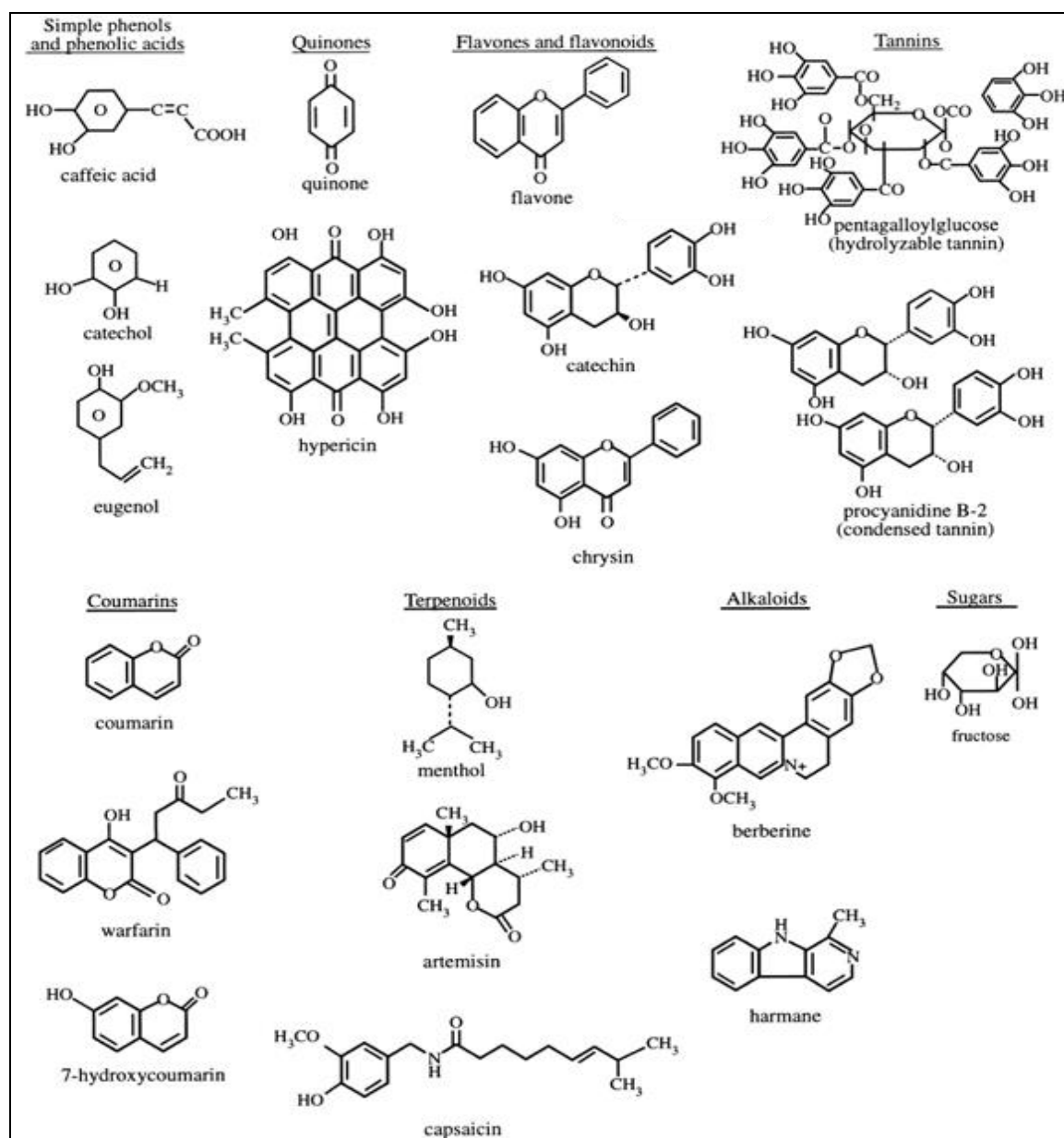


Figura 2.4 - Estruturas químicas de alguns compostos aromáticos com actividade antimicrobiana comprovada [Adaptado de Silva, L. e Fernandes J., 2010].

2.2 *Lippia alba*

A *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown é um arbusto aromático, pertencente à família *Verbenaceae*, a qual é oriunda e amplamente difundida por toda a América do Sul, usada desde tempos ancestrais para os mais diversos transtornos. Os primeiros contactos e registos de europeus com esta planta remontam ao séc. XVII, nomeadamente pelos franceses nas suas colónias (Guadalupe, Martinica, Guiana Francesa), onde ainda durante o período de escravatura as pessoas de cor ou os nativos não tinham direito de usar ou vender plantas medicinais, não fossem essas envenenar os colonos. Tais factos condicionaram a transmissão do conhecimento e das aplicações medicinais dessas plantas que, durante mais alguns séculos, continuou a ser negligenciado pela farmacopeia e sociedades europeias. Nos finais do séc. XIX é aprovado pela primeira vez, em França, o uso de duas plantas provenientes de colónias além-mar, a *Lippia alba* e a *Senna alata* (L.) Roxb. (Fabaceae) e a sua inclusão na farmacopeia francesa [Robard I., 2003]

Entre muitas aplicações na medicina tradicional, as infusões das suas folhas e flores foram e são usadas em diversos tratamentos como gripes, bronquites, asma, febre, problemas digestivos e hepáticos, sífilis e disenterias. Acções calmantes e espasmolíticas suaves já foram hoje comprovadas e atribuídas ao citral, enquanto a actividade analgésica foi atribuída ao mirceno, ambos presentes no óleo essencial de *Lippia alba* e já aplicados em fármacos (Fig. 2.5) [Barbosa *et al*, 2006]. Somente nos finais do século XX são reportadas, pela primeira vez, as actividades antimicrobianas de *Lippia alba* em extractos obtidos das folhas, em etanol, frente a *Staphylococcus aureus*, microrganismo representativo da flora superficial humana, seguindo-se, nessa mesma década, a comprovação dessa acção em extractos hidro-alcoólicos a 80% [Cáceres *et al*, 1991].

A potencialidade demonstrada pelos extractos das folhas levaram as pesquisas a testar outras partes da planta e verificou-se actividade antibiótica dos óleos essenciais das raízes, mel do seu néctar e caules com resultados positivos, não só para o *Staphylococcus aureus* como para outros microrganismos [Pessini *et al*, 2003; Duarte *et al*, 2005; Sena Filho *et al*, 2009].

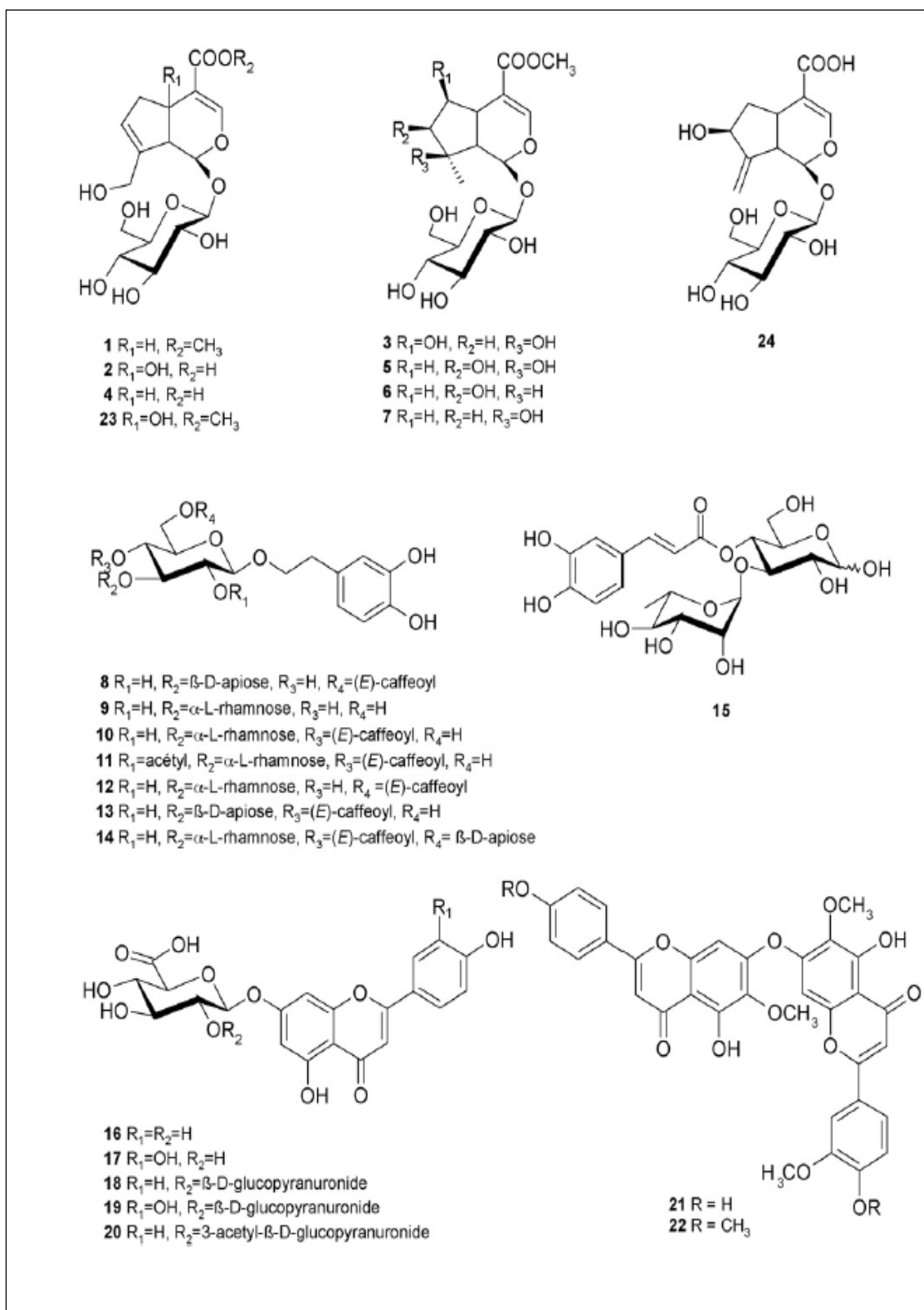


Figura 2.5 - Alguns dos principais componentes isolados do óleo essencial de *Lippia alba* aplicados em fármacos [Adaptado de Hennebelle T. *et al*, 2008 : Ethnopharmacology of *Lippia alba*]

2.2.1 Características e taxonomia botânica

Do filo *Magnoliophyta*, classe das *Magnoliopsidas*, ordem *Lamiales*, as espécies *Lippia alba*, pertencem ao género *Lippia* da família *Verbenaceae*, que também inclui outras plantas com relevância medicinal como a *Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britt. e a *Verbena officinalis* L. A *Lippia alba* pode ser encontrada abundantemente entre o sul dos Estados Unidos (nomeadamente na Flórida) e o norte da Argentina, mas também as podemos encontrar noutras regiões tropicais e subtropicais, como na Índia ou na Austrália. Existem cerca de 175 géneros e 2800 espécies difundidas nos trópicos e subtropicais em regiões temperadas do Hemisfério Sul e algumas no Hemisfério Norte. A constituição dos seus óleos essenciais é afectada por factores ambientais como as estações do ano, época de floração, idade da planta, quantidade de água circundante, factores geográficos e climáticos [Costa, M. *et al*, 2004; Hennebelle *et al*, 2008; Aguiar *et al*, 2008].

Devido ao uso bastante difundido em toda a América Latina, encontram-se diversas designações, que geralmente, derivam do seu aroma e aplicações na medicina tradicional. *Cidreira* é o nome mais comumente encontrado no folclore tradicional do Brasil, mas também era usado para designar outras dezassete ervas com cheiro e usos medicinais semelhantes, de facto, existem muitas designações sinónimas de *Lippia alba*, todas quase sempre associadas aos géneros *Lippia*, *Lantana*, *Phyla*, *Verbena* e *Zapania* [Matos *et al*, 1996]. As explicações podem residir na enorme variabilidade demonstrada pela espécie como também nas enormes complexidades de classificação dos géneros da família *Verbenaceae*. A título de exemplo, existem sete *taxa* ou classificações intraespecíficas para a espécie *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 a *Lippia alba* var. *lanceolata* (Griseb.) Múlgura [Hennebelle *et al*, 2008].

Ainda no Brasil a *Lippia alba* é conhecida como erva-cidreira de arbusto, chá do tabuleiro, sálvia, salva-limão, falsa melissa (em comparação à “verdadeira” *Melissa officinalis*, Erva-cidreira europeia), alecrim-selvagem, entre muitas outras na medicina tradicional [Barbosa *et al*, 2006]. Já em países de língua e cultura espanhola ou algumas colónias francesas, é designada como associada a outras espécies com cheiro similar, como *salvia morada*, *orégano de cerro*, *anis de España*, *mirto*, *verveine blanche* ou *saugé du Brésil* [Hennebelle *et al*, 2008].

São arbustos rasteiros e de medio porte, um pouco como pequenas árvores, de ramos finos e quebradiços e altura que chega a atingir 1,7 m (Fig. 2.6). As folhas são opostas ou ternadas, membranosas, elípticas de largura variável e comprimento entre 1-3 cm, com bordos serrados e ápice agudo. As flores são reunidas em inflorescências capituliformes de eixo curto, numa paleta do branco ao rosa, com dimensões de 3-5 mm. O fruto é composto por um núcleo de duas partes indeiscentes, cada uma contendo uma semente de cor castanha [Hennebelle *et al*, 2008].



Figura 2.6 - Imagens de *Lippia alba* e as suas flores [Consultado e adaptado em <http://allthingsplants.com/plants/photo/>, a 4 agosto 2015]

2.2.2 Químios e diversidade

Uma planta para se adequar ao clima, tipo de solo, altitude ou outras condições ambientais de uma determinada região, é capaz alterar (ou sujeitar-se a alterações) na sua composição química sem que essas afectem significativamente o seu fenótipo (características visíveis de um organismo). Isto significa que, uma planta, na tentativa de se adaptar a um ambiente particular, pode originar uma “variante” quimicamente nova ou diferente, mas com propriedades morfológicas idênticas ou muito semelhantes àquelas da mesma espécie. O termo químios, é usado quando queremos referir e classificar essas variações químicas no óleo essencial de uma mesma espécie de planta. Essa classificação é de grande importância para o estudo dos óleos essenciais uma vez que, óleos com constituição química diferente, têm actividades e propriedades diferentes e, conseqüentemente, aplicações distintas. A grande maioria das investigações hoje feitas com intuito de estudar óleos essenciais usa cromatografia gasosa geralmente acoplada a espectrometria de massa para a caracterização química desses óleos e confirmam a grande variabilidade química dentro de uma mesma espécie, sugerindo a existência de um grande número de químios [Hennebelle *et al*, 2008].

No caso da espécie *Lippia alba*, os estudos e pesquisas efectuadas, classificam um total de sete químiotipos, mas afirmam a possibilidade de muitos mais subtipos. São descritos, primeiro por referência ao componente ou componentes maioritários e depois em subtipos, pelos seguintes constituintes na ordem de maioria. O químiotipo I contém citral, linalol e β -cariofileno como constituintes maioritários (quatro subtipos), no químiotipo II a tagetenona é o componente maioritário, o caso mais referenciado do químiotipo III é o do limoneno com quantidades variáveis de carvona, mas cetonas monoterpénicas (dihidrocarvona, piperitona, piperitenona) podem ser encontradas em vez da carvona (dois subtipos). Os quatro seguintes químiotipos só possuem uma análise isolada, pelo que são designados pelo nome do constituinte maioritário do óleo, não se conhecendo subtipos, o químiotipo IV (mirceno), químiotipo V (γ -terpineno), químiotipo VI (canfora-1,8-cineol) e o químiotipo VII (estragole) [Hannebelle *et al*, 2008].

Como já referido, o ecossistema em que a planta se encontra determina o seu químiotipo e em estudos recentes já se tenta controlar essas características por cultivo padronizado [Aguiar *et al*, 2008].

2.3 Microbiologia

A microbiologia, tal como a conhecemos, é uma ciência relativamente jovem, afirmando-se como tal após as descobertas revolucionárias de Louis Pasteur e os postulados de Robert Koch, no século XIX [Ferreira *et al*, 2010]. Mas o verdadeiro nascimento da microbiologia, por assim dizer, deu-se com a descoberta do microscópio. Anton Van Leeuwenhoek foi o primeiro a visualizar microrganismos vivos, com uma lente de vidro, numa poça de água. Construiu e aperfeiçoou inúmeros microscópios e observou e registou inúmeros microrganismos durante a sua vida, aos quais apelidava de pequenos *Animacules*, isto numa época que a teoria da geração espontânea florescia. Essa teoria defendia que os seres vivos mais pequenos apareciam ou nasciam espontaneamente na natureza ou provinham de matéria orgânica em decomposição [Ferreira *et al*, 2010].

O declínio da teoria da geração espontânea (Abiogénese) começou após as experiências de Spallanzani e por aqueles que defendiam que todos os seres vivos descendiam de outros seres vivos já existentes (Biogénese), culminando com as descobertas e experiências de Pasteur, catapultando a microbiologia para a sua época dourada, durante a qual se descobriu a maioria dos microrganismos hoje conhecidos. [Ferreira *et al*, 2010].

O mundo microbiano é, no entanto, bastante vasto, desde bactérias, fungos, microalgas e parasitas que se podem encontrar nos mais diversos ambientes. É de tal modo verdade que, todos os outros seres vivos superiores sem excepção, animais e plantas, são susceptíveis de serem parasitados, colonizados ou “agredidos” por microrganismos. Esses microrganismos podem adquirir especificidades biológicas caracterizadas pela adaptabilidade aos hospedeiros ou ecossistemas em questão. Assim, tais especificidades deram origem a campos de estudo, que não só estudam microrganismos específicos, como também as suas interacções com o meio ambiente e o Homem [Ferreira *et al*, 2010].

Actualmente subdividem-se essas áreas científicas do estudo de microrganismos em:

- **Micologia**, responsável pelo estudo dos fungos;
- **Ficologia**, responsável pelo estudo das algas, de água doce e salgada;
- **Virologia**, responsável pelo estudo dos vírus, que afectam todos os outros seres vivos;
- **Bacteriologia**, responsável pelo estudo das bactérias; [Ferreira *et al*, 2010]

2.3.1 Bacteriologia

Plantae e *Animalia* eram os únicos dois reinos em que os seres vivos eram divididos, algo que veio mudar em 1866 quando Ernst Haeckel propôs a introdução do reino Protista, para incluir então protozoários, fungos, bactérias e algas [Nogueira *et al*, 2009].

Uma proposta muito bem aceita pela comunidade científica da altura, passou a ser a de Robert H. Whittaker, em 1959, composta por cinco reinos: *Monera* (bactérias procariontes e cianobactérias ou algas azuis), *Protista* (protozoários e algumas algas), *Fungi*, *Animalia* e *Plantae*. Já mais recentemente a taxonomia de procariontes sofre uma última alteração, quando em 1990, o microbiólogo Carl Richard Woese nos apresenta o domínio *Archea* (provavelmente as formas de vida mais primitivas do planeta), distinguindo-as das outras bactérias. Passou então a existir uma separação Procarionte pelos domínios *Archea* (as archeobaterias) e *Bactéria* (restantes bactérias) e os Eucariontes (fungos, protozoários, plantas e animais) [Nogueira *et al*, 2009].

A sua grande diversidade metabólica, capacidade de adaptação ao ambiente e a outros seres vivos, aliados à sua fácil proliferação, confere às bactérias um lugar de destaque por parte dos microbiólogos. As suas dimensões não vão além dos micrómetros (μm) e o seu ADN encontra-se condensado num único cromossoma circular [Ferreira *et al*, 2010].

A nomenclatura taxonómica teve o grande contributo do botânico Linnaeus no seu desenvolvimento. Os seus estudos levaram a uma classificação taxonómica organizada em: domínio, reino, filo, classe, ordem, família, género, espécie [Nogueira *et al*, 2009]. A taxonomia é considerada a ciência de classificação, nomenclatura e identificação. As três áreas integrantes desta ciência estão separadas, mas também estritamente relacionadas:

- **Classificação** - organiza os organismos em grupos taxonómicos (*taxa*) tendo em conta as características naturais (relações filogenéticas moleculares) e as características artificiais (características fenotípicas morfológicas e biológicas) [Nogueira *et al*, 2009];
- **Nomenclatura** - atribui nomes aos grupos taxonómicos de acordo com as regras do International Code of Bacterial Nomenclature [Ferreira *et al*, 2010]. A atribuição do nome rege-se pelo sistema binomial de Linnaeus onde diz que o nome de uma espécie bacteriana é constituído pelo nome do género seguido do nome da espécie sendo que a primeira letra do nome do género deve ser maiúscula e o nome completo deve ser escrito em itálico ou em sublinhado [Nogueira *et al*, 2009];

- **Identificação** - distribui os organismos descobertos recentemente pelos grupos taxonómicos [Ferreira *et al*, 2010]. A identificação de um organismo determina as suas características, a sua relação com outros microrganismos, o que permite a sua denominação. A citação de uma espécie que ainda não foi identificada, mas que da qual se conhece o género implica o uso da abreviatura da palavra espécie, “sp”. Se houver a pretensão de referenciar várias espécies não identificadas cujo género é conhecido usamos a abreviatura “spp” que significa “espécies” [Nogueira *et al*, 2009].

As bactérias podem então apresentar-se, morfológicamente, nas seguintes formas (fig. 2.7) :

- **Bastonetes ou bacilos** - Bastonetes longos ou curtos com extremidade reta, ou de ponta arredondada ou ainda curvos, em forma de vírgula. As bactérias que apresentam esta morfologia não apresentam tantos arranjos como os cocos apresentando-se maioritariamente isoladas. Ocasionalmente podem estar agregados aos pares (diplobacilos) ou em cadeias (estreptobacilos). Estas bactérias também podem apresentar arranjos diferenciados, como crescimento em paliçada ou letras chinesas (*Corynebacterium*). Quando os bacilos são muito pequenos, alguns autores referem-nos como cocobacilos;
- **Cocos** - Os cocos podem ser esféricos, elípticos, formato de uma ponta de uma lança, riniformes, etc. De acordo com a divisão celular eles podem aparecer agrupados das seguintes formas: diplococos (cocos agrupados 2 a 2), estreptococos (cocos agrupados em forma de cadeia, similar a um colar de pérolas), tétrades (cocos agrupados 4 a 4), sarcinas (cocos agrupados 8 a 8, similar a um cubo e estafilococos (cocos agrupados de forma aleatória, o que cria uma estrutura semelhante a um cacho de uvas);
- **Espirilos** - Os espirilos apresentam a forma de hélice, saca-rolhas ou espiralar. Normalmente, apresentam-se como células isoladas que apresentam diferenças claras entre si, relativamente ao comprimento, largura, número e amplitude das espirais [Nogueira *et al*, 2009].



Figura 2.7 - Representação de algumas morfologias bacterianas [consultado em <https://biomundo.wordpress.com/category/bacterias/>, a 18 Março 2015]

2.3.1.1 Estrutura da célula Bacteriana

Conhecem-se dois tipos de células, as eucariotas, que apresentam membrana nuclear e as células procariotas que se caracterizam por não possuírem tal membrana. As bactérias são seres procarióticos majoritariamente unicelulares e como referido anteriormente existem dois domínios, o domínio *Bactéria*, também designadas de bactérias “verdadeiras” onde se incluem as patogénicas para o Homem e o domínio *Archea*, consideradas como as bactérias primitivas onde se incluem os extremófilos (capazes de viver em condições extremas de temperatura, pH, salinidade) [Ferreira *et al*, 2010]. Comparativamente a uma célula eucariótica, a estrutura de uma bactéria é bastante simples. O ADN de uma célula bacteriana está presente num único cromossoma circular e enrolado que delimita uma região denominada nucleóide. O ADN pode encontrar-se na forma de plasmídeo que também é circular. Após replicar o seu material genético divide-se por cisão binária, repartindo esse material na formação de uma bactéria idêntica [Ferreira *et al*, 2010].

As bactérias, com a exceção do *Mycoplasma*, formas L e halófilos, apresentam parede celular, formada principalmente por uma macromolécula, o peptidoglicano, que as protege mecanicamente contra rupturas osmóticas em ambientes hipotónicos. As archeobacterias apresentam uma parede celular quimicamente atípica que não possui peptidoglicano [Ferreira *et al*, 2010]

O peptidoglicano é constituído por N-acetil-glucosamina e ácido N-acetil-murâmico, unidos por ligações β -1,4 glicosídicas. Ao ácido N-acetil-murâmico estão ligados quatro resíduos de aminoácidos que permitem um *cross-link* entre o terceiro aminoácido de uma cadeia peptídica e o quarto aminoácido da cadeia peptídica vizinha. Isto permite a formação de várias camadas de peptidoglicano. As arqueobactérias não apresentam ácido N-acetil-murâmico na constituição da parede celular, mas contêm proteínas e/ou polissacáridos [Ferreira *et al*, 2010].

A parede celular é responsável pela morfologia das bactérias e pelo duplo comportamento destas em resposta à coloração de Gram. A coloração de Gram permite a divisão das bactérias em dois grandes grupos, as Bactérias Gram-positivas e as Bactérias Gram-negativas. A parede celular é quimicamente diferente nas bactérias Gram-positivas e nas bactérias Gram-negativas, as Gram-positivas adquirem a cor roxa/violeta enquanto que as bactérias Gram-negativas adquirem a cor vermelha (fucsina básica) [Ferreira *et al*, 2010].

2.3.1.2 Comparação entre Gram-positivas e Gram-negativas

As bactérias **Gram-positivas** apresentam uma parede celular justaposta à membrana citoplasmática e não apresentam periplasma [Ferreira *et al*, 2010]. A parede celular destas bactérias é espessa e rígida, uma das razões que explica a cor arroxeadada que adquirem na coloração de Gram. A rigidez deve-se a cross-links entre as várias camadas de peptidoglicano. Os ácidos teicóicos, os ácidos teicurónicos e os ácidos lipoteicóicos são outros constituintes característicos da parede celular das bactérias Gram-positivas (fig. 2.8). Estas moléculas estão fortemente associadas ao peptidoglicano e são extremamente importantes para a viabilidade das células. Estas estruturas ajudam no controlo da actividade das autolisinas e mantêm a permeabilidade da parede celular [Pommerville, 2011]. A pressão osmótica destas bactérias é bastante elevada (cerca de 20 atmosferas) e qualquer agente que perturbe a estrutura da parede bacteriana irá provocar a lise celular [Ferreira *et al*, 2010]. As bactérias Gram-positivas habitam em ambientes hipotónicos no corpo humano e em meios de cultura sem ocorrer a lise celular devido à rigidez da sua parede celular constituída por peptidoglicano, que representa cerca de 50% a 70% do peso seco desta estrutura (parede celular) [Ferreira *et al*, 2010].

A parede celular destas bactérias é permeável a macromoléculas e, geralmente, não oferece resistência à difusão de antibióticos permitindo que estes promovam as suas propriedades de antibiose por interacção com os seus alvos terapêuticos. Em sentido inverso, as β -lactamases, enzimas hidrolíticas dos antibióticos β -lactâmicos, são excretadas para o meio ambiente sem resistência da parede celular para desempenharem a sua função [Ferreira *et al*, 2010].

As bactérias **Gram-negativas** apresentam uma parede celular onde o peptidoglicano forma uma monocamada. Os ácidos teicóicos, ácidos teicurónicos e os ácidos lipoteicóicos não estão presentes. A camada de peptidoglicano está disposta num espaço intermembranar, o periplasma, e está conectada à membrana externa por lipoproteínas (fig. 2.8) [Ferreira *et al*, 2010] [Pommerville, 2011].

O periplasma é delimitado pela membrana citoplasmática, que o separa do citoplasma da célula, e pela membrana externa, que o separa do espaço extracelular. Na sua composição temos enzimas digestivas e proteínas transportadoras que possibilitam a entrada de nutrientes na célula. A membrana externa apresenta na sua constituição fosfolípidos, lipopolissacáridos (LPS's) e porinas. Os LPS's são polissacáridos ligados a lípidos, em que um deles é conhecido como o lípido A. A associação do lípido A aos polissacáridos origina o O-polissacárido, que identifica estirpes de bactérias. A morte celular de bactérias com este polissacárido específico liberta o lípido A que atua como uma endotoxina quando ingerida. As porinas são proteínas transmembranares que formam poros na membrana externa por onde passam as moléculas hidrofílicas pequenas para o periplasma. As moléculas de maiores dimensões, hidrofóbicas não conseguem atravessar esta membrana, o que explica a resistência destas bactérias a algumas substâncias usadas na defesa do hospedeiro [Ferreira *et al*, 2010; Pommerville, 2011]. A pressão osmótica nestas bactérias é mais baixa (1-10 atmosferas), talvez devido ao seu menor teor em peptidoglicano (menos rigidez). O peptidoglicano tem a função de suporte, impedindo a lise osmótica, neste caso, as lipoproteínas e as porinas da membrana externa cooperam com o peptidoglicano para conferir à bactéria uma resistência mecânica [Ferreira *et al*, 2010].

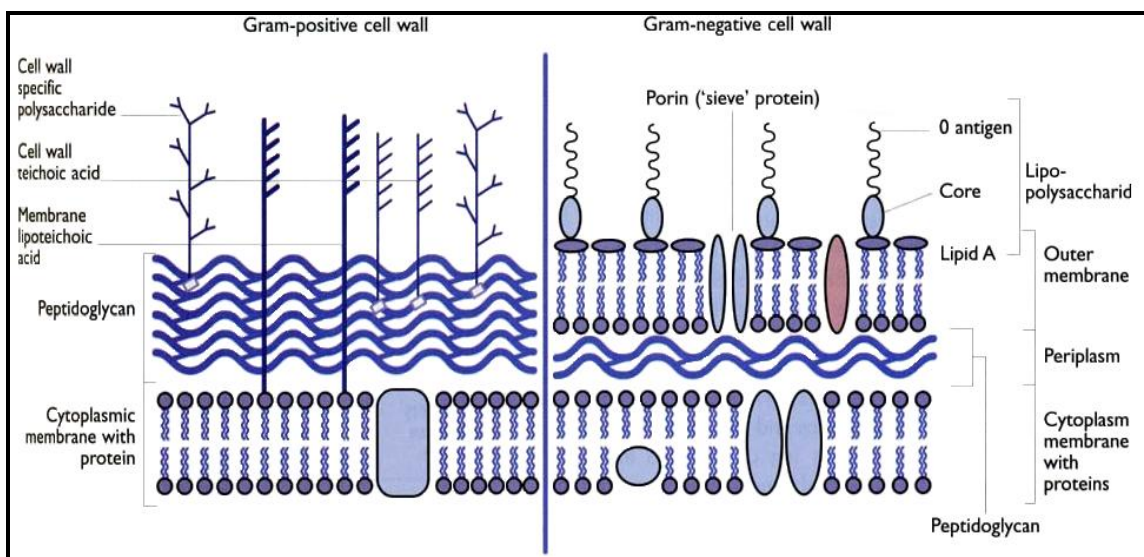


Figura 2.8 - Representação da constituição e estrutura das paredes celulares Gram-positivas e Gram-negativas [Consultado em <http://drugsinfor.blogspot.pt/2010/06/gram-positive-cell-wall-vs-gram.html>, 26 Março 2015].

2.3.1.3 *Escherichia coli*



Figura 2.9 - *Escherichia Coli*

Começou por se chamar *Bacterium coli commune*, após a sua descoberta em 1885 por Theodor Escherich, quando este a isolou de fezes de recém-nascidos. Mais tarde referenciada *Escherichia coli*, ou *E. coli* como é geralmente designada, pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo a mais representativa. É uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-negativa, não esporulada e na sua maioria móveis devido a flagelos peritríqueos. Pertence à flora entérica de mamíferos e aves e, apesar de crescer entre temperaturas de 18 a 44°C, a temperatura de maior proliferação é de 37°C, muito próxima da maioria dos mamíferos [Almeida, 2013]. O tracto gastrointestinal dos hospedeiros é colonizado por *E. coli* algumas horas ou dias após o nascimento. A bactéria é ingerida em comida, água ou obtida diretamente de outros indivíduos que lidam com recém-nascido. Pode persistir durante meses ou anos, depois de se ter estabelecido na mucosa do intestino grosso [Todar, 2002; Tortora *et al*, 2004].

Em meios de nutrientes sólidos as unidades formadoras de colônias (UFC) apresentam cerca de 1-3 mm de diâmetro. De aspecto rugoso ou liso, podem existir colônias intermediárias e mucoides. As colônias rugosas têm aspeto grosseiro e contornos irregulares, já as colônias lisas são convexas, brilhantes e com bordos regulares [Almeida, 2013].

Fisiologicamente a *E. coli* é versátil e bem adaptada ao seu habitat característico. Pode crescer em meios com glucose, como único constituinte orgânico, sendo que o tipo selvagem desta bactéria, pode metabolicamente transformar glucose em todos os componentes macromoleculares que constituem a célula. A bactéria pode crescer na presença ou ausência de O₂, sendo que em condições anaeróbias cresce por meio de fermentação produzindo uma mistura de ácidos e gases como produtos finais. No entanto, também pode crescer por meio de respiração anaeróbia, desde que possa utilizar NO₃ ou NO₂ como aceitadores de eletrões para os processos respiratórios e transporte de eletrões. É desta maneira, que a *E. coli* se adapta, não só ao meio anaeróbio intestinal, mas também em habitats exteriores ao intestino [Todar, 2002; Tortora *et al*, 2004].

A *Escherichia coli* pode responder a sinais ambientais, químicos, variações de pH, temperatura ou molaridade e fá-lo de várias maneiras, isto considerando que é um organismo unicelular. Com complexos mecanismos para regulação do metabolismo, a bactéria pode

procurar os componentes no meio ambiente em vez de sintetizar as enzimas que os metabolizam [Todar, 2002; Tortora *et al*, 2004].

A *Escherichia coli* existe no tracto intestinal do homem e é um organismo facultativo predominante. No entanto está em pequena proporção no total de conteúdo bacteriano. A sua presença regular no intestino e fezes levou a que fosse utilizada como indicadora de poluição fecal e contaminação da água [Todar, 2002; Tortora *et al*, 2004].

Esta bactéria é responsável por três tipos de infeções em Humanos:

- Infeção no tracto urinário;
- Meningite neonatal;
- Doenças intestinais (gastroenterites)

As doenças dependem da distribuição e expressão de determinantes de virulência como é o caso de adesinas, invasinas, toxinas e capacidade para resistir às defesas do hospedeiro [Todar, 2002; Tortora *et al*, 2004].

2.3.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*



Figura 2.10 - *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é um membro da classe *Gamma Proteobacteria* do Dominio *Bacteria* [Todar, 2004]. Constitui a família denominada *Pseudomonadaceae*. Os membros desta família caracterizam-se como bacilos Gram-negativos rectos ou ligeiramente curvos. São bactérias aeróbias estritas e a maioria das estirpes apresenta mobilidade por meio de um ou mais flagelos polares [Todar, 2004; Tortora *et al*, 2004].

Membros deste género são bem conhecidos em estudos microbiológicos, pois este é um dos poucos grupos de bactérias que são patogénicos para as plantas. Tem sido cada vez mais reconhecido, devido ao facto de ser também um dos principais agentes de infeções nosocomiais (hospitalares) [Todar, 2004]. A importância clínica de infeções causadas por *P. aeruginosa* caracteriza-se pela expressão de múltipla resistência a antibacterianos associada a uma difícil erradicação da doença, consequentemente com elevados índices de morbidade e mortalidade [Arruda E.A., 1998].

A bactéria tem um metabolismo que é respiratório, nunca fermentativo, mas cresce na ausência de O₂, se houver NO₂ disponível como receptor final de elétrons. A *Pseudomonas aeruginosa* produz dois tipos de pigmentos solúveis, o pigmento verde fluorescente pioverdina e o pigmento azul piocianina, este último é característico em infecções supurativas causadas por esta bactéria [Todar, 2004; Tortora *et al*, 2004].

É uma das bactérias mais resistentes e que mais rapidamente se desloca, exigindo apenas uma nutrição simples. No laboratório, o meio de cultura mais simples, constituído por acetato como fonte de carbono e sulfato de amónio como fonte de azoto, é capaz de fazer crescer esta bactéria. A temperatura óptima para o seu crescimento é 37°C, mas tem capacidade de crescer a temperaturas mais elevadas atingindo os 42°C. É resistente a altas concentrações de sal e corante, antissépticos fracos e muitos antibióticos frequentemente utilizados [Todar, 2004; Tortora *et al*, 2004].

A sua notável resistência a antibióticos aliada à sua patogenia oportunista, que aproveita falhas nas defesas do hospedeiro para iniciar uma colonização/infecção, são o que a tornam especificamente perigosa. Pode causar doenças como infecções no tracto urinário, sistema respiratório, tecidos moles, osso, articulações, sistema gastrointestinal, também causa dermatites e uma variedade de infecções sistémicas, particularmente em doentes com queimaduras graves, cancro e SIDA (sem sistema imunológico). A infecção por *Pseudomonas aeruginosa* é um problema grave em doentes com cancro, fibrose cística e queimaduras, de tal modo que nestes doentes a taxa de mortalidade é cerca de 50%. São raros os casos de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em indivíduos saudáveis, que não tenham outra situação clínica anterior [Todar, 2004; Tortora *et al*, 2004].

A bactéria é naturalmente resistente a muitos antibióticos devido à permeabilidade oferecida pela membrana externa de gram-negativa que possui. Apenas alguns antibióticos são eficazes contra esta bactéria, como é o caso da Gentamicina, mas não contra todas as estirpes [Todar, 2004; Tortora *et al*, 2004].

2.3.1.5 *Staphylococcus aureus*

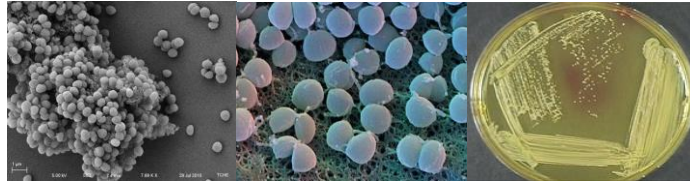


Figura 2.11 - *Staphylococcus aureus*

Em 1884, Friedrich J. Rosenbach descreveu dois tipos de colónias pigmentadas e propôs a nomenclatura que achou adequada: *Staphylococcus aureus* (colónias amarelas) e *Staphylococcus albus* (colónias brancas). *Staphylococcus aureus* é considerada a espécie com maior interesse clínico devido às suas interações com o Homem, sendo agente de uma grande variedade de infeções [Todar, 2005; Tortora *et al*, 2004].

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica, pertencente ao grupo dos cocos Gram-positivos. Apresenta dimensões entre os 0,5 e 1,5 μm de diâmetro, são imóveis, não-esporulados, geralmente não-encapsulados, produz enzima catalase (catalase-positiva), oxidase-negativa. É uma bactéria anaeróbia facultativa que cresce por respiração aeróbia ou fermentação produzindo principalmente ácido láctico [França, 2009]. Quase todas as estirpes de *S. aureus* produzem a enzima coagulase [Todar, 2005; Tortora *et al*, 2004]. Esta bactéria pode apresentar-se em diversas formas (isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente obtendo um especto semelhante ao de um cacho de uvas), devido à sua divisão celular. O *S. aureus* distribui-se amplamente pelo ambiente devido à sua resistência à dessecação e ao frio podendo permanecer viável durante longos períodos de tempo, mesmo em partículas de poeira. Tem o Homem como o seu principal hospedeiro, nomeadamente nas suas fossas nasais, onde se verifica o maior índice de colonização (cerca de 40%), mas também na garganta, no tracto intestinal e pele. Caso as barreiras naturais do organismo estejam comprometidas (mucosas e pele), o *S. aureus* pode alojar-se nos tecidos e provocar lesões locais [Santos *et al*, 2007].

As estirpes de *S. aureus* crescem em meios comuns e ricos, caldo ou ágar simples, a pH=7 sendo a temperatura óptima de crescimento de 37°C. As colónias formadas em placa, após um período de 18-24 horas de incubação, apresentam aspecto arredondado, liso e brilhante. As colónias têm um tom amarelado (de *aureus*, significando “de ouro”, provavelmente devido ao brilho associado com a cor) que aumenta de intensidade à medida que aumenta o tempo de incubação. Um meio usado para identificar *S. aureus* é o meio ágar manitol-sal, selectivo para esta espécie. Esta espécie de bactérias produz a enzima coagulase (converte fibrinogénio (glicoproteína) em fibrina) e essa característica permite o seu crescimento em meios com 7,5% de NaCl, que estimula a produção da enzima em questão [Santos *et al*, 2007].

A patogenicidade do *S. aureus* permite-lhe originar infecções nosocomiais que podem ir de simples infecções, como acne e furúnculos, a infecções graves, como pneumonia e meningite [Santos *et al*, 2007]. As infecções nosocomiais têm sido a principal causa de morbidade e mortalidade, isto porque, quando não tratadas, estas infecções em estado agudo ou piogénico, podem originar bacteremia (presença de bactérias na corrente sanguínea) [França *et al*, 2009]. Além disso, esta bactéria provoca infecções alimentares através da produção de exotoxinas durante o seu crescimento em alimentos contaminados [Santos *et al*, 2007].

As colónias de *S. aureus* existentes em hospitais são, normalmente, resistentes a uma grande variedade de antibióticos. A bactéria desenvolve esta resistência através de mutações nos genes cromossomais, sendo que as bactérias que resistem à mutação adquirem os genes de resistência, por exemplo, através da incorporação destes novos genes num plasmídeo [Todar, 2005; Tortora *et al*, 2004].

2.3.2 Agentes antimicrobianos

Um agente antimicrobiano é definido como um produto químico natural ou sintético que inibe o crescimento ou mata os microrganismos. Os que matam organismos são frequentemente denominados “cidas”, sendo o sufixo “cida” associado a um grupo que indica o tipo de organismo. Assim, conhecem-se agentes bactericidas, fungicidas e virais. Em oposição, existem os agentes que não matam, apenas inibem o crescimento de microrganismos. A nomenclatura usa aqui o sufixo “státicos” (referindo-se a estático ou parado) e denominamo-los então de bacteriostáticos, fungistáticos e viristáticos [Madigan *et al*, 2004].

No caso de bactérias podemos observar ainda um terceiro efeito de agentes antimicrobianos, além do bactericida e do bacteriostático, o bacteriolítico. Um efeito bacteriostático é observado quando o crescimento é inibido sem morte celular, o efeito bactericida mata as células sem que haja a lise ou rutura celular, finalmente, um efeito bacteriolítico induz à morte por lise celular. A ruptura da célula é observada como uma diminuição do número de células ou da turbidez após a adição do antimicrobiano. Os bacteriolíticos incluem os antibióticos que inibem a síntese da parede celular, como a penicilina e também agentes químicos que danificam a membrana citoplasmática [Madigan *et al*, 2004; Nogueira *et al*, 2009].

Como comprovado noutros estudos, os óleos essenciais e os seus metabolitos secundários são conhecidos por demonstrarem actividade contra uma ampla variedade de microrganismos, incluindo as bactérias Gram-negativas e bactérias Gram-positivas [Chung *et al*, 2007].

Os óleos essenciais também são conhecidos por serem ligeiramente mais activos contra Gram-positivas do que Gram-negativas. É talvez de esperar que os organismos Gram-negativos estejam menos sujeitos às acções antibacterianas, já que possuem uma membrana externa em torno da parede celular, como referido anteriormente (Fig. 2.8). Esse facto 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, a partir de uma espécie de planta particular, pode variar (químiotipo) de acordo com a origem geográfica e o período de colheita. É, portanto, possível que a variação na composição entre lotes de óleos essenciais seja suficiente para causar uma variabilidade no grau de susceptibilidade das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [Burt, S., 2004].

2.3.2.1 Antibiótico Gentamicina

A gentamicina é considerado um fármaco de origem natural, sintetizado pela bactéria *Micromonospora purpúrea*. Apresenta-se sob três formas activas, bastante semelhantes, a gentamicina C1 e C1a e a gentamicina C2 (fig. 2.12). Em geral a gentamicina actua sobre um variadíssimo leque de agentes patogénicos Gram-negativos e alguns Gram-positivos, como é o caso dos três microrganismos anteriormente descritos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (uma Gram-positiva). Devido à sua larga utilização terapêutica tem-se assistido a um número crescente de estirpes bacterianas resistentes à gentamicina, predominantemente nas infecções nosocomiais [Sousa, 2006; Pinto, 2014].

Pertencem a um grupo de antibióticos designado por aminoglicosídeos, que são conhecidos por apresentarem uma estrutura química complexa e bastante similares farmacocineticamente, quer na toxicidade quer na actividade antibacteriana. Como exemplos temos a estreptomicina, a gentamicina e a neomicina [Rang *et al*, 2007; Pinto, 2014].

O seu mecanismo de acção foca-se na inibição da síntese proteica bacteriana, ou seja, no interior da bactéria. Comprovou-se o mecanismo ao perceber-se que os aminoglicosídeos atravessavam a membrana celular por transporte activo dependente de oxigénio, quando se concluiu que o cloranfenicol apresentava a capacidade de interromper esse transporte activo e, por conseguinte, o efeito antibacteriano deixava de se verificar [Rang *et al*, 2007; Pinto, 2014].

Os aminoglicosídeos apresentam um efeito bactericida, como já referido, matam sem ocorrência de lise celular. Esse efeito pode ser reforçado por agentes que interfiram com a síntese da parede celular facilitando a entrada destes antibióticos nas células [Rang *et al*, 2007; Pinto, 2014].

2.3.2.2 Antibiótico Penicilina G

A penicilina, tal como a gentamicina, é um produto natural. Produzida pelo fungo *Penicillium notatum* e acidentalmente descoberta em 1928 por Alexander Fleming, ao evidenciar as suas propriedades antibacterianas que criavam zonas (ou halos) de inibição em torno dos fungos por ele cultivados [Sousa, 2006; Pinto, 2014].

Pertence a um grupo de antibióticos designados de β -lactâmicos, que devido à sua eficácia terapêutica e à sua baixa toxicidade para os animais, incluindo o Homem, são considerados os mais importantes recursos para combate bacteriano. Este grupo de antibióticos inclui as penicilinas, os monobactâmicos, as cefalosporinas e os carbapenemos. Todos estes subgrupos dos antibióticos β -lactâmicos apresentam um anel de quatro membros designado por anel β -lactâmico [Pelczar *et al*, 1996; Sousa, 2006].

Devido ao seu impacto e sucesso no tratamento de inúmeras doenças, a penicilina G (fig. 2.12) deixou de ser produzida pelo fungo *Penicillium notatum* para poder satisfazer uma sociedade cada vez mais dependente deste antibiótico. Para tal usam-se hoje mutantes *Penicillium chrysogenum* com elevadas taxas de produção de penicilina, designada também por benzilpenicilina. O seu mecanismo de acção inibe a síntese de peptidoglicano [Sousa, 2006; Pinto, 2014].

Apresenta-se, geralmente, sob a forma de sal sódico ou potássico e quando em solução em soro fisiológico, glucose ou em água, a penicilina G é facilmente destruída ou inibida pelo calor, sendo a sua esterilização efectuada por radiação ou por via gasosa. A penicilina G, praticamente, não apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas [Sousa, 2006; Pinto, 2014].

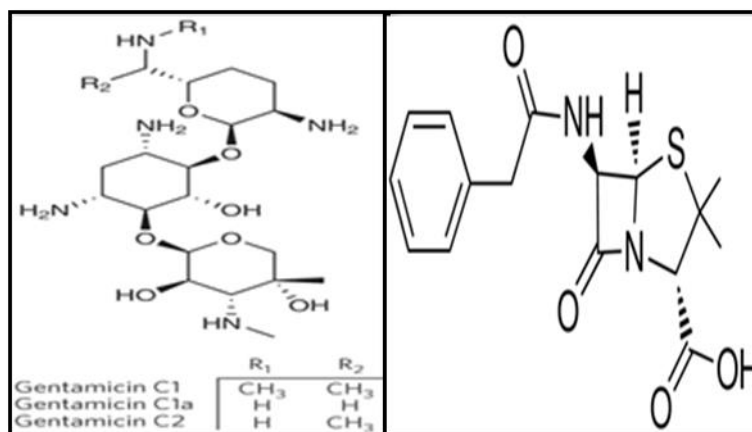


Figura 2.12 - Gentamicina e penicilina

2.4 Avaliação da actividade antimicrobiana

Existem várias técnicas para determinar a sensibilidade à terapêutica antibiótica, mas, basicamente, baseiam-se na determinação da capacidade que um microrganismo tem de se multiplicar *in vitro*, na presença de diferentes fármacos. Seguindo as metodologias da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) os testes de sensibilidade são indicados, na maioria dos casos, quando se acredita que o organismo em causa pertença a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos geralmente usados [Ferreira *et al*, 2010].

As técnicas mais usuais na determinação do efeito antibacteriano dos óleos essenciais são a diluição em caldo (macro e microdiluição), método do efeito do vapor do óleo essencial, métodos de difusão em agar, tais como: perfuração de cavidades em ágar, método de cilindros de aço inoxidável e método de difusão por discos [Ferreira *et al*, 2010]. Estes diferem bastante tecnicamente e existem factores que influenciam os resultados, tais como o tempo de exposição do microrganismo testado, a utilização de controlos positivos e negativos, a composição do quimioterápico entre outros [Nascimento *et al*, 2007].

Todas essas metodologias são também designadas de técnicas de *screening*, e permitem determinar se uma planta, o seu óleo, ou outra qualquer composição química, possui uma actividade antimicrobiana relevante. Essas técnicas abrangem também diversos outros factores de variabilidade operacional, indo dos mais aos menos morosos, necessitando ou não de equipamento específico, dos mais aos menos dispendiosos e outras questões relativas à correcta execução ou adaptação de alguns métodos. Existem poucos estudos que relatam qual o melhor método de *screening* a ser utilizado de acordo com o tipo de extrato e/ou microrganismo a ser testado, mesmo no que se refere às técnicas mais simples [Alves *et al*, 2008].

Os resultados obtidos por estes métodos podem diferir devido a factores como variações entre testes, por exemplo, a solubilidade do óleo ou dos seus componentes e o uso e quantidade de emulsionante, ou como se dá a exposição dos microrganismos ao óleo. Na maioria das pesquisas, as zonas de inibição causadas pelos óleos são comparadas com as obtidas pelos antibióticos, ainda assim, é de evidenciar que tais resultados não devem ser simplesmente comparados, pois as particularidades intrínsecas dos óleos, tal como outras variáveis (o microrganismo teste, o meio de crescimento, ou a técnica usada) devem ser tidas em consideração. Os testes de avaliação antimicrobiana foram padronizados pela CLSI com o intuito de analisar agentes antimicrobianos que sejam uma alternativa aos convencionais antibióticos. Nos testes de actividade antimicrobiana em óleos essenciais, a metodologia proposta pelo CLSI não pode ser seguida *ipsis litteris*, devido às propriedades químicas e físicas que estes apresentam [Nascimento *et al*, 2007].

As substâncias geralmente testadas pelos métodos propostos pelo CLSI têm, modo geral, características hidrofílicas e os ensaios são ou foram padronizados para contemplarem essa condição. Já nos ensaios com óleos essenciais, deve ter-se em consideração as suas particularidades de volatilidade, de insolubilidade em água, de viscosidade e de contemplarem uma enorme complexidade molecular. Acrescendo a tais factores, podem ainda formar uma suspensão turva que impede a determinação visual do crescimento microbiano e por conseguinte a determinação da eficácia antimicrobiana do óleo, podem ainda existir interferências por parte de uma homogeneidade insuficiente dos componentes presentes no óleo. Como exemplo, um problema observado na técnica de difusão por cavidades cilíndricas, é o da difusão irregular devido aos componentes lipofílicos do óleo, num meio constituído maioritariamente por água (agar), fenómeno esse que vai originar zonas de concentração variada dentro da cavidade, durante o período de incubação. Por conseguinte obtêm-se halos de inibição variável e de difícil reprodutibilidade [Nascimento *et al*, 2007].

Toda esta ausência de sistematização e padronização dos testes de sensibilidade inerente ao estudo dos óleos essenciais é uma problemática que causa verdadeiras dificuldades, quer na realização dos ensaios quer na própria interpretação dos resultados obtidos por essas técnicas. Na tentativa de promover a qualidade dos procedimentos com óleos essenciais, tornou-se comum a utilização de solventes, ou agentes emulsionantes, como o Tween 20, Tween 80, DMSO ou o etanol, que facilitam a dispersão dos componentes do óleo no do meio de cultura. É já inquestionável o auxílio que estes emulsionantes nos oferecem na visualização dos efeitos da actividade antimicrobiana, ainda assim, não devemos esquecer as possíveis interacções entre o óleo e o agente emulsionante (a possível sinergia ou da possível antagonia) ou entre o microrganismo e o emulsionante (caso o emulsionante por si só iniba ou mate o microrganismo), assim, recomenda-se uma escolha e uma relação adequada entre o óleo e o emulsionante [Nascimento *et al*, 2007].

2.4.1 Sinergismo e antagonismo

Uma particularidade, recentemente descoberta, e que também acresce aos factores antes mencionados, mostra que a identificação de determinada actividade de um óleo essencial, revelada por um determinado composto, pode ser afectada por um outro, independentemente das suas proporções no óleo. Um efeito acrescido, sinergismo, é observado quando o efeito combinado é igual à soma dos efeitos individuais de cada composto. O antagonismo é observado aquando o efeito de um ou ambos os componentes é menor quando são aplicados em conjunto do que quando aplicados individualmente. Sinergismo é, pois, a verificação do aumento da actividade por parte de dois ou mais compostos quando juntos comparando com a sua acção individual [Burt, S., 2004;].

Geralmente, os componentes em maior abundância refletem as características biofísicas e biológicas dos óleos essenciais dos quais foram isolados, a abrangência dos seus efeitos é apenas dependente da sua concentração, quando testados sozinhos ou incluídos nos óleos essenciais. Assim, a interacção sinérgica das várias moléculas presentes num óleo essencial, em comparação com a acção isolada de um ou dois componentes principais do óleo, parece ser questionável. Ainda assim, é possível que a actividade dos componentes principais seja condicionada por outras moléculas. É também provável que diversos componentes em simultâneo, nos óleos essenciais, desempenhem funções na definição da densidade, da fragrância, da textura, da cor e principalmente, funções na capacidade de penetrar nas células, na atracção lipofílica ou hidrofílica e na fixação nas paredes das membranas de células. Com a enorme diversidade de componentes presentes num óleo essencial, parece de bom senso o estudo de um óleo na sua integralidade do que a algum dos seus componentes em particular, porque o efeito do sinergismo parece ser mais significativo [Bakkali *et al*, 2008; Rocha P. *et al*, 2012].

2.4.2 Métodos e técnicas de avaliação de actividade antimicrobiana

2.4.2.1 Métodos de diluição em caldo

Neste tipo de ensaios é avaliada a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo teste em meio líquido e a concentração da substância em análise. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano. Este método, que envolve principalmente duas técnicas, macrodiluição e microdiluição, foi um dos primeiros a ser utilizado na avaliação da sensibilidade aos agentes antimicrobianos [Ostrosky *et al*, 2008].

O método de diluição em caldo é um método quantitativo não influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos, como controlo positivo utiliza o caldo (meio de cultura) com o antimicrobiano padrão (antibiótico conhecido) e com a suspensão microbiana padronizada, como controlo negativo o caldo com o solvente (quando usado) e a suspensão microbiana padronizada [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 CMI's são excelentes ferramentas para determinar a suscetibilidade dos organismos frente a agentes antimicrobianos [Alves *et al*, 2008]. Propôs-se então uma classificação para matérias vegetais com base nos resultados da CMI, utilizando a técnica de microdiluição, considerando como: Forte inibição - CMI até 500 µg/mL; Inibição moderada - CMI entre 600 e 1500 µg/mL; Fraca inibição - CMI acima de 1600 µg/mL;

É, ainda, possível avaliar atividade bactericida pelos métodos das diluições em caldo. A Concentração Mínima Bactericida (CMB), que segundo estes métodos, representa um índice artificial da atividade bactericida [Barry *et al*, 1999; Pinto, 2014].

2.4.2.1.1 Macrodiluição

A macrodiluição envolve a preparação e realização de diluições seriadas e logarítmicas de microrganismos (*p.e.*, 1, 2, 4 e 8 µg/mL) num meio de cultura líquido, o qual permitirá o crescimento bacteriano. Inicialmente, é preparada uma serie de tubos com as concentrações desejadas do antimicrobiano teste. A serie é composta de oito ou mais tubos contendo as concentrações do agente antimicrobiano e o meio de cultura, num volume final de 1 a 2 mL por tubo, além dos tubos de controlo positivo e negativo. Os tubos contendo antimicrobianos são inoculados com uma suspensão bacteriana padronizada em torno de 5×10^6 unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL). Após o período de incubação de 24 horas, a 37°C, os tubos são inspecionados visualmente para evidenciar o crescimento bacteriano, traduzido pela turbidez. De seguida determinam-se as CMI e CMB, examinando os tubos visualmente ou com aparelho de leitura óptica [Ostrosky *et al*, 2008; Pinto, 2014].

2.4.2.1.2 Microdiluição

A microdiluição em caldo corresponde à padronização comercial da técnica de diluição. A microdiluição em caldo utiliza placas de Elisa estéreis, com 96 poços, com o fundo em formato de “U”, permite a melhor visualização do crescimento bacteriano. A vantagem deste método, em relação ao da diluição em tubos, é que numa placa pode testar-se uma bactéria utilizando um número variável de agentes antimicrobianos, cerca de 12, com distintas concentrações (4 a 8 diluições logarítmicas). As placas de microdiluição podem já conter o agente microbiano liofilizado/congelado e são inoculadas com o auxílio de uma micropipeta ou outro dispositivo similar, para obter uma concentração bacteriana final de aproximadamente 5×10^4 - 5×10^5 UFC/mL em cada poço da placa de microdiluição. Através destes ensaios pode obter-se a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) [Ostrosky *et al*, 2008].

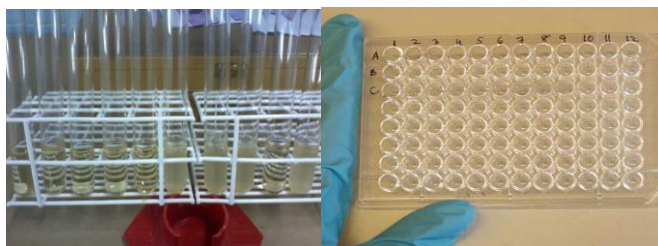


Figura 2.13 - Visualização da montagem das diferentes técnicas, à esquerda macrodiluição em tubos e à direita uma placa Elisa de 96 poços usada em microdiluição [Adaptado de Richard B. S., Mark W. H.: The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action]

2.4.2.1.3 Teste da resazurina

Testado pela primeira vez por Pesch e Simmert em 1929, para estimar o conteúdo bacteriano em leites, tem sido desde a década de 50 usado regularmente para estimar contaminações bacterianas ou fúngicas em leites e fluidos biológicos. O seu nome original era *Alamar Blue*, antes de se usar como indicador de proliferação celular *in vitro*. Há uma correlação directa entre a redução da Resazurina no meio de cultura e a quantidade (ou crescimento) de células viáveis, essa relação varia entre as células bacterianas e as células de mamíferos. Resumidamente o que sucede é a redução da Resazurina (cor azul) a Resorufina (cor rosa) passando de seguida a Dehidroresorufina (incolor). É preparada em soro fisiológico (NaCl a 0,85%, esterilizado por filtração) numa proporção 1:100, podendo ser armazenada a 4°C durante 1 semana [Pombo, 2011].

Uma mudança de cor azul (estado oxidado) para rosa (estado reduzido) indica crescimento bacteriano e a concentração mínima inibitória (CMI) é definida como a concentração mais baixa de antibacteriano que impeça essa mudança de cor [Pombo, 2011].

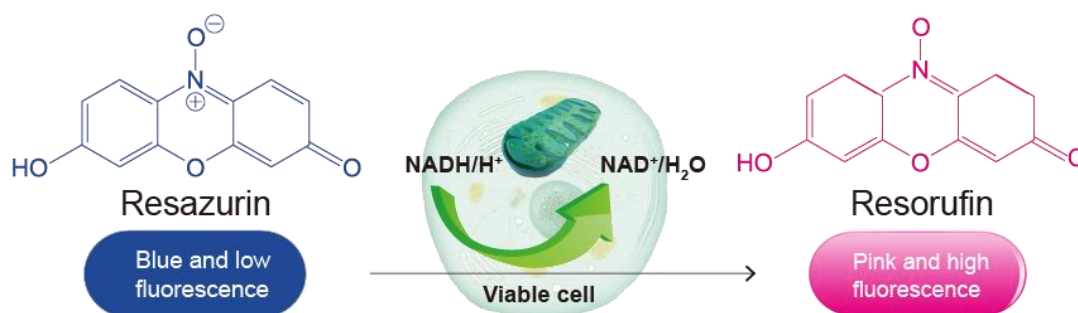


Figura 2.14 - Resazurina na forma oxidada (azul) na esquerda, convertida em células na sua forma reduzida (rosa), a resorufina na direita [consultado em <http://www.biotoool.com/product/vita-blue-cell-viability-reagent.html>, a 23 abril 2015]



Figura 2.15 - Exemplos de ensaios realizados neste trabalho, após a adição da resazurina, azul sem crescimento, rosa com crescimento bacteriano.

2.4.2.2 Métodos de difusão em placa de agar

Estes métodos consistem na utilização de um suporte nutritivo sólido, com a consistência de um gel, existem vários, consoante o meio nutritivo que se deseje ou para o microrganismo em questão (Muller-Hinton, Sabouraud, entre outros). Sobre esse suporte testam-se métodos físicos de difusão, desafiando um microrganismo contra uma substância biologicamente activa. As inoculações destes meios são, geralmente, feitas numa placa de Petri onde o ágar, ainda líquido, é depositado e deixado a solidificar, actualmente já se usam placas de Petri com o respectivo agar já preparado e pronto a usar. A avaliação da actividade é feita por comparação entre o halo de inibição em volta de um disco embebido ou cavidade contendo a substância teste e o halo de inibição de uma substância da qual se conhece a actividade antibacteriana [Ostrosky *et al*, 2008; Ferreira *et al*, 2010].

As alterações na constituição do agar ou a sua incorrecta preparação, a sua espessura na placa de Petri, uma densidade de inóculo não adequada, temperaturas demasiado elevadas ou tempo de incubação excessivo, erros de medição de halos de inibição, contaminações ou outras interacções que possam existir com o agente antimicrobiano, são factores que interferem com a interpretação dos resultados [Alves *et al*, 2008].

Tendo em consideração as dimensões dos halos, podemos classificar o microrganismo de :

- **Sensível** - Se o diâmetro do halo de inibição for superior a 3 mm;
- **Medianamente sensível** - Se o diâmetro do halo de inibição estiver compreendido entre os 2 e os 3 mm;
- **Resistente** - Se o diâmetro do halo de inibição for menor ou igual a 2 mm; [Ostrosky *et al*, 2008]

Como controlo positivo é usado um agente quimioterápico padrão com actividade antimicrobiana reconhecida e como controlo negativo é usado o solvente utilizado para a diluição da substância em estudo. As temperaturas e o tempo aconselháveis para incubação podem variar dependendo do microrganismo, geralmente, para bactérias as temperaturas rondam os 35-37° C com tempos de incubação entre 24 e as 48 horas [Ostrosky *et al*, 2008].

2.4.2.2.1 Perfuração de cavidades cilíndricas

Na perfuração de cavidades (também designadas de poços), o agar é perfurado com um utensílio de aço inoxidável estéril, um segmento cilíndrico oco, capaz de remover um segmento cilíndrico de agar do meio (já inoculado), criando uma cavidade com 5 mm de diâmetro por 4 mm de altura, a qual é posteriormente preenchida com a substância que se deseja testar [Ostrosky *et al*, 2008].

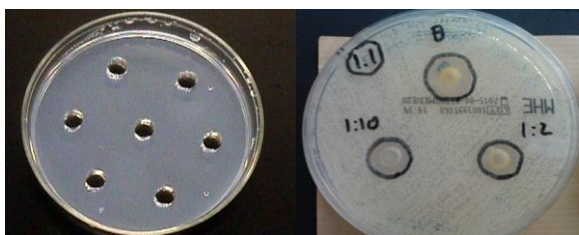


Figura 2.16 - Exemplos de agar com cavidades, na direita após ensaios

2.4.2.2.2 Cilindros de aço inoxidável

Método desenvolvido por Abraham *et al* em 1941 e mais tarde modificado por Schmidt e Moyer em 1944, ambos na perspectiva de testarem a difusão de antibióticos ao colocar cilindros ocos de aço sobre o meio agar já inoculado e preenchendo-os com o antibiótico em questão. Produzem-se halos de em torno da base do cilindro, dependendo da concentração do antibiótico e é um procedimento típico na aferição de soluções farmacêuticas, nomeadamente de penicilina. São usados também cilindros de porcelana ou vidro, ambos com as mesmas dimensões dos de aço inoxidável, 8 mm diâmetro exterior e 6 mm de diâmetro interior, altura de 10 mm e são depositados, geralmente, 6 por placa de 20x100 mm equidistantemente. Já existem dispensadores que efectuam esta tarefa, garantindo a equidistância e não danificando o agar, mas também garantindo as condições de esterilidade (fig. 2.16). Na adaptação desta técnica, aos óleos essenciais, são colocados sobre o agar cilindros com dimensões similares às da perfuração em agar. É assim criado um depósito de aço inoxidável sobre o agar, o qual é posteriormente preenchido com a substância teste [Ostrosky *et al*, 2008].



Figura 2.17 - Na esquerda, dispensador e placas dispensadas, na direita um exemplo de ensaio com halos de inibição [consultado em <http://www.tsh.co.in/EqGen.html>; Ahmed A. *et al*, 2012]

2.4.2.2.3 Difusão em discos de papel

Na difusão em discos de papel, aplicam-se 10 µl de diferentes concentrações da substância antimicrobiana a testar sobre os discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro que são depositados sobre o agar inoculado com o microrganismo a testar. A sua distância até à lateral da placa e a outros discos deve ser maior que 15 mm, 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 altura recomendada é de aproximadamente 4 mm. [Ostrosky *et al*, 2008].

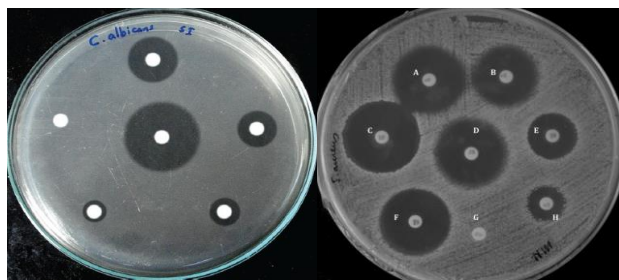


Figura 2.18 - Exemplos de ensaios de difusão por discos de papel [Adaptado de Barani K. *et al*, 2014; <http://labs.7bscience.com/lab-3---antibiotics.html>]

2.4.2.2.4 Efeito de vapor do óleo essencial em placa de agar

Para verificar se o vapor de um determinado óleo exerce actividade sobre o microrganismo teste, numa placa já com um meio inoculado, coloca-se, na tampa da mesma, uma porção do óleo a testar e, passando a tampa a ser a base da placa, coloca-se o meio inoculado por cima (placa de agar invertida). Uma adaptação reportada é a de utilizar discos de papel estéreis, saturados com óleo a testar e colocados no centro da tampa da placa. Incuba-se, invertida a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24h [Lisin *et al*, 1999; Ostrosky *et al*, 2008].

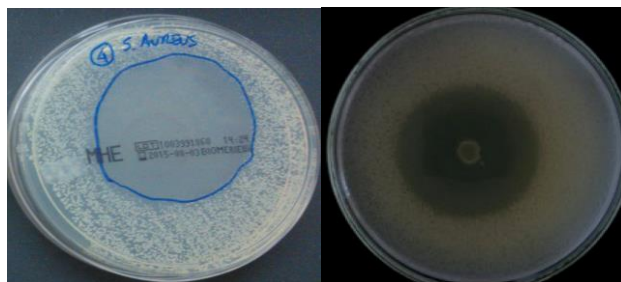


Figura 2.19 - Exemplos de ensaios pela técnica de vapor e os halos de inibição causados

2.4.3.3 Interferentes nos métodos de avaliação antibacteriana

Apesar de se terem vindo a desenvolver cada vez melhores e mais aperfeiçoados métodos de avaliação *in vitro*, que produzem resultados mais reprodutíveis e confiáveis, no caso dos óleos essenciais isso tem-se provado uma tarefa árdua. Em grande parte, isso deve-se às peculiaridades que os óleos apresentam, não só pela sua complexidade química, mas também pela sua volatilidade e insolubilidade em água, factores que interferem significativamente nos resultados, tornando-os de difícil comparação com outros estudados [Nascimento *et al*, 2007]. As metodologias de *screening* já sofreram diversas alterações com intuito de obter resultados mais confiáveis. Mas mesmo sabendo que alguns factores são controláveis, tais como a composição dos meios de cultura, os microrganismos, o pH, a disponibilidade de oxigénio, a preparação do inóculo ou as condições de incubação e que são conhecidos por influenciar os resultados, torna-se ainda assim, difícil padronizar um método [Alves *et al*, 2008].

Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados têm o intuito de promover o crescimento de microrganismos em condições laboratoriais. Não devem conter substâncias que afectem a actividade da substância a estudar. Deve evitar-se a formação de estrias, bolhas, brechas, ou qualquer outra irregularidade ao verter o meio líquido e até que solidifique nas placas de Petri, visto que a espessura, a concentração e a uniformidade do agar afectam consideravelmente os resultados dos ensaios de difusão. O meio Müller-Hinton agar é o mais citado. Considera-se que este é o melhor meio para testes de sensibilidade a antibióticos contra bactérias devido à sua boa reprodutibilidade e possuir baixos teores de inibidores [Ostrosky *et al*, 2008].

pH

O pH influencia de forma acentuada o crescimento microbiano, tendo quase cada espécie um valor ideal ou um intervalo de pH onde a taxa de proliferação é máxima ou óptima. Dentro de uma gama de crescimento segundo o pH, existem os microrganismos acidófilos com crescimento ideal a pH entre 1,0 e 5,0, os neutrófilos entre 5,5 e 8,0, os alcalófilos entre 8,5 e 11,5 e os alcalófilos extremos com pH acima de 10. O metabolismo celular é perturbado ou alterado quando se dão variações bruscas no pH citoplasmático, podendo inibir a actividade enzimática, proteínas de transporte membranar e causando inviabilidade de diversas funções celulares [Ferreira *et al*, 2010]. Nesta perspectiva, deve seleccionar-se um meio ou meios com gamas de pH adequadas ao crescimento do microrganismo teste e que também não interfiram com as actividades das substâncias a ser testadas, por exemplo, um meio com acidez elevada diminui a actividade microbiana de substâncias com carácter básico, como a estreptomicina, mas intensifica a actividade de

substâncias ácidas como a penicilina. Elevadas concentrações de CO₂ na atmosfera circundante alteram significativamente o pH da superfície dos meios, devendo ser evitadas [Ostrosky *et al*, 2008].

Oxigênio

O oxigênio, O₂, é uma molécula quase universal em ambientes celulares e está sempre a ser fornecido pelas grandes quantidades de água que esses ambientes celulares necessitam. Contudo, as células procariotas apresentam um grande leque de respostas metabólicas face ao oxigênio molecular disponível. Essas adaptações diferenciam-nas em:

- **Aeróbias estritas**, que necessitam de O₂ para crescimento e usam-no metabolicamente como receptor final de electões;
- **Anaeróbias estritas**, que não necessitam nem usam O₂ como nutriente, aliás, o O₂ é para estas bactérias uma substância tóxica, que as mata ou inibe o crescimento. Subsistem por fermentação, respiração anaeróbia, fotossíntese bacteriana ou pelo ainda não muito conhecido processo de metanogenese;
- **Anaeróbias Tolerantes**, usam um metabolismo exclusivamente fermentativo mas, ao contrario das anaeróbias estritas, são insensíveis à presença de O₂. Vivem por fermentação quer o O₂ esteja ou não presente;
- **Anaeróbias Facultativas**, têm um metabolismo preferencial, mas podem alternar entre os dois tipos de metabolismo, quando na ausência de O₂, usam fermentação ou respiração anaeróbia, na presença de O₂ mudam para respiração aeróbia;
- **Microaerofilas**, são aeróbias e necessitam de oxigênio, no entanto, crescem somente em ambientes cuja concentração de oxigênio é inferior à existente no ar. Quando em meio liquido, não crescem junto da superfície, onde o oxigênio ainda se difunde com alguma facilidade, nem junto do fundo do recipiente onde a ausência de oxigênio é expectável, têm uma zona de crescimento dependente da concentração de O₂. Esta tolerância parece dever-se à sua sensibilidade a radicais superóxidos ou peróxidos que tendem a formar-se em ambientes muito oxigenados [Tortora *et al*, 2004].

Preparação e padronização do inóculo

A susceptibilidade dos microrganismos frente a agentes antimicrobianos está implicitamente relacionada com a quantidade de inóculo. Essa quantidade de inóculo deverá ser padronizada para cada procedimento. Nos casos de crescimento em placa, a padronização é ajustada a 10^6 UFC/mL, o que garante um bom crescimento e proliferação na superfície do agar, permitindo uma boa visualização da possível inibição. Para testes de diluição em caldo ajusta-se a padronização para 10^8 UFC/mL [Ostrosky *et al*, 2008].

Para métodos de diluição e difusão a preparação do inóculo deve ser feita a partir de 4 ou 5 colónias da cultura pura do microrganismo a testar. A suspensão deve ser lida fotometricamente, certificando que atinge o valor de 0,5 na escala MacFarland, o que corresponde a uma densidade de aproximadamente 10^8 UFC/mL. O inóculo pode continuar a ser ajustado fotometricamente ou por diluição padronizada do caldo nutriente, se a densidade de tais culturas for razoavelmente constante. Após obter a padronização desejada, o inóculo deve ser aplicado nos meios de cultura num intervalo de até 30 min. [Ostrosky *et al*, 2008].

Condições de incubação

Quer nos métodos com meios sólidos, quer nos métodos em caldo, as temperaturas de incubação para bactérias oscilam entre os 35-37°C, com premissa de que os meios em caldo deverão fazê-lo sob constante agitação quando assim for exigido. Por vezes esta simples etapa é bastante limitante, por exemplo no caso particular de uma estufa, quer seja pelo facto de ser necessário algum espaço (caso da macrodiluição, series de tubos), quer pelo facto de quando em meio sólido, se incubam placas, que são bastante susceptíveis a variações de temperatura, inviabilizando o uso da estufa para outros usos correntes a fim de minimizar oscilações na temperatura, ou ainda, se não se possuir uma estufa com agitação, caso necessária [Ostrosky *et al*, 2008].

Capítulo 3

Objectivo

O objectivo deste trabalho foi testar a potencial actividade antimicrobiana de três quimiotipos de óleos essenciais de *Lippia alba* através dos métodos de difusão por poços em agar e pelo efeito do seu vapor em placa, medindo os halos de inibição. Posteriormente determinar as suas Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) e Concentrações Mínimas Bactericidas (CMB) pelo método de macrodiluição em caldo. Os microrganismos teste foram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados são comparados com os de agentes antibactericidas conhecidos, a penicilina e a gentamicina, e servirão para decidir uma futura e mais aprofundada análise dos seus constituintes.

Capítulo 4 - Material e procedimentos

4.1 Óleo essencial de *Lippia alba*

Os óleos destas *Lippia alba*, são provenientes da Argentina, são extraídos das folhas e ramos das plantas, por extracção por arraste de vapor a nível industrial. Caracterizados por GC-ME (Fig. 4.1) e gentilmente cedidos pelo Professor Doutor Jesus Miguel L. Rodilla, do laboratório de produtos naturais, Departamento de Química da Universidade da Beira Interior. Obteve-se a densidade dos óleos e realizaram-se as diluições de 1:2 e de 1:10 em DMSO.



Figura 4.1 - Na esquerda extracção de óleos essenciais por arraste de vapor, na direita GC-ME
[Adaptado de: <http://aromalandia.com.br/extracao/html>; <http://english.qibebt.cas.cn/rs/fs/>].

4.2 Meios de Cultura

Nestes testes foram utilizados meios de cultura Muller Hinton agar (MH2-Ref. 43301; BioMérieux SA) (Figura 4.2). O meio MH2 é um meio que já se encontra preparado em placas e que possui 4 mm de espessura. Em alguns ensaios, procedeu-se a uma repetição em placas de vidro com meio preparado no momento do ensaio, Muller Hinton agar e garantindo uma espessura de 4 mm. Tal facto deveu-se à forte interacção que alguns óleos tiveram com o plástico das placas comerciais, derretendo e até perfurando a placa durante o período de incubação.

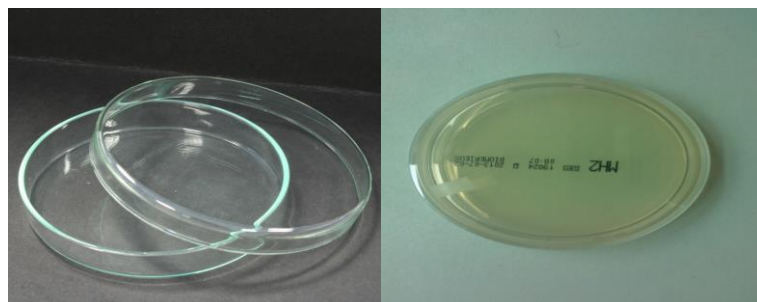


Figura 4.2 - Placas de vidro utilizadas para depositar o meio. Na direita, meios de cultura agar em placa, o meio utilizado (MH2).

4.3 Microrganismos teste

Os microrganismos usados nesta avaliação antimicrobiana foram reconstituídos no BR-Laboratório Ambiental e Alimentar Lda, provenientes da American Type Culture Collection (ATCC), distribuídos por *Culti-loops*® (OXOID LDA.) (Figura 4.3). Em questão, foram o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923/Lote 902840), a *Escherichia coli* (ATCC 25922/Lote 931370) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853/Lote 931372) (mantidas entre 2-8°C). Estas estirpes permitem assim, facilmente, a obtenção de culturas padronizadas para teste.

Como mencionado anteriormente a escolha recaiu nos seguintes parâmetros, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), representante da flora humana superficial, *Escherichia coli* (ATCC 25922) representante da flora intestinal, e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) uma bactéria ubíqua representativa do meio ambiente.

Como a partir de cada estirpe ATCC se podem realizar várias inoculações, foram efectuadas culturas puras (designadas Culturas mãe) (Figura 4.4) de cada estirpe ATCC a testar em placas com meio Muller-Hinton (MH2) que incubaram durante 24h e posteriormente foram armazenadas (2-8°C). As estirpes originais ATCC foram devidamente armazenadas.



Figura 4.3 - Estirpe ATCC, na direita a zaragatoa que traz a estirpe liofilizada na ponta.



Figura 4.4 - Culturas Mãe após incubação, da esquerda para a direita, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*.

4.4 Densidade do inóculo

Como a densidade do inóculo influencia o resultado dos ensaios, 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 para obtenção das placas mãe, inocularam-se a partir destas últimas, pelo método de estrias, três novas placas de MH2 (uma para cada microrganismo). Estas placas irão designar-se placas de trabalho, das quais se retirarão colônias para padronização. As placas mãe serão a fonte de todos os ensaios que se tenham que repetir, salvaguardando assim o uso das estirpes ATCC.

As placas de trabalho incubaram-se a 37 ± 1 °C durante 24 h. Retiraram-se algumas colônias isoladas do microrganismo a testar para soro fisiológico, de modo a obter uma turvação correspondente ao padrão de McFarland de 0,5 ($\cong 10^8$ UFC/ml, num comprimento de onda de 550 nm, T-74,9%, A-0,125).

As padronizações dos inóculos, na escala McFarland, foram medidas com auxílio de um aparelho para o efeito, DENSIMAT - Densitómetro de faixa entre 0,5 e 7,5 na escala de McF (Cód. 99234 BioMérieux) (Figura 3.5). O densitómetro é activado simplesmente pela colocação do tubo com a suspensão no compartimento de leitura. A densidade bacteriana é medida de imediato e é directamente proporcional à densidade da suspensão expressa em unidades de MacFarland (0,5 correspondente a 10^8 UFC/mL). De seguida, diluiu-se a suspensão de 10^8 UFC/mL para $\cong 10^6$ UFC/mL, adequada para testes com bactérias. Utilizou-se sempre como solução de diluição soro fisiológico estéril (solução salina estéril a 0,85%). Todo este processo foi realizado numa câmara de segurança biológica e na presença de chama.



Figura 4.5 - Na esquerda fotómetro de medição da turvação pela escala McFarland para padronização de inóculos; na direita tubos com suspensões bacterianas.

4.5 Métodos de difusão em agar

A avaliação da actividade antimicrobiana foi realizada através do método de difusão em meio sólido agar, quer por método de cavidades cilíndricas (poços) com uma altura de 4 mm e diâmetro de 5 mm, quer pelo método do efeito de vapor. Estes métodos permitem-nos ter uma ideia da potencial actividade antimicrobiana do óleo essencial em estudo, através da leitura dos halos de inibição. Como controlos positivos, utilizaram-se os antibióticos penicilina na concentração de 0,05 mg/ml (acção contra Gram-positivos) e gentamicina na concentração de 10 mg/ml (acção de largo espectro). Como controlo negativo foi utilizado o DMSO.

4.5.1 Difusão em agar por perfuração de cavidades cilíndricas

A partir da suspensão inoculada com o microrganismo a testar, espalhou-se a mesma uniformemente com um swab (zaragatoa) estéril sobre a placa de agar MH2 (tendo o cuidado de eliminar o excesso de inóculo). Deixou-se em repouso durante 15 minutos, de modo a que o meio de cultura absorvesse o inóculo. De seguida, procedeu-se à realização dos poços com o dispositivo adequado, foram preenchidos com 70 μ L dos óleos essenciais, do controle negativo e do controlo positivo (Figura 4.6).

Após um período de repouso de 15 minutos à temperatura ambiente, as placas foram incubadas a uma temperatura média de 37°C durante 18-24h. Após este período de incubação, foram anotados os resultados. Todo este processo foi realizado em condições de esterilidade.



Figura 4.6 - Da esquerda para a direita, utensilio para realização de poços, aspecto de placa inoculada *S. aureus* com poços contendo as fracções de óleo a testar antes de incubar, aspecto da placa de controlos *E. coli* antes de incubar.

4.5.2 Difusão em agar por efeito de vapor em placa

O protocolo prático foi realizado do seguinte modo: espalhou-se, uniformemente, com uma zaragatoa estéril, a suspensão do microrganismo a testar sobre a placa de agar. Deixou-se em repouso durante 15 minutos de modo a que o meio de cultura absorvesse o inóculo. De maneira a realizar um teste comparativo (volume de óleo a testar) com o método de difusão em agar, adicionou-se 70 µl do óleo no centro da tampa da placa de Petri a uma distância de 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. Este processo foi realizado em condições estéreis.

4.5.3 Determinação de Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida por macrodiluição em caldo

A determinação das CMI e CMB foram obtidas com recurso ao método de diluição em caldo, técnica macrodiluição, como descrito em capítulos anteriores. O exemplo em baixo foi similar ao efectuado, iniciando a sequência na diluição 1:4 (fig. 4.7).

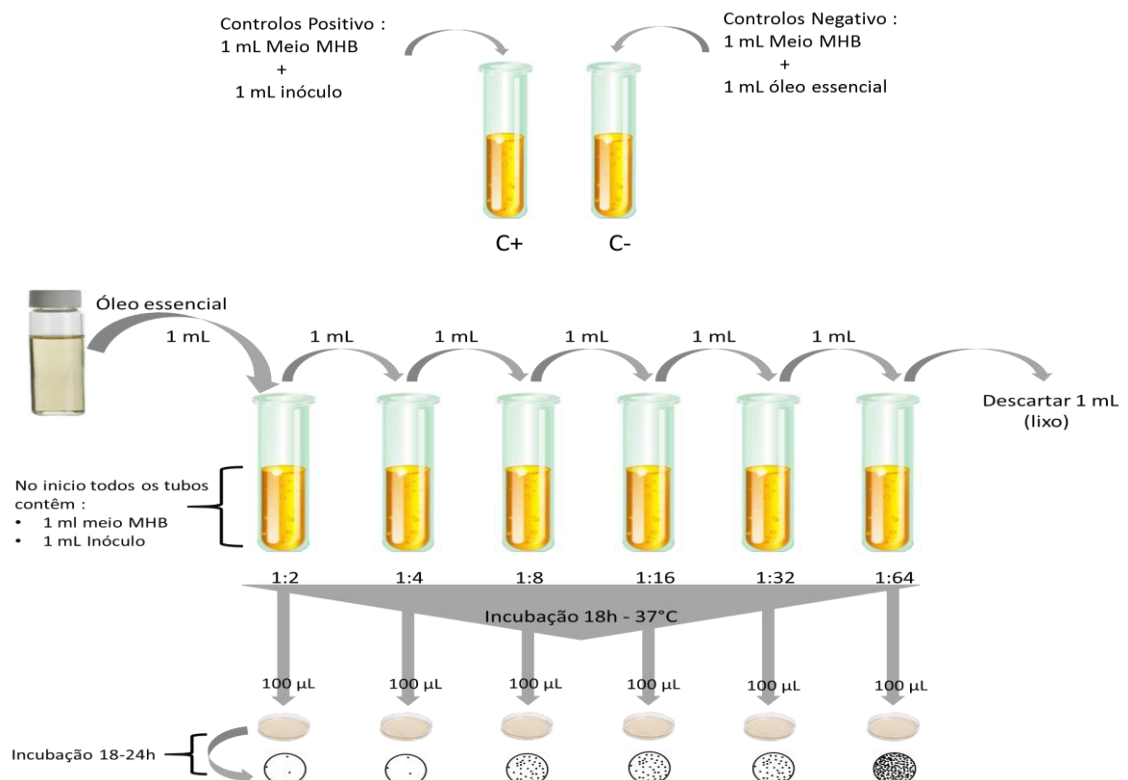


Figura 4.7 - Exemplo de esquema seguido durante o trabalho efectuado.

Capítulo 5 - Resultados e discussão

5.1 Constituição dos óleos essenciais de *Lippia alba*

Após a extracção e a realização da GC-ME obtiveram-se os cromatogramas (Figura 5.1, 5.2 e 5.3) que permitiram a identificação dos principais compostos (Tabelas 5.1, 5.2 e 5.4). Os dados da composição dos óleos testados, informações referentes à extracção e aos seus componentes, foram amavelmente cedidos pelo Prof. Dr. Jesus Miguel L. Rodilla, Departamento de Química da Universidade da Beira Interior.

Linalol (I)

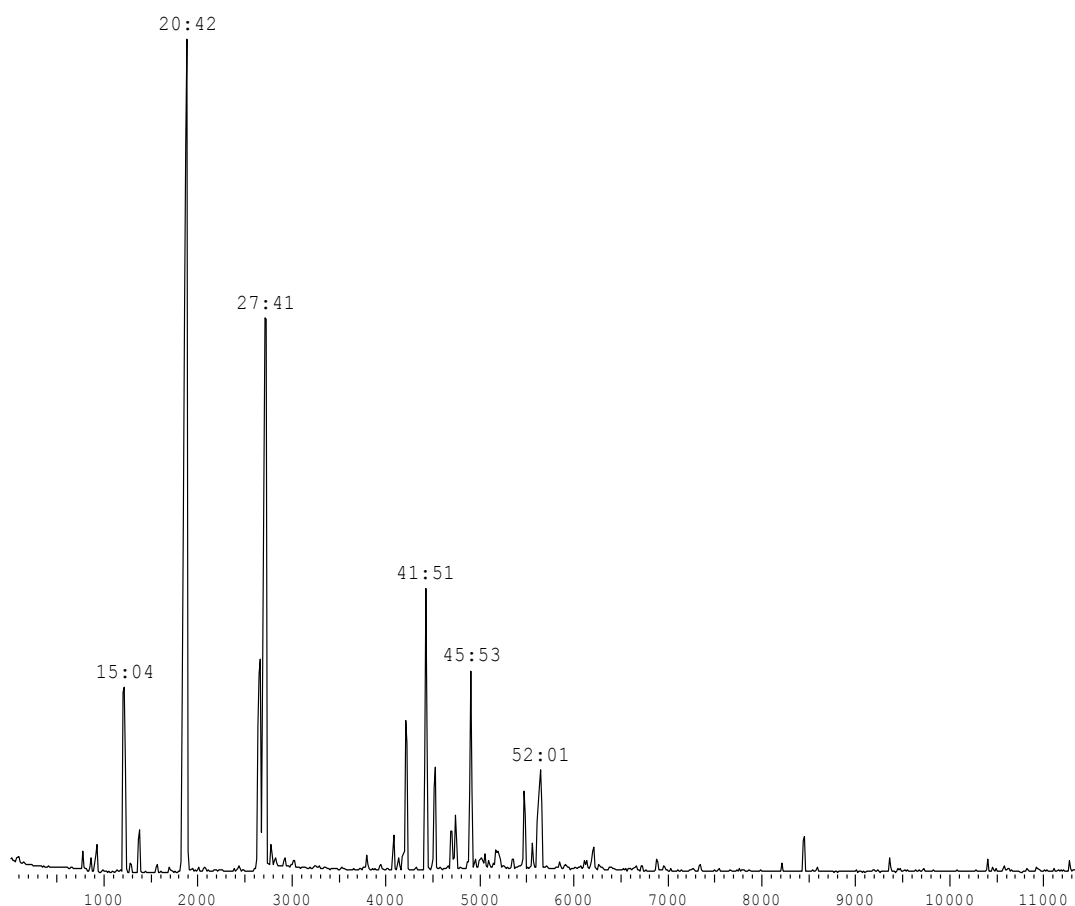


Figura 5.1 - Cromatograma obtido por GC-ME, do óleo essencial de *Lippia alba*, Linalol (I)

Tabela 5.1 - Principais compostos presentes no óleo de *Lippia alba*, químiotipo Linalol (I)

Nº	Tempo retenção	Componente	lão Molecular (M ⁺)	%
1	11:26	Sabineno	136,10	0,16
2	12:11	1-octen-3-ol	128,00	0,15
3	12:36	Mirceno	136,10	0,29
4	15:04	L-limoneno	136,20	3,55
5	15:13	1,8-cineol	154,20	1,50
6	15:43	Cis-ocimeno	136,10	0,12
7	16:25	<i>trans</i> - β -ocimeno	136,10	0,49
8	18:00	Óxido de linalool	170,10	0,13
9	20:42	L-linalool	154,30	38,48
10	27:09	dihidrocarvona	152,30	7,96
11	27:41	Isómero dihidrocarvona	152,20	18,94
12	28:07	Acetato de sabinilo	194,00	0,57
13	38:59	α -copaeno	204,10	0,54
14	39:52	Germacreno-D	204,20	0,52
15	40:05	β -elemeno	204,00	2,66
16	41:51	β -cariofileno	204,30	5,26
17	42:41	Germacreno-B	204,30	1,63
18	44:07	α -humuleno	204,10	0,64
19	44:22	<i>trans</i> -cariofileno	204,10	0,10
20	44:31	(z)- β -farneseno	204,10	0,99
21	45:53	β -cubeneno	204,30	3,86
22	50:35	γ -elemeno	204,20	1,30
23	51:20	Nerolidol	222,00	0,53
24	51:53	δ -cadinol	222,00	3,19
25	52:01	Óxido de cariofileno	220,00	1,20
26	56:47	Não identificados	220,00	0,80

Dihidrocarvona

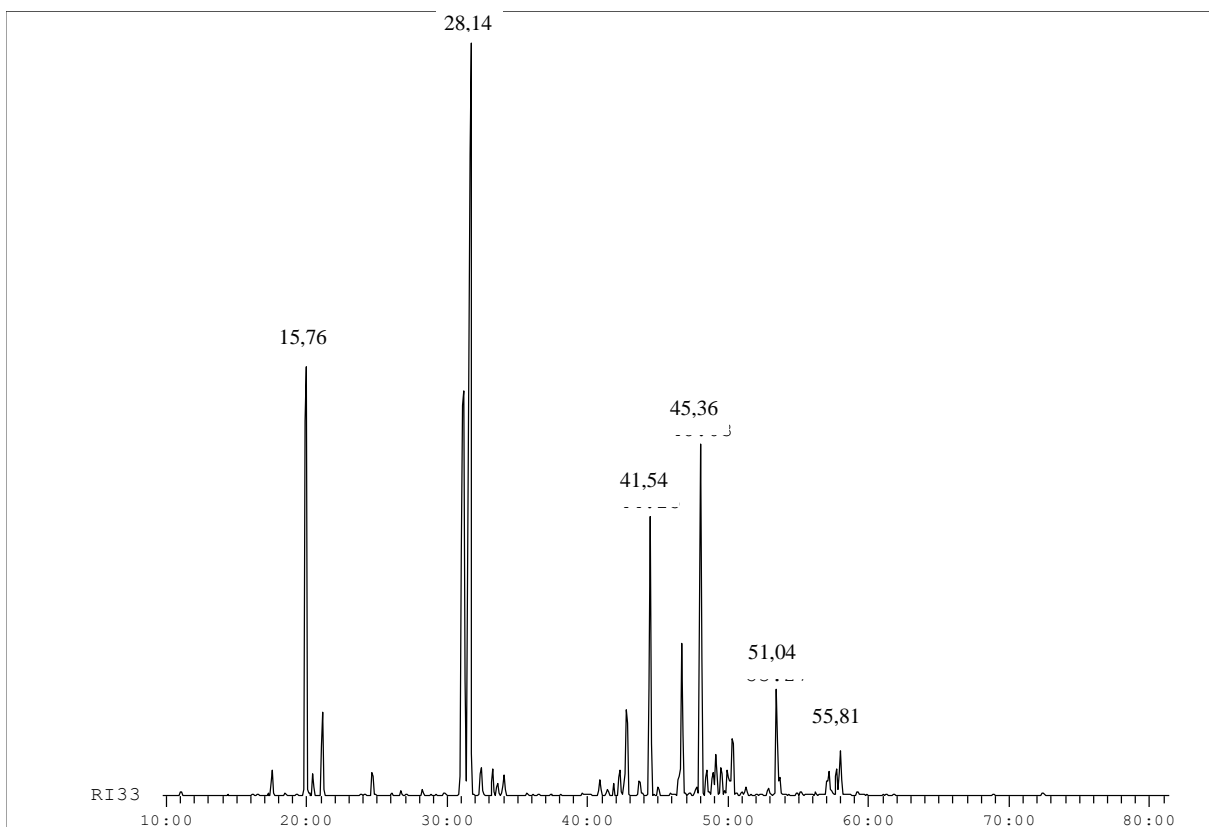


Figura 5.2 - Cromatograma obtido por GC-ME, do óleo essencial de *Lippia alba*, Dihidrocarvona

Tabela 5.2 - Principais compostos presentes no óleo de *Lippia alba*, químiotipo Dihidrocarvona

Nº	Tempo retenção	Componente	lão Molecular (M ⁺)	%
1	13:29	β-pineno	136,0	0,40
2	15:76	Limoneno	136,0	7,54
3	16:34	α-pineno	136,0	0,35
4	17:02	β-ocimeno	136,0	1,34
5	20:81	Linalool	154,0	0,43
6	22:91	Oxido de limoneno	152,1	0,10
7	24:51	L-mentona	154,0	0,12
8	25:54	Mentol	156,0	0,02
9	27:59	Isopulegona	152,0	18,10
10	28:14	Dihidrocarvona	152,0	34,73
11	28:90	Neodihidrocarveol	154,0	0,67
12	29:80	Dihidrocarveol (isómer?)	154,0	0,52
13	30:16	Pulegona	152,1	0,25
14	30:61	Carvona	150,0	0,41
15	37:82	Acetato de dihidrocarveol	196,0	0,32
16	39:30	β-bourboneno	204,1	0,58
17	39:67	β-cubeneno	204,1	0,40
18	39:80	β-elemeneno	204,2	1,67
19	40:78	α-gurjuneno	204,1	0,29
20	41:54	Cariofileno (isómer?)	204,1	5,83
21	43:73	α-humuleno	204,1	0,39
22	43:95	<i>trans</i> -cariofileno	204,1	3,25
23	45:36	<i>epi</i> -biciclosesquifelandreno	204,1	8,41
24	45:78	β-selineno	204,1	0,47
25	46:22	γ-elemeneno	204,1	0,36
26	46:51	muuroleno (isómer?)	204,1	0,85
27	46:88	selina-dieno (isómer?)	204,1	0,61
28	47:32	γ-cadineno	204,1	0,56
29	47:68	β-cadineno	204,1	1,28
30	51:04	Endo-1-bourbonanol	222,1	2,28
31	55:81	não identificado	218,1	1,00

Linalol (II)

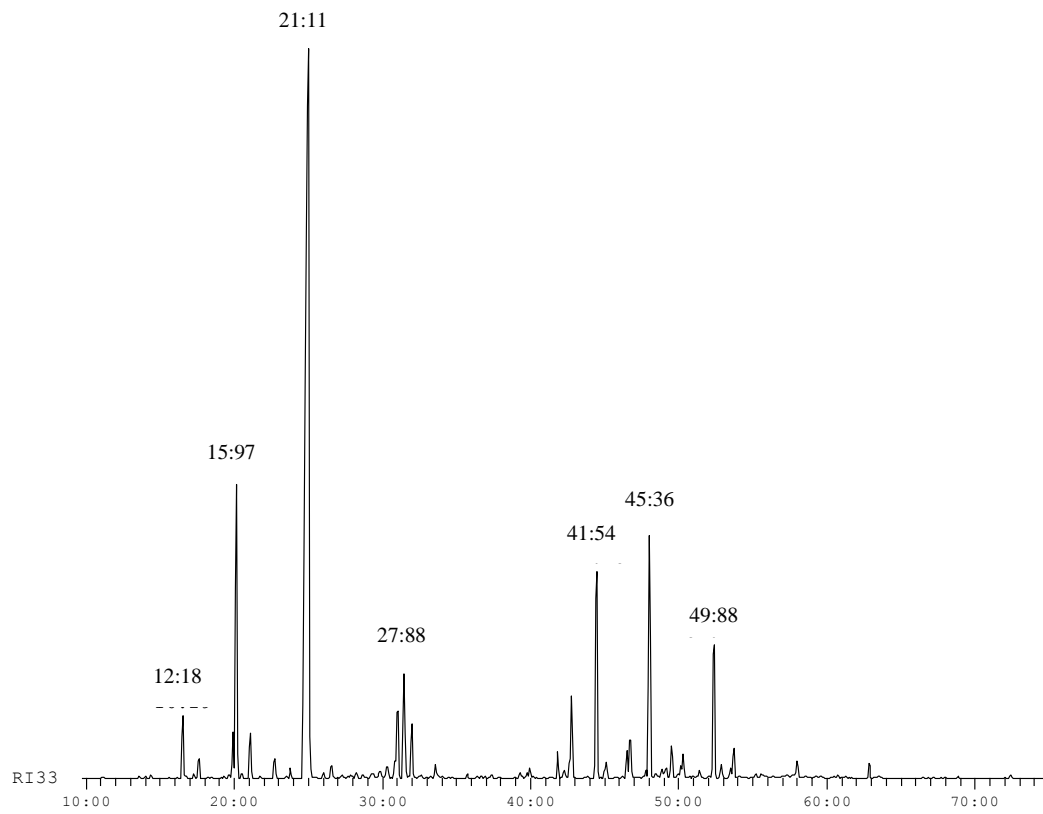


Figura 5.3 - Cromatograma obtido por GC-ME, do óleo essencial de *Lippia alba*, Linalol (II)

Tabela 5.4 - Principais compostos presentes no óleo de *Lippia alba*, químiotipo Linalol (II)

Nº	Tempo retenção	Componente	lão Molecular (M ⁺)	%
1	12:18	β-felandreno	136,0	1,19
2	13:29	β-pineno	136,0	0,43
3	15:74	Limoneno	136,0	0,99
4	15:97	1,8-cienol	154,0	6,19
5	17:02	<i>trans</i> -β-ocimeno	136,0	0,91
6	18:69	não identificado	154,0	0,49
7	21:11	Linalool	154,0	48,94
8	21:23	Hotrienol	152,0	0,32
9	22:71	1,3,8-paramentatrieno	134,0	0,33
10	26:73	não identificado	134,0	0,43
11	27:29	α-terpineol	136,0	0,51
12	27:46	<i>cis</i> -dihidrocarvona	152,1	1,58
13	27:88	<i>trans</i> -dihidrocarvona	152,1	3,13
14	28:42	1-(1,4-dimetil-3-ciclohexen-1-il)etanona	152,0	1,19
15	30:14	(+)-pulegona	152,1	0,33
16	32:36	Citral	152,1	0,10
17	38:83	α-copaeno	204,1	0,66
18	39:67	<i>epi</i> -biciclosesquifelandreno	204,1	0,33
19	39:81	β-elemeno	204,1	2,00
20	41:54	β-cariofileno	204,1	5:29
21	42:30	γ-elemeno	204,1	0,40
22	43:73	α-humuleno	204,2	0,67
23	43:94	isocariofileno	204,1	1,19
24	45:36	Germacreno D	204,1	6,65
25	46:89	α-bulneseno	204,2	0,86
26	47:67	β-cadineno	204,1	0,61
27	49:88	Germacreno B	204,1	3,36
28	50:39	Nerolidol	222,0	0,35
29	51:26	Oxido de cariofileno	220,0	0,84
30	55:80	não identificado	218,1	0,53
31	60:88	β-copaen-4α-ol	220,1	0,37

5.2 Actividade antimicrobiana de *Lippia alba*

O *screening* da actividade antimicrobiana foi realizado pelas duas técnicas descritas anteriormente (secção 4.5), difusão por perfuração em poços e teste do efeito de vapor. Em ambos os testes, medem-se os halos de inibição de crescimento bacteriano. No método dos poços os resultados foram obtidos medindo o maior comprimento de uma extremidade a outra do halo inibitório sobre a linha que representa o diâmetro do poço. No método do efeito de vapor, a medição é similar, entre um diâmetro aproximado (o mais uniforme) resultante da dispersão do óleo evaporado e a maior distancia registada pelas extremidades do halo do efeito inibitório (Figura 5.4).



Figura 5.4 - Na esquerda, a difusão por poços com traçado para medição do halo; na direita, teste de vapor em que a azul está a delimitação do resíduo da deposição do óleo na tampa e a vermelho, o halo resultante do efeito inibitório do vapor.

De modo a classificar a acção do óleo essencial nas estirpes seleccionadas, nomeadamente, em forte inibição, inibição moderada, fraca inibição ou sem inibição, tendo como controlos positivos os antibióticos, gentamicina (largo espectro) e a penicilina (Gram-positivos), e comparando os halos de inibição do óleo essencial testado com os halos dos antibióticos, classificaram-se os microrganismos (Tabela 5).

Tabela 5.5 - Classificação da susceptibilidade dos microrganismos por comparação dos halos

Susceptibilidade do microrganismo	Medida do Halo de inibição (mm)
Sensíveis	diâmetro do halo ≥ 3 mm
Moderadamente sensíveis	> 2 e ≤ 3 mm
Resistentes	≤ 2 mm

Para se determinar as concentrações de cada óleo, contido em cada poço e posteriormente para as CMI, procedeu-se aos cálculos da seguinte forma:

- Densidade do óleo Linalol (I) = 0,90 g/mL
- Densidade do óleo Dihidrocarvona = 0,91 g/mL
- Densidade do óleo Linalol (II) = 0,87 g/mL

Linalol (I) :

Se cada poço contem 70 µL de óleo,

$$900 \text{ mg} \text{ ----- } 1000 \text{ } \mu\text{L}$$

$$X \text{ mg} \text{ ----- } 70 \text{ } \mu\text{L} \quad X = 63 \text{ mg}$$

Assim teremos 63 mg por 70 µL, ou 63 mg/poço no caso de óleo bruto, 31,5 mg na diluição 1:2 e 6,3 mg na diluição de 1:10

Dihidrocarvona :

$$910 \text{ mg} \text{ ----- } 1000 \text{ } \mu\text{L}$$

$$X \text{ mg} \text{ ----- } 70 \text{ } \mu\text{L} \quad X = 63,70 \text{ mg}$$

Assim teremos 63,70 mg por 70 µL, ou 63,70 mg/poço no caso de óleo bruto, 31,85 mg na diluição 1:2 e 6,37 mg na diluição de 1:10

Linalol (II) :

$$870 \text{ mg} \text{ ----- } 1000 \text{ } \mu\text{L}$$

$$X \text{ mg} \text{ ----- } 70 \text{ } \mu\text{L} \quad X = 60,90 \text{ mg}$$

Assim teremos 60,90 mg por 70 µL, ou 60,90 mg/poço no caso de óleo bruto, 30,45 mg na diluição 1:2 e 6,09 mg na diluição de 1:10

5.2.1 Halos de inibição pela técnica do poço

Como descrito anteriormente, mediram-se os halos de inibição desta técnica, fazendo passar um segmento de recta que atravesse o diâmetro do poço até à periferia da inibição. Os resultados apresentam-se nas seguintes tabelas.

Tabela 5.6 - Halos inibitórios do óleo *Lippia alba*, químiotipo Linalol (I) pela técnica dos poços

	Nº	Halo óleo Bruto (mm)	Halo do óleo 1:2 (mm)	Halo do óleo 1:10 (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	16	14	13
	2	14	12	10
	3	14	13	9
<i>Escherichia coli</i>	1	11	8	SI
	2	11	11	SI
	3	16	15	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	SI	SI	SI
	2	SI	SI	SI
	3	SI	SI	SI

SI - sem inibição (efeito inibitório nulo)

Tabela 5.7 - Halos inibitórios do óleo *Lippia alba*, químiotipo Dihidrocarvona pela técnica dos poços

	Nº	Halo óleo Bruto (mm)	Halo do óleo 1:2 (mm)	Halo do óleo 1:10 (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	16	15	15
	2	19	15	13
	3	16	12	10
<i>Escherichia coli</i>	1	26	11	11
	2	19	10	9
	3	19	10	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	SI	SI	SI
	2	SI	SI	SI
	3	SI	SI	SI

SI - sem inibição (efeito inibitório nulo)

Tabela 5.8 - Halos inibitórios do óleo *Lippia alba*, químiotipo Linalol (II) pela técnica dos poços

	Nº	Halo óleo Bruto (mm)	Halo do óleo 1:2 (mm)	Halo do óleo 1:10 (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	18	16	12
	2	15	14	14
	3	26	19	14
<i>Escherichia coli</i>	1	17	15	11
	2	15	13	11
	3	16	13	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	SI	SI	SI
	2	SI	SI	SI
	3	SI	SI	SI

SI - sem inibição (efeito inibitório nulo)

Tabela 5.9 - Halos inibitórios dos controlos positivos e negativo pela técnica dos poços

	Penicilina (0,05 mg/ml)	Gentamicina (10 mg/ml)	DMSO
<i>Staphylococcus aureus</i>	47	40	SI
<i>Escherichia coli</i>	SI	41	SI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SI	44	SI

SI- sem inibição (efeito inibitório nulo)

Constata-se à partida a total resistência da estirpe *Pseudomonas aeruginosa* para todas as diluições em todos os químiotipos neste método. Relevante destacar as inibições significantes por parte de todos os químiotipos e em todas as diluições frente à Gram-positiva *S. aureus* e frente à Gram-negativa *E. coli*, salvaguardando o químiotipo Dihidrocarvona na diluição 1:10 frente a *E. coli*. Os Controlos positivos são concordantes com a sua especificidade bacteriana, inibição pela Penicilina G frente a Gram-positivas e sem efeito frente a Gram-negativas, a Gentamicina, antibiótico de largo espectro a inibir as três estirpes. O controlo negativo não apresentou inibição.

5.2.2 Halos de inibição pela técnica do efeito de vapor

A medição dos halos de vapor é feita, medindo o segmento de recta que atravessa simultaneamente o diâmetro do depósito do óleo e toca nos limites do halo de inibição do vapor, como descrito anteriormente. Os resultados dessas medições apresentam-se nas tabelas seguintes.

Tabela 5.10 - Halos inibitórios por efeito de vapor com o óleo *Lippia alba*, químiotipo Linalol (I), em triplicado

	Nº	Halo óleo Bruto (mm)	Halo do óleo 1:2 (mm)	Halo do óleo 1:10 (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	35	15	8
	2	33	11	SI
	3	33	13	SI
<i>Escherichia coli</i>	1	44	12	Diminuição de ufc
	2	40	12	Diminuição de ufc
	3	42	14	Diminuição de ufc
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	SI	SI	SI
	2	SI	SI	SI
	3	SI	SI	SI

SI - sem inibição (efeito inibitório nulo)

Tabela 5.11 - Halos inibitórios pelo efeito de vapor com óleo *Lippia alba*, químiotipo Dihidrocarvona, em triplicado.

	Nº	Halo óleo Bruto (mm)	Halo do óleo 1:2 (mm)	Halo do óleo 1:10 (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	SI	SI	SI
	2	6	SI	SI
	3	6	SI	SI
<i>Escherichia coli</i>	1	Diminuição de ufc	SI	SI
	2	Diminuição de ufc	SI	SI
	3	Diminuição de ufc	SI	SI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	SI	SI	SI
	2	SI	SI	SI
	3	SI	SI	SI

SI - sem inibição (efeito inibitório nulo)

Tabela 5.12 - Halos inibitórios por efeito de vapor com óleo *Lippia alba*, químiotipo Linalol (II) em triplicado

	Nº	Halo óleo Bruto (mm)	Halo do óleo 1:2 (mm)	Halo do óleo 1:10 (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	49	19	Diminuição de ufc
	2	45	19	SI
	3	38	18	SI
<i>Escherichia coli</i>	1	50	11	SI
	2	49	11	SI
	3	40	Diminuição de ufc	SI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	SI	SI	SI
	2	SI	SI	SI
	3	SI	SI	SI

SI - sem inibição (efeito inibitório nulo)

Neste método testam-se os compostos mais voláteis dos óleos essenciais. Estabeleceu-se uma gama de concentrações idêntica à difusão por perfuração de cavidades em agar. Novamente verifica-se a ausência de inibição sobre a estirpe *Pseudomonas aeruginosa*. Revela-se curiosa a fraca inibição por parte do químiotipo Dihidrocarvona frente a todas as estirpes em todas as diluições. Encontramos também inibições “parciais”, onde, apesar de não se definir um halo de inibição pelo vapor, consegue perceber-se uma menor densidade de crescimento. Neste caso destacam-se ambos os químiotipos Linalol frente à Gram-positiva *S. aureus* e frente à Gram-negativa *E. coli*, especialmente na concentração de 1:1, óleo em bruto, mas também encontramos halos na diluição 1:2.


5.2.3 CMI e CMB - Método de macrodiluição

A determinação da CMI e da CMB, foi executada segundo descrito anteriormente, método de diluição em caldo pela técnica de macrodiluição. A desvantagem desta metodologia, é o facto de ser muito trabalhosa, exigindo tempo e concentração para a sua realização, além do espaço para acomodar e incubar várias sequências de tubos.

A interpretação e critérios para as CMI e CMB foram os seguintes: a maior diluição que não apresenta turvação visível a olho nu é considerada como a CMI observada, por conseguinte, a CMI real irá situar-se entre a CMI observada e a diluição adjacente mais alta. Relativamente à CMB, é sempre considerada menor ou igual à CMI, dado que representa o efeito bactericida no crescimento em meio de cultura sólido, correspondente à inibição de no mínimo 99,9% do inóculo original. Dado que nos ensaios se usou um inóculo de 10^6 UFC/mL, consideramos como CMB as placas que tenham um crescimento bacteriano $\leq 0,1\%$ do inoculo original, ou seja, corresponde a ≤ 100 UFC/placa (pelo método de espalhamento de 0,1 mL).


Foram preparadas sequências de diluições em duplicado de 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, sendo que o óleo bruto foi previamente diluído de 1:2 em DMSO, numa concentração de 450 mg/mL para o químiotipo Linalol (I), 455 mg/mL para o químiotipo Dihirocarvona e 435 mg/mL para o químiotipo Linalol (II). Como a estirpe *S. aureus* se mostrou inibida em todos os óleos até à diluição 1:32, procedeu-se posteriormente a um ensaio que contemplou uma diluição 1:64. Após 18h de incubação a 37°C, observaram-se os tubos e de seguida adicionou-se 1 mL resazurina. Aguardou-se 30 minutos para realizar as leituras. Os resultados apresentam-se de seguida em tabelas que contemplam, CMI, CMB (com a contagem de colónias) e a cor correspondente à transformação da resazurina em resorufina, evidenciando crescimento bacteriano. Os resultados são separados por químiotipo e número de ensaio.

Tabela 5.13 - Resultados de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial Linalol (I)
1 ° ensaio

Linalol (I)		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	Diluições (mg/mL)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	
	1:4	225	A	0	A	0	A	0
	1:8	112,50	A	0	R	>100	R	>100
	1:16	56,25	A	0	R	-	R	-
	1:32	28,12	A	0	R	-	R	-
	1:64	14,06	R	>100	NR	NR	NR	NR
	(negativo/esterilidade)	A	0	A	0	A	0	
	(positivo/crescimento)	R	>100	R	>100	R	>100	


A - cor azul, após resazurina; R - cor rosa, após resazurina; NR - Não Realizado

Tabela 5.14 - Resultados de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial Linalol (I)
2 ° ensaio

Linalol (I)		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	Diluições (mg/mL)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	
	1:4	225	A	0	A	0	A	0
	1:8	112,50	A	0	R	>100	R	>100
	1:16	56,25	A	0	R	-	R	-
	1:32	28,12	A	0	R	-	R	-
	1:64	14,06	R	>100	NR	NR	NR	NR
	(negativo/esterilidade)	A	0	A	0	A	0	
	(positivo/crescimento)	R	>100	R	>100	R	>100	


A - cor azul, após resazurina; R - cor rosa, após resazurina; NR - Não Realizado

Tabela 5.15 - Resultados de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial
Dihidrocarvona 1º ensaio

Dihidrocarvona		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Diluições (mg/mL)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)
	1:4	A	0	A	0	A	0
	1:8	A	0	A	0	R	>100
	1:16	A	0	A	0	R	-
	1:32	A	0	R	>100	R	-
	1:64	R	>100	NR	NR	NR	NR
	(negativo/esterilidade)	A	0	A	0	A	0
	(positivo/crescimento)	R	>100	R	>100	R	>100


A - cor azul, após resazurina; R - cor rosa, após resazurina; NR - Não Realizado

Tabela 5.16 - Resultados de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial
Dihidrocarvona 2º ensaio

Dihidrocarvona		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Diluições (mg/mL)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)
	1:4	A	0	A	0	A	0
	1:8	A	0	A	0	R	>100
	1:16	A	0	A	0	R	-
	1:32	A	0	R	>100	R	-
	1:64	R	>100	NR	NR	NR	NR
	(negativo/esterilidade)	A	0	A	0	A	0
	(positivo/crescimento)	R	>100	R	>100	R	>100


A - cor azul, após resazurina; R - cor rosa, após resazurina; NR - Não Realizado

Tabela 5.17 - Resultados de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial Linalol (II)
1 ° ensaio

Linalol (II)		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Diluições (mg/mL)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)
	1:4	A	0	A	0	A	0
	1:8	A	0	A	0	R	>100
	1:16	A	0	A	0	R	NR
	1:32	A	0	R	>100	R	NR
	1:64	R	>100	NR	NR	NR	-
	(negativo/esterilidade)	A	0	A	0	A	0
	(positivo/crescimento)	R	>100	R	>100	R	>100

A - cor azul, após resazurina; R - cor rosa, após resazurina; NR - Não Realizado

Tabela 5.18 - Resultados de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial Linalol (II)
2 ° ensaio

Linalol (II)		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Diluições (mg/mL)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (cor)	CMB (ufc/placa)
	1:4	A	0	A	0	A	0
	1:8	A	0	A	0	R	>100
	1:16	A	0	R	>100	R	-
	1:32	A	0	R	-	R	-
	1:64	R	>100	NR	NR	NR	-
	(negativo/esterilidade)	A	0	A	0	A	0
	(positivo/crescimento)	R	>100	R	>100	R	>100

A - cor azul, após resazurina; R - cor rosa, após resazurina; NR - Não Realizado

Tabela 5.19 - CMI e CMB reais e observadas, e concentrações correspondentes do óleo essencial de *Lippia alba* - Linalol (I), de acordo com os resultados das tabelas anteriores.

Linalol (I)		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Observado	Diluições	1:32	1:32	1:4	1:4	1:4	1:4
	Concentração (mg/mL)	28,12	28,12	225	225	225	225
2º Ensaio							
Real	Diluições	[1:32 ; 1:64]		[1:4 ; 1:8]		[1:4 ; 1:8]	
	Concentração (mg/mL)	[28,12 ; 14,06]		[225 ; 112,50]		[225 ; 112,50]	
Linalol (I)		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Observado	Diluições	1:32	1:32	1:4	1:4	1:4	1:4
	Concentração (mg/mL)	28,12	28,12	225	225	225	225
Real	Diluições	[1:32 ; 1:64]		[1:4 ; 1:8]		[1:4 ; 1:8]	
	Concentração (mg/mL)	[28,12 ; 14,06]		[225 ; 112,50]		[225 ; 112,50]	

Tabela 5.20 - CMI e CMB reais e observadas, e concentrações correspondentes do óleo essencial de *Lippia alba* - Dihidrocarvona, de acordo com os resultados das tabelas anteriores.

Dihidrocarvona		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Observado	Diluições	1:32	1:32	1:16	1:16	1:4	1:4
	Concentração (mg/mL)	28,43	28,43	56,87	56,87	227,50	227,50
2º Ensaio							
Real		[1:32 ; 1:64]		[1:16 ; 1:32]		[1:4 ; 1:8]	
		[28,43 ; 14,21]		[56,87 ; 28,43]		[227,50 ; 113,75]	
Dihidrocarvona		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Observado	Diluições	1:32	1:32	1:16	1:16	1:4	1:4
	Concentração (mg/mL)	28,43	28,43	56,87	56,87	227,50	227,50
2º Ensaio							
Real		[1:32 ; 1:64]		[1:16 ; 1:32]		[1:4 ; 1:8]	
		[28,43 ; 14,21]		[56,87 ; 28,43]		[227,50 ; 113,75]	

Tabela 5.21 - CMI e CMB reais e observadas, concentrações correspondentes do óleo essencial de *Lippia alba* - Linalol (II), de acordo com os resultados das tabelas anteriores.

Linalol (II)		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Observado	Diluições	1:32	1:32	1:16	1:16	1:4	1:4
	Concentração (mg/mL)	27,18	27,18	54,37	54,37	217,50	217,50
Real	Diluições	[1:32 ; 1:64]		[1:16 ; 1:32]		[1:4 ; 1:8]	
	Concentração (mg/mL)	[27,18 ; 13,59]		[54,37 ; 27,18]		[217,50 ; 108,75]	
2º Ensaio							
Linalol (II)		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Observado	Diluições	1:32	1:32	1:8	1:8	1:4	1:4
	Concentração (mg/mL)	27,18	27,18	108,75	108,75	217,50	217,50
Real	Diluições	[1:32 ; 1:64]		[1:8 ; 1:16]		[1:4 ; 1:8]	
	Concentração (mg/mL)	[27,18 ; 13,59]		[108,75 ; 54,37]		[217,50 ; 108,75]	

5.2.3 Tratamento estatístico

O critério utilizado neste tratamento estatístico visa comparar resultados entre os três quimiotipos em todos os ensaios efectuados e para as três estirpes testadas. O baixo numero de ensaios por estirpe (3), revelou-se insuficiente para a realização de qualquer teste estatístico. Assim uniformizam-se os ensaios, apresentando as devidas médias e desvio padrão, para os três óleos nos diversos ensaios. Correlaciona-se depois os halos de inibição dos ensaios de difusão por cavidades em agar com efeito vapor e com as CMI e CMB. O software utilizado foi o IBM SPSS Statistics 20.0.

Difusão por perfuração de cavidades em agar

Tabela 22 - Resultados dos halos de inibição no ensaio da difusão por perfuração de cavidades (poços) em placa de agar. Média e desvio padrão para os triplicados efectuados para cada estirpe, com cada um dos quimiotipos.

		Bruto (1:1)		1:2		1:10	
		Halo de Inibicao (mm)		Halo de Inibicao (mm)		Halo de Inibicao (mm)	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Linalol (I)	<i>S. aureus</i>	14,67	±1,15	13,00	±1,00	10,67	±2,08
	<i>E. coli</i>	12,67	±2,89	11,33	±3,51	2,67	±4,62
	<i>P. aeruginosa</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Concentração (mg/70µL)		63,00		31,50		6,30	
Dihidrocarvona	<i>S. aureus</i>	17,00	±1,73	14,00	±1,73	12,67	±2,52
	<i>E. coli</i>	21,33	±4,04	10,33	±0,58	9,33	±1,53
	<i>P. aeruginosa</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Concentração (mg/70µL)		63,70		31,85		6,37	
Linalol (II)	<i>S. aureus</i>	19,67	±5,69	16,33	±2,52	13,33	±1,15
	<i>E. coli</i>	16,00	±1,00	13,67	±1,15	11,33	±0,58
	<i>P. aeruginosa</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Concentração (mg/70µL)		60,90		30,45		6,09	

Efeito vapor em placa de agar

Tabela 23 - Resultados dos halos de inibição no ensaio do efeito do vapor em placa de agar. Média e desvio padrão para os triplicados efectuados para cada estirpe, com cada um dos quimiotipos.

		Bruto (1:1)		1:2		1:10	
		Halo de Inibicao (mm)		Halo de Inibicao (mm)		Halo de Inibicao (mm)	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Linalol (I)	<i>S. aureus</i>	33,67	±1,15	13,00	±2,00	2,67	±4,62
	<i>E. coli</i>	42,00	±2,00	12,67	±1,15	0,00	0,00
	<i>P. aeruginosa</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Concentração (mg/70µL)		63,00		31,50		6,30	
Dihidrocarvona	<i>S. aureus</i>	4,00	±3,46	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>E. coli</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>P. aeruginosa</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Concentração (mg/70µL)		63,70		31,85		6,37	
Linalol (II)	<i>S. aureus</i>	44,00	±5,57	18,67	±0,58	0,00	0,00
	<i>E. coli</i>	46,33	±5,51	7,33	±6,35	0,00	0,00
	<i>P. aeruginosa</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Concentração (mg/70µL)		60,90		30,45		6,09	

Comparação entre halos e concentrações entre os métodos de difusão por perfuração de cavidades e efeito de vapor em placa de agar.

Tabela 24 - Comparação entre os halos de inibição pela técnica da perfuração de cavidades (poços) em agar e efeito vapor. Médias com o devido desvio padrão para halos de inibição e concentrações por cavidade e efeito vapor em todas as diluições.

		Cavidades em agar		Efeito vapor	
		Halos inibição (mm)	Concentração (mg/70µL)	Halos inibição (mm)	Concentração (mg/70µL)
Linalol (I)	<i>S. aureus</i>	12,78±2,00	33,60±28,40	16,44±15,78	33,60±28,40
	<i>E. coli</i>	8,89±5,42	33,60±28,40	27,33±20,73	33,60±28,40
	<i>P. aeruginosa</i>	0,00	33,60±28,40	0,00	33,60±28,40
Dihidrocarvona	<i>S. aureus</i>	14,55±2,21	33,97±28,72	0,00	33,97±28,72
	<i>E. coli</i>	13,66±6,65	33,97±28,72	0,00	33,97±28,72
	<i>P. aeruginosa</i>	0,00	33,97±28,72	0,00	33,97±28,72
Linalol (II)	<i>S. aureus</i>	16,44±3,17	32,48±27,46	31,33±17,91	32,48±27,46
	<i>E. coli</i>	13,66±2,33	32,48±27,46	26,83±27,57	32,48±27,46
	<i>P. aeruginosa</i>	0,00	32,48±27,46	0,00	32,48±27,46

Tanto nos ensaios por perfuração como no efeito vapor a *Pseudomonas aeruginosa* não sofreu qualquer inibição por qualquer um dos químiotipos. Os desvios padrão das concentrações e dos halos sofrem um aumento pois o cálculo das médias não exclui valores nulos. Na inserção dos dados formatou-se o efeito vapor no químiotipo Dihidrocarvona para valores nulos, apesar de existir alguma inibição embora muito fraca (tabelas 11 e 23). Para as estirpes *S. aureus* e *E. coli*, inibidas por varias concentrações na difusão por perfuração de cavidades em agar, podem comparar-se com o efeito vapor nos químiotipos Linalol, podendo estrapular-se, dentro da mesma concentração de óleo, qual a proporção com maior relevância inibitória, se a parte difusa ou volátil do óleo. A informação será mais relevante para estudar os componentes do óleo individualmente.

Comparação entre halos da difusão por perfuração de cavidades em agar, CMI e CMB.

Os resultados da seguinte tabela, que incluem CMI e CMB são puramente descritivos a fim de estabelecer comparações, neste caso entre as concentrações. As médias foram feitas transversalmente a todas as diluições nos ensaios de difusão por cavidades e efeito vapor, não existindo correlação directa entre dados da tabela. Ou seja, foi efectuada uma média das médias dos halos que contemplam as três diluições efectuadas, 1:1, 1:2 e 1:10 e, por conseguinte, uma média das médias das concentrações correspondentes juntamente com o desvio padrão, que neste caso nos fornece uma gama das concentrações envolvidas nessas inibições. Sabe-se à partida que os métodos não são comparáveis, pois a vias de difusão serão distintas e as concentrações e diluições distintas, mas num todo pode-se apreciar e até estrapular as diferenças entre os dois métodos ou até o modo de acção antibacteriana. Não se revela interessante a comparação entre o efeito vapor e CMI e CMB, apesar de existirem bons resultados nos químiotipos Linalol, são escassos e maioritariamente para o óleo em bruto (1:1).

Tabela 25 - Comparação entre os halos de inibição pela técnica da perfuração de cavidades (poços) em agar e as CMI e CMB reais. Médias com o devido desvio padrão para halos de inibição e concentrações por cavidade em todas as diluições.

			Halos inibição (mm)	Concentração (mg/70µL)	CMI real (mg/mL)	CMB real (mg/mL)
Linalol (I)	<i>S. aureus</i>		12,78±2,00	33,60±28,40	28,15	14,06
	<i>E. coli</i>		8,89±5,42	33,60±28,40	225	112,50
	<i>P. aeruginosa</i>		0,00	33,60±28,40	225	112,50
Dihidrocarvona	<i>S. aureus</i>		14,55±2,21	33,97±28,72	28,43	14,21
	<i>E. coli</i>		13,66±6,65	33,97±28,72	56,87	28,43
	<i>P. aeruginosa</i>		0,00	33,97±28,72	227,50	113,75
Linalol (II)	<i>S. aureus</i>		16,44±3,17	32,48±27,46	27,18	13,59
	<i>E. coli</i>		13,66±2,33	32,48±27,46	54,37	27,18
	<i>P. aeruginosa</i>		0,00	32,48±27,46	217,50	108,75

Capítulo 6 - Conclusão

Os trabalhos que envolvem a avaliação antimicrobiana de óleos essenciais são verdadeiramente laboriosos e envolvem um grande leque de factores que geram incertezas na interpretação de resultados.

Este trabalho teve como objectivo estudar as actividades antibacterianas de três químiotipos do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. Dois em que o componente maioritário era o Linalol em diferentes proporções, rotulados como Linalol (I) e (II) constituíam 38,48% e 48,94% dos seus respectivos óleos e um terceiro químiotipo, em que a Dihidrocarvona era o componente maioritário com 34,73%. A escolha dos microrganismos foi epistemológica, visando contribuir para estudos já efectuados com os mesmos e sabendo que são representativos do seu reino, de determinados habitats e patologias, aumentando as probabilidades dos resultados se poderem aplicar a outras estirpes e áreas de estudo. Seleccionaram-se a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923/Lote 902840), como representante da flora superficial humana, coloniza toda a pele e em particular as fossas nasais e as Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922/Lote 931370), como representante da flora intestinal e a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853/Lote 931372), bactéria ubíqua, representativa do meio ambiente.

As técnicas e métodos utilizados são baseados em estudos e diversos artigos, muitos deles que se apoiam na metodologia adoptada pela CLSI. Ainda assim julgo que a maioria necessita de ser optimizado ou reavaliados no que diz respeito à sua aplicação a óleos essenciais. Após este pressuposto e com apoio na literatura seleccionaram-se as técnicas mais promissoras e com maior possibilidade de serem comparadas com outros estudos, para avaliar a actividade antimicrobiana neste trabalho, difusão por perfuração de cavidades (ou poços) em agar, efeito de vapor em placa de agar e macrodiluição (diluição em caldo). Também se pesquisou que o melhor emulsionante a usar seria o DMSO, visto ser o menos interferente na obtenção de resultados, como se comprovou nos controlos efectuados, embora nunca se possa excluir outras interacções sinérgicas ou antagónicas com os constituintes dos óleos, como de resto acontece entre os próprios constituintes do óleo. Numa perspectiva geral e considerando todos os factores envolvidos, a técnica que se mostra mais satisfatória para detecção da actividade antimicrobiana é a difusão por perfuração de cavidades em agar. Os testes vapor dão uma percepção da actividade dos compostos voláteis do óleo, mas estão limitados pela capacidade de se medir realmente esse efeito do vapor, como até é referido nos resultados, existiu alguma inibição em alguns ensaios, visto existir menor densidade de colónias, mas que não formavam um halo nítido de inibição que pudesse ser medido e avaliado segundo o que está estipulado no método, mais ainda se pode interrogar, como por exemplo no caso de diluições sujeitas ao teste vapor, feitas com DMSO, se este não interferirá no ponto de fusão de alguns componentes. Confesso não ter realizado nenhum ensaio que

testa-se o efeito dos vapores do emulsionante, são conclusões que retiro já no final do trabalho, mas que me permitem continuar no futuro a tentar otimizar estes ensaios. No caso da diluição em caldo podemos ter a percepção da quantidade de óleo que inibe determinada estirpe, mas somos limitados pela verdadeira dificuldade que estes ensaios apresentam nos testes com óleos ou substâncias hidrofóbicas, que é o de não se conseguir garantir uma verdadeira homogeneização do óleo com os meios de cultura. Se o crescimento bacteriano se desse instantaneamente, seria viável este tipo de método, pois conseguimos emulsionar um óleo durante breves instantes, mas como se tem que aguardar o tempo de incubação, suspeita-se que durante esse período exista a possibilidade da mistura se fraccionar, havendo algum nível de separação entre compostos hidrofóbicos e hidrofílicos (como até é possível observar na fig. 2.15), não esquecendo até as zonas de crescimento preferencial de algumas bactérias, segundo o seu metabolismo, presença ou ausência de oxigénio dissolvido. O mesmo se pode equacionar sobre o teste de difusão por cavidades em agar, que como disse parece ser o melhor método para detectar a actividade antibacteriana, no entanto as quantias envolvidas poderão ajudar a minimizar esse efeito, embora nunca se exclua a hipótese de existir fracionamento no interior da cavidade de agar.

Interpretando os resultados conclui-se desde logo que, a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* se mostra resistente à inibição por parte dos três químiotipos, nos ensaios de difusão por perfuração de cavidades em agar e efeito de vapor em placa de agar, no entanto, surpreende verificar-se uma detecção na determinação da sua CMI para os três químiotipos. Linalol (I) com uma CMI entre 225-112,50 mg/mL, Dihidrocarvona com 227,50-113,75 mg/mL e Linalol (II) com 217,50-108,75.

As estirpes Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *Escherichia coli* foram, segundo os critérios estipulados, fortemente inibidas nos ensaios de difusão por perfuração de cavidades em agar. O químiotipo Dihidrocarvona (34,73% do óleo) apresentou os melhores resultados, com halos de inibição iguais ou superiores aos outros químiotipos e em particular o óleo em bruto para *Escherichia coli*, e que, nas suas diluições manteve a proporcionalidade do halo concordante com a respectiva diluição, por exemplo, 1:2 com aproximadamente metade do halo de inibição. O mesmo já não aconteceu com *Staphylococcus aureus*, onde apesar de ser ligeiramente menos inibido, variou pouco a área de inibição de diluição para diluição, ou seja, obtiveram-se inibições ligeiramente menores, mas não chegando à mesma proporção da diluição, um facto interessante a ser estudado. Já para os outros dois químiotipos, o Linalol (II) (48,94% do óleo) é o segundo melhor em termos de inibição neste método de difusão por perfuração de cavidades em agar, mas onde se destacam melhores níveis de inibição frente a *Staphylococcus aureus*, embora muito próximos dos da *Escherichia coli*. Em nenhuma das duas estirpes existe uma acentuada diminuição dos halos de inibição de diluição para diluição. Por fim o Linalol (I) (38,48% do óleo), já por mim testado durante a Licenciatura, voltou a demonstrar bons resultados frente a *Staphylococcus*

aureus e *Escherichia coli*, embora neste caso sejam os piores por comparação com os outros químiotipos, tal como no passado, continuam a classificar-se de efeitos inibitórios fortes.

Nos ensaios de efeito de vapor em placa de agar, os resultados entre os dois químiotipos Linalol são bastante similares para as duas estirpes com o óleo em bruto (1:1), *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, mostrando um pouco maiores efeitos inibitórios frente à Gram-negativa. As diluições também demonstram actividade e acompanham a proporcionalidade do halo inibitório, embora na última diluição (1:10) se observe menor densidade de crescimento e não um halo inibitório. Algo inesperado foi o facto de não existir efeito inibitório mensurável no químiotipo Dihidrocarvona, que só registou algum ligeiro efeito para óleo em bruto (1:1), *Staphylococcus aureus* de 6 mm (em dois dos três ensaios) e *Escherichia coli* nem registou halos de inibição apenas menor densidade de crescimento.

Na determinação das CMI e CMB, os melhores resultados são claramente e pelos três químiotipos testados, frente a *Staphylococcus aureus*, todos na proporção de 1:64, Linalol (I) com uma CMI entre 28,15 e 14,06 mg/mL, Dihidrocarvona com uma CMI entre 28,43 e 14,21 mg/mL e para o Linalol (II) entre 27,18 e 13,59 mg/mL. Para *Escherichia coli* temos CMI um pouco superiores às encontradas para *Staphylococcus aureus* em todos os químiotipos e muitas vezes idênticas às encontradas para *Pseudomonas aeruginosa*, Linalol (I) com uma CMI entre 225 e 112,50 mg/mL, Dihidrocarvona com CMI entre 56,87 e 28,43 mg/mL e para Linalol (II) obtivemos ensaios não concordantes ([108,75-54,37] e [54,37-27,18]), que fazem variar a CMI entre 108,75 e 27,18, mas que provavelmente se encontrará mais perto de 54,37 mg/mL.

Resumindo, os três químiotipos tem forte potencial antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e em pequenas concentrações, especialmente para a Gram-positiva. O químiotipo Dihidrocarvona com os melhores resultados por difusão por perfuração de cavidades em agar, embora nenhum efeito significativo pelo vapor. Os químiotipos Linalol têm maior abrangência e constância de resultados em todos os ensaios. A estirpe *Pseudomonas aeruginosa* revelou-se a mais resistente aos efeitos dos óleos testados, que apesar de não apresentar nenhuma inibição por difusão ou vapor conseguiu-se determinar a sua CMI.

Evidencia-se desde logo a diferença de resultados entre as duas estirpes Gram-negativas com a excepção na determinação da CMI. Sabendo que têm as mesmas estruturas membranares, abre-se a possibilidade de que a acção antibacteriana esteja inerente aos seus metabolismos. Sendo uma anaeróbia facultativa e outra aeróbia estrita poderá supor-se que as duas usem metabolismos, no mínimo, similares nessas circunstâncias. Visto serem Gram-negativas este pressuposto merece estudos futuros.

6.1 Trabalho Futuro

- Avaliar interacções Óleo/Emulsionante.
- Avaliar uma possível metodologia que ultrapasse a problemática da interacção hidrofóbica, com conseqüente difusão entre óleo/meio de cultura.
- Estudar actividades de compostos individuais maioritarios e o seu possível sinergismo/antagonismo.
- Estudar efeitos do vapor de emulsionantes.
- Estudar outros óleos essenciais, com mesmos compostos maioritários.
- Maior numero de ensaios, de modo a que, estatisticamente se possam avaliar as variâncias nos resultados.

Capítulo 7

Bibliografia

Ahmed A.; Tarek E.; Noha M., (2012). Validated microbiological and HPLC methods for the determination of moxifloxacin in pharmaceutical preparations and human plasma. *Brazilian Journal of Microbiology* 10/2012; 43(4):1291-301.

Alves, E.G, Vinholis, A.H.C., Casemiro, L.A., Furtado, N.A.J.C.F., Silva, M.L.A., Cunha, W.R., Martins, C.H.G., (2008). “Estudo comparativo de Técnicas de *screening* para a avaliação da actividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras”, *Química Nova*, Vol. 31, No. 5, 1224-1229.

Aguiar, J.S., Costa, M.C.C.D., Nascimento, S.C., Sena, K.X.F.R., (2008). Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, Volume: 18 (3), Pages: 436-440.

Albuquerque, A.P., Monteiro, J.M., Ramos, M.A., Amorim, E.L.C., (2007). Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacology* Volume: 110, Issue: 1, Pages: 76-91.

Almeida, A.M.D.S., (2013). “Características Biológicas e Antigênicas de *Escherichia coli* com ênfase aos genes de virulência”. Universidade Federal de Goiás - Escola Veterinária Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Anima, Goiânia.

Arruda E.A., (1998). Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa*, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 31:503-504.

Arruda TA, Antunes RMP, Catão RMR, Lima EO, Sousa DP, Nunes XP, Pereira MSV, Barbosa-Filho JM, Cunha EVL (2006). Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. *Rev Bras Farmacogn* 16: 307-311.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., e Idaomar, M., (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, Volume: 46, Issue: 2, Pages: 446-475

Banthorpe, D.V, Mann, J., Davidson, R.S., Hobbs, J.B., Harborne, J.B., (1994). “Natural Products, their chemistry and biological significance”. Longman Scientific Technical, London, 289-331 e 345-359.

- Barani K., Manipal S., Prabu D., Ahmed A., Adusumilli P., Jeevika C., (2014). Anti-fungal activity of *Morinda citrifolia* (noni) extracts against *Candida albicans*: An in vitro study, Indian Journal of Dental Research, Pages: 188-190.
- 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". Approved Guideline NCCLS, M26-A, Vol. 19, Nº 18.
- Barbosa, F.F., Barbosa, L. C. A., Melo, E. C. e Botelho, F. M., Santos, R. H. S., (2006). Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba*, Quim. Nova, Volume: 29 (6), Pages: 1221-1225.
- Baquero, F. e Blázquez J., Evolution of antibiotic resistance, (2004). John Wiley & Sons, Ltd, Volume: 12, Issue: 12, Pages: 482-487
- Burt, S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. International Journal of Food Microbiology, Volume: 94, Issue: 3, Publisher: Elsevier, Pages: 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. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. J. Ethnopharmacology, Volume:31, Pages: 193-208
- Chung, K.H., 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, Volume: 17, Issue: 11, Pages: 1848-1855
- Costa, M., Aguiar, J.S., Nascimento, S.C., (2004). Atividade citotóxica de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). Acta Farm. Bonaerense, Volume: 23 (3), Pages: 349-352.
- Cowan, M. M., (1999). Plant products as antimicrobial agents, Clinical microbiology reviews. American Society for Microbiology, Volume: 12, Pages: 564-582
- Crapez, M.A.C., (2002). Bactérias marinhas. In: PEREIRA, R.C. & SOARES-GOMERS, A. (eds). Biologia Marinha. Ed. Interciência. Rio de Janeiro. Pages: 83-101.
- Dewick, P. M., (2001). The Mevalonate and Deoxyxylulose Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids, in Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

- Díaz, C., Quesada, S., Brenes, O., Aguilar, G., e Cicció, J. F., (2008). Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines., *Natural product research* 22, 1521-34.
- Dorman, H., Deans, S., (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Applied Microbiology*, UK, Volume: 88, Issue: 2, Pages: 308-316.
- 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.*, Volume: 97, Pages: 305-311.
- Ehlert, P.A.D., Ming, L.C., Marques, M.O.M., Fernandes, D.M., Rocha, W.A., Luz, J.M.Q., Silva, R.F., (2013). “Influência do horário de colheita sobre o rendimento e composição do óleo essencial de erva-cidreira brasileira [*Lippia alba*(Mill)N.E.Br.]”. *Revista Brasileira de plantas medicinais*, Botacatu, v.15, n.1, p.72-77.
- Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Ladeiro, F., Venâncio, F., Tavares, R., Brito, J.C., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*, *Letters in applied microbiology*, Volume: 36, Issue: 1, Pages: 35-40.
- Farzana Gull, Fahad Akhtar, Anwar khalid, Abdul samad, Muhammad Junaid Shah, Madiha Bashir, Mukhtiar Hassan, Fareeha Zahoor, Abdul Hafeez, Ayesha Iqbal, (2015). Screening of antimicrobial activity of *Balsamodendron myrrha* and *Viola odorata* used in Pakistani Folk medicines. *IOSR Journal Of Pharmacy*, Volume 5, Issue 3, Pages: 52-57.
- Ferreira, W.C., Sousa, J.C., Lima, N., (2010). *Microbiologia*, Lidel-edições técnicas, Ida.
- França, T.G.D., (2009). “Efeito da desnutrição protéico-calórica experimental na resposta imune e na susceptibilidade à infecção por *Staphylococcus aureus*”. *Dissertação de Mestrado*, BOTUCATU-SP.
- Hennebelle T., Sarpaz S., Joseph H. e Bailleul F., (2008). *Ethnopharmacology of Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume: 116, Pages: 211-222.
- Korock A.R., Juliani H.R. e Zygadlo J.R., (2007). Bioactivity of essential oils and their components. *Flavours and Fragrances*, 87-115.
- Laciar, S., Ruiz, R.L.V., Flores, R.C., Saad, J.R., (2009). “Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia echegarayi* Hieron. (Asteraceae)”. *Revista Argentina de Microbiologia*, 41, 226-231.

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.

Madigan, Martinko, Parker, (2004). "Microbiologia de Brock". Editora Prentice Hall Brasil, 10ª edição.

Martini, M.G., (2011). "Análise química e da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Ocimum selloi* Benth, *Hesperozygis myrtoïdes* (A. ST.-Hil) Epling e *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae)". Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Matos, F.J.A., Machado, M.I.L., Craveiro, A.A., Alencar, J.W., (1996). Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. Journal of Essential Oil Research 8, 695-698.

Nascimento, P. F.C., Nascimento, A. C., Rodrigues, C.S., Antonioli, A.R., Santos, P.O., Júnior, A.M.B., Trindade, R.C., (2007). "Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos". Revista Brasileira de Farmacognosia, 17(1):108-113.

Neves, L.A., De Oliveira, J.C.S, Da Camara, C.A.G., Schwartz. M.O.E., (2008). Chemical composition of the leaf oils of *Lippia gracilis* Schauer from two localities of Pernambuco, Journal Of Essential Oil Research, Volume: 20, Issue: 2, Pages: 157-160.

Nogueira, J. M. R.; MIGUEL, L. F. S., (2009). Bacteriologia: Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Rio de Janeiro, vol. 3, p. 221-397.

Ostrosky, E.A., Mizumoto, M.K., Lima, M.E.L., Kaneko, T.M., Nishikawa, S.O., e Freitas, B.R., (2008). Divulgação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais Volume: 18, Pages: 301-307.

Pelczar Jr., M. J.; Chan, E.C.C; Krieg, N. R.; (1996). "Microbiologia - Conceitos e Aplicações". 2ª Edição, Volume 2; MAKRON Books do Brasil Editora Ltda.

Pessini, G.L., Holetz, F.B., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Dias-Filho, B.P., Nakamura, C.V., (2003). Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. Rev. Bras. Farmacogn Volume: 13, Supl. : 1, Pages: 21-24.

Pinto, P. R. N., (2014). "Estudo da actividade antibacteriana da Carvona e seus derivados". Dissertação para obtenção de Grau Mestre, Universidade da Beira Interior, Covilhã;

Pombo, E.B., (2011) Estudo da actividade antibacteriana dos óleos essenciais *Schinus molle*, dissertação de Mestrado (2ºCiclo), Mestrado em Bioquímica, Departamento de Química, Universidade da beira Interior, Covilhã.

Pommerville, Jeffrey C., (2011). “Alcamos’s Fundamentals of Microbiology”. Jones and Bartlett Publishers, 9ª edição, parte 1 - capítulo 4;

Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J., (2007). “Farmacologia”. 6ª edição

Richard B. S., Mark W. H., (2014). The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action. Elsevier Academic Press editions (Third edition).

Robard, I., (2003). Plantes médicinales d’outre-mer et pharmacopées: aspects juridiques, économiques et culturels. *Phytothérapie—De la Recherche à la Pratique* 1, 16-21.

Rocha, P.M., Rodilla, J.M., Diéz, D., Elder, H., Guala, M.S., Silva, L.A., Pombo, E.B., 2012. Synergistic Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Aguaribay* (*Schinus molle* L.), *Molecules*, Volume: 17, Issue: 10, Pages: 12023-12036

Santos, A.L.D., Santos, D.O., Freitas, C.C.D., Ferreira, B.L.A, Afonso, ilídio F., Rodrigues, C.R., Castro, H.C., (2007). “*Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance”. *J Bras Patol Med Lab*; V.43, nº 6, pages: 413-423.

Sena Filho, J.G., Melo, J.G.S., Saraiva, A.M., Gonçalves, A.M., Psiottano, M.N.C., Xavier, H.S., (2009). Phytochemistry and acute toxicity from the roots of *Lippia alba*. *Pharmaceutical Biology*, Taylor & Francis Ltd, Volume: 47, Issue: 2, Pages: 142-145

Silva, L. e Fernandes J., (2010). Powerful protective role of 3,4-dihydroxyphenylethanol-elenolic acid dialdehyde against erythrocyte oxidative-induced hemolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volume: 58, Issue: 1, Pages: 135-140.

Simões, C.M., Spitzer, V., (1999). Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENCKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P. *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, Pages: 387-415.

Sousa, J.C. de, (2006). “Manual de Antibióticos Antibacterianos”. Edições Universidade Fernando Pessoa, 2ª Edição.

Todar, K., (2002).” Pathogenic *E. coli*”. *Todar’s Online of Bacteriology*; University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.

Todar, K., (2004). "*Pseudomonas aeruginosa*". Todar's Online of Bacteriology; University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.

Todar, K., (2005). "*Staphylococcus*". Todar's Online of Bacteriology; University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L., (2004). Microbiology : an Introduction, published by Pearson Education, Inc..

Referências online:

<http://allthingsplants.com/plants/photo/>

<https://biomundo.wordpress.com/category/bacterias/>

<http://drugsinfor.blogspot.pt/2010/06/gram-positive-cell-wall-vs-gram.html>

<http://www.biotoool.com/product/vita-blue-cell-viability-reagent.html>

<http://www.tsh.co.in/EqGen.html>

<http://labs.7bscience.com/lab-3---antibiotics.html>

<http://aromalandia.com.br/extracao;html>

<http://english.qibebt.cas.cn/rs/fs/>