



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências Sociais e Humanas

**Estudo da actividade antibacteriana dos óleos
essenciais
*Schinus molle***

Eunice Baltazar Pombo

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

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

Covilhã, Junho de 2011

Dedicatória

Aos meus pais, Natividade e António e aos meus avós que tanto me incentivaram a chegar até aqui e que me inspiraram e deram forças em mais uma fase decisiva da minha vida. Em especial, à minha irmã Mariana que esteve sempre do meu lado.

Agradecimentos

Toda a construção deste trabalho se apoiou em alicerces de companheirismo, generosidade, aconselhamento, ajuda e, acima de tudo, boa vontade de muitas pessoas às quais não poderia deixar de agradecer.

Em primeiro lugar agradeço ao mentor deste projecto, o Professor Doutor Pedro Rocha por me ter ajudado a realizar este trabalho, disponibilizando um espaço no seu laboratório e transmitindo todos os seus conhecimentos e conselhos ao longo deste ano.

Ao Professor Doutor Jesus Rodilha, que co-orientou este projecto com toda a sua sabedoria, e simpatia, apoiando o estudo com a disponibilização do óleo essencial e também do seu tempo e conhecimentos de química, que permitiram realizar parte deste projecto.

Aos funcionários do Laboratório Brito Rocha Lda. por me ajudarem em tudo o que foi necessário ao longo deste projecto e deste ano. Em especial agradeço à Cleide que me ajudou a iniciar o trabalho e esteve sempre presente ao longo da sua realização.

Também devo agradecer aos colegas que me acompanharam no laboratório de Química Orgânica da Universidade da Beira interior, em particular à Andreia que me ajudou bastante.

Aos meus colegas e amigos que foram mais que importantes para realizar este trabalho e tiveram a paciência de me ouvir e aconselhar ao longo deste ano. Agradeço especialmente à Cleide, Estela, Joana e Paulo que estiveram sempre por perto, ajudaram em tudo quanto era possível, me incentivaram sempre, mas acima de tudo agradeço-lhes por me conhecerem e compreenderem tão bem e por me animarem todos os dias.

Aos que estão longe, mas que de alguma maneira estiveram presentes, não só ao longo deste ano, mas também no decorrer do meu percurso académico, em especial aos meninos Renato, Andréa, Sara e Sónia.

Finalmente agradeço aos que melhor e sempre me apoiam, aos meus pais que me fizeram perceber que dos momentos menos bons se retiram os melhores ensinamentos e que são esses que mais ficam gravados na nossa vida; à minha irmã Mariana que, mais do que uma boa conselheira, foi sempre a minha companhia e me animou sempre que foi preciso.

Um OBRIGADO muito especial a todos

Resumo

Os conhecimentos acerca das plantas medicinais e da sua utilização têm vindo a ser acumuladas desde a antiguidade até aos nossos dias. Tem havido uma necessidade crescente de encontrar novos métodos para reduzir ou eliminar patógenos de origem alimentar. Os óleos essenciais são definidos como compostos voláteis, naturais e complexos caracterizados por um odor forte, formados em plantas aromáticas como metabolitos secundários. Podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações bastante diferentes e são caracterizados por dois ou três componentes maioritários em concentrações bastante elevadas (20-70%). Normalmente, os componentes maioritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais. A *Schinus molle* (aroeira-falsa), da família *Anacardiaceae*, nativa da América do Sul possui um óleo essencial com actividade antibacteriana. Os principais componentes que foram isolados da *S.molle* são cetoácidos triterpenóides. Actualmente, existem diversos métodos de *screening* para definir se o extracto de uma determinada planta possui actividade antimicrobiana. Os dois métodos mais utilizados são os de difusão em agar e de diluição em caldo. Então, o principal objectivo deste trabalho foi determinar a actividade antibacteriana do óleo essencial *Schinus molle* utilizando o método de difusão em agar com cavidades cilíndricas (poços) para a determinação dos halos de inibição, o método de macrodiluição para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB) e o teste em placa para a determinação do efeito de vapor. As estirpes estudadas foram: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. De acordo com os resultados obtidos, o óleo essencial de *Schinus molle*, tem efeitos antibacterianos fortes sobre bactérias Gram-positivas e mais fracos sobre as bactérias Gram-negativas. Os componentes maioritários têm bastante influência sobre esses efeitos antibacterianos, reagindo sinergicamente entre eles e potenciando os efeitos. O que se encontra em maior quantidade é o sabineno, no entanto a maior inibição bacteriana encontrada não foi provocada apenas pelo Sabineno, mas pela interacção entre este composto e os Pinenos (α -pineno e o β -pineno).

Palavras-chave

Óleo essencial, *Schinus molle*, actividade antibacteriana, concentração mínima inibitória, concentração mínima bactericida.

Abstract

The knowledge about medicinal plants and their use have been accumulated since ancient times to the present day. There has been a growing need to find new methods to reduce or eliminate foodborne pathogens. Essential oils are known as volatile, natural and complex compounds, characterized by a strong odor produced in aromatic plants as secondary metabolites. They may contain about 20 to 60 components at concentrations quite different and are characterized by two or three main components at high concentrations (20-70%). Generally, the main components determine the biological properties of essential oils. *Schinus molle* (false pepper), from *Anacardiaceae* family, native to South America has an essential oil with antibacterial activity. Triterpenoids ketoacids were the main components isolated from this plant. Currently, there are several screening methods to determine if a particular plant extract has antimicrobial activity. The two methods most commonly used are agar diffusion and broth dilution. So the main goal of this study was to determine the antibacterial activity of *Schinus molle* essential oil using the agar diffusion method with cylindrical cavities (well variant) for the determination of the inhibition haloes, the macrodilution method for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) and the test in plate to determine the effect of the steam. The strains used were: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. According to the results, the essential oil of *Schinus molle* has strong antibacterial effects on Gram-positive and weaker on the Gram-negative bacteria. The majority components have considerable influence on these antibacterial effects, reacting with each other and synergically enhancing the effects. What is found in greatest quantity is the sabinene, however the most bacterial inhibition wasn't caused only by sabinene, but by the interaction between this compound and pinene (α -pinene and β -pinene).

Keywords

Essential oil, *Schinus molle*, antibacterial activity, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration.

Índice

1 Introdução	1
1.1 História da utilização dos óleos essenciais	4
1.2 Utilização dos óleos essenciais na indústria alimentar	4
1.2.1 Actividade nos sistemas alimentares	5
1.2.2 Aplicações medicinais futuras	5
1.3 Composição química dos óleos essenciais	6
1.3.1 Terpenos	9
1.3.1.1 Monoterpenos	12
1.3.1.2 Sesquiterpenos	13
1.3.2 Componentes aromáticos	13
1.4 Métodos para determinação do potencial antimicrobiano	14
1.5 Actividade antibacteriana	17
1.6 Mecanismos de acção antimicrobiana dos óleos essenciais	17
1.6.1 Carvacrol e Timol	20
1.6.2 Eugenol	21
1.6.3 p-Cimeno	21
1.6.4 Carvona	21
1.6.5 Cinamaldeído	22
1.6.6 Terpineno	22
1.7 Sinergismo e antagonismo entre os componentes dos óleos essenciais	22
1.8 Métodos para avaliação da actividade antibacteriana	23
1.8.1 Métodos de difusão em agar	23
1.8.1.1 Teste de difusão em disco	24
1.8.1.2 Cilindros de aço inoxidável	24
1.8.1.3 Perfuração em agar	25
1.8.2 Método de diluição em caldo	25
1.8.2.1 Macrodiluição	26
1.8.2.2 Microdiluição	26
1.8.3 Método de efeito do vapor do óleo essencial	27
1.8.4 Teste da Resazurina	27
1.9 Factores que interferem nos métodos	28
1.9.1 Meios de cultura	28
1.9.2 pH	29
1.9.3 Disponibilidade de oxigénio	29
1.9.4 Inoculo	29
1.9.5 Condições de incubação	30

1.9.6 Óleo essencial e emulsionante utilizado	30
1.10 Recursos utilizados para melhoria da leitura do diâmetro do halo de inibição no método de difusão em agar	32
1.11 Microrganismos	32
1.11.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	34
1.11.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
1.11.3 <i>Escherichia coli</i>	37
1.12 Susceptibilidade dos organismos Gram-positivos e Gram-negativos aos óleos essenciais	38
1.13 Óleo essencial - <i>Schinus molle</i>	38
1.14 Antibióticos antibacterianos	41
1.14.1 Química dos aminoglicosídeos-aminociclitóis	42
1.14.2 Mecanismo de acção	43
1.14.3 Gentamicina	43
2 Objectivo	45
3 Materiais e Métodos	47
3.1 Óleo essencial utilizado	47
3.2 Microrganismos	48
3.3 Meios de cultura	49
3.4 Separação dos componentes do óleo através de cromatografia em coluna	49
3.5 Preparação das culturas primárias	51
3.6 Preparação da densidade do inóculo	51
3.6.1 Confirmação da concentração do inóculo	51
3.7 Avaliação da actividade antibacteriana	52
3.7.1 Procedimento do método de difusão em agar pela técnica do poço	52
3.7.2 Procedimento do método de vapores	53
3.7.3 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB) pela técnica da macrodiluição em caldo	53
3.7.3.1 Diluições consecutivas de 1:2 do óleo essencial <i>Schinus molle</i>	54
3.8 Ensaio realizados	55
3.9 Análise estatística	55
4 Resultados e discussão	57
4.1 Óleo de <i>Schinus molle</i>	57
4.2 Actividade antibacteriana do óleo essencial	58
4.2.1 Halos de inibição resultantes do método de vapores	59
4.2.2 Halos de inibição pela técnica do poço	59

4.2.2.1 Ensaio realizado com óleo bruto	60
4.2.2.2 Ensaio realizado com os componentes do óleo essencial	62
4.2.2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	63
4.2.2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	64
4.2.2.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65
4.2.2.2.4 Análise geral	66
4.2.3 CMI e CMB - Método de macrodiluição	67
4.2.4 Comparação entre os halos de inibição e a CMI e CMB	68
4.3 Modo de acção bacteriana	69
4.4 Projectos futuros	69
5 Conclusão	71
6 Bibliografia	73
7 Anexos	77

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Estruturas químicas de alguns componentes dos óleos essenciais: (1) Terpenos; (2) Compostos aromáticos; (3) Terpenóides.	8
Figura 1.2 - Via do Mevalonato para produção de IPP, a unidade básica para a biossíntese de terpenos. A síntese de cada unidade requer 3 moléculas de Acetil-coA.	9
Figura 1.3 - Isomerização do IPP a Dimetilalilpirofosfato (DMAPP), adição repetitiva de IPP e DMAPP.....	10
Figura 1.4 - Principais terpenos e seus derivados	11
Figura 1.5 - Biossíntese de Terpenóides	11
Figura 1.6 - Principais classes de compostos com actividade antimicrobiana obtidas de plantas	14
Figura 1.7 - Localizações e mecanismos na célula bacteriana dos sítios de acção dos componentes dos óleos essenciais	18
Figura 1.8 - Estruturas da Resazurina (forma oxidada) e Resorufina (forma reduzida)	27
Figura 1.9 - Esquematização da parede celular de uma Bactéria Gram-positiva	33
Figura 1.10 - Esquematização da parede celular de uma bactéria Gram-negativa	34
Figura 1.11 - <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Figura 1.12 - <i>Staphylococcus aureus</i> com coloração de Gram	35
Figura 1.13 - Bacilos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Figura 1.14 - Colónias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em agar	36
Figura 1.15 - Bactéria <i>E. coli</i> O157:H7 imobilizada em agar	37
Figura 1.16 - Árvore <i>Schinus molle</i>	39
Figura 1.17 - Folha da <i>Schinus molle</i>	39
Figura 1.18 - Tronco da <i>Schinus molle</i>	40
Figura 1.19 - Fruto da árvore <i>Schinus molle</i>	40

Figura 1.20 - Locais de acção dos diferentes grupos de antibióticos	41
Figura 1.21 - Classificação dos aminoglicosídeos de acordo com a estrutura química	43
Figura 1.22 - Composição química e estrutura da Gentamicina	43
Figura 3.1 - <i>Schinus molle</i> . Exemplos para produção de 6-7 anos - COE	47
Figura 3.2 - Cromatografia em coluna (CC)	50
Figura 3.3 - Esquema resumido do procedimento para as diluições consecutivas de 1:2, para execução dos ensaios pelo método de macrodiluição em caldo, igual para todos os ensaios...55	
Figura 4.1 - Componentes maioritários do óleo essencial <i>Schinus molle</i>	58

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Compostos maioritários de Óleos Essenciais seleccionados com propriedades antibacterianas	7
Tabela 3.1 - Composição dos OE's de frutos e folhas de <i>S.molle</i> em Santa Fé, Argentina	47
Tabela 3.2 - Intervalos de percentagem de compostos maioritários dos OE's de frutos de <i>S.molle</i> da Argentina	48
Tabela 3.3 - Intervalos de propriedades físicas dos OE's de frutos de <i>S.molle</i> da Argentina...	48
Tabela 4.1 - Composição do óleo essencial <i>Schinus molle</i> obtido dos frutos maduros	57
Tabela 4.2 - Composição dos extractos de óleo <i>Schinus molle</i> utilizados neste estudo	58
Tabela 4.3 - Halos de inibição da actividade antibacteriana do vapor do óleo essencial, <i>Schinus molle</i> , contra os microrganismos testados, segundo o método dos vapores	59
Tabela 4.4 - Resultados obtidos nos ensaios com aplicação do método de difusão em agar pela técnica do poço, para três estirpes e com as diferentes diluições do óleo <i>Schinus molle</i> bruto (ensaios realizados em hexaplicado	60
Tabela 4.5 - Resultados obtidos nos ensaios para os controlos positivo e negativo, com aplicação do método de difusão em agar pela técnica do poço, para três estirpes	60
Tabela 4.6 - Comparação entre diluições e estirpes; resultados expressos pela média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) \pm o desvio padrão (Teste de Tukey, a 5% de probabilidade)	62
Tabela 4.7 - Composição dos extractos obtidos da separação do óleo de <i>Schinus molle</i>	62
Tabela 4.8 - Resultados expressos pela média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm) \pm o desvio padrão (Teste de Tukey, a 5% de probabilidade)	63
Tabela 4.9 - Resultados expressos pela média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm) \pm o desvio padrão (Teste de Tukey, a 5% de probabilidade)	64
Tabela 4.10 - Resultados expressos pela média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm) \pm o desvio padrão (Teste de Tukey, a 5% de probabilidade)	65
Tabela 4.11 - Composição dos extractos obtidos da separação do óleo de <i>Schinus molle</i>	66

Tabela 4.12 - Resultados experimentais de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial <i>S. Molle</i>	67
Tabela 4.13 - CMI e CMB reais e observadas, e concentrações correspondentes do óleo essencial de <i>Schinus molle</i> , de acordo com os resultados da tabela anterior	68
Tabela 4.14 - Comparação dos halos de inibição obtidos pela técnica de perfuração em agar; macrodiluição para determinação da CMI e da CMB, para as três estirpes	68
Tabela 7.1 - Teste de Levene para igualdade de Variâncias (Anexo I)	77
Tabela 7.2 - Teste de efeitos entre grupos (Anexo I)	77
Tabela 7.3 - Comparação entre os grupos das três estirpes (Anexo I)	78
Tabela 7.4 - Teste de Levene para igualdade de Variâncias (Anexo II)	79
Tabela 7.5 - Teste de efeitos entre grupos (Anexo II)	79
Tabela 7.6 - Comparação entre os grupos das diluições (Anexo II)	80
Tabela 7.7 - Comparação entre os vários extratos, em relação ao <i>Staphylococcus aureus</i> (Anexo II)	81
Tabela 7.8 - Teste de Levene para igualdade de Variâncias (Anexo III)	83
Tabela 7.9 - Teste de efeitos entre grupos (Anexo III)	83
Tabela 7.10 - Comparação entre os grupos das diluições (Anexo III)	84
Tabela 7.11 - Comparação entre os vários extratos, em relação à <i>Escherichia coli</i> (Anexo III)	85
Tabela 7.12 - Teste de Levene para igualdade de Variâncias (Anexo IV)	87
Tabela 7.13 - Teste de efeitos entre grupos (Anexo IV)	87
Tabela 7.14 - Comparação entre os grupos das diluições (Anexo IV)	88
Tabela 7.15 - Comparação entre os vários extratos, em relação à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . (Anexo IV)	89

Lista de Acrónimos

ATP	Trifosfato de Adenosina
C+	Controlo positivo
C-	Controlo negativo
CLSI	Clinical Laboratory and Standards Institute
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMAPP	Dimetilalilpirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO/AGAR	Solução de DMSO 5% + Agar 0,15%
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug Administration
IPP	Difosfato de Isopentenilo
LPS	Lipopolissacárido
MEP	Fosfato do Metileritritol
MHA	Muller-Hinton Agar
MHB	Muller-Hinton Broth
MH2	Muller-Hinton Agar 2
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OE	Óleos essenciais
OMS	Organização Mundial de Saúde
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
TLC	Cromatografia de Camada Fina
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UE	União Europeia
UFC	Unidade Formadora de Colónia

Capítulo 1

Introdução

Os pesticidas têm sido considerados durante muito tempo como a solução mais eficaz para controlar doenças em campos de cultura. No entanto, pesticidas sintéticos podem incorporar-se na cadeia alimentar e a resistência desenvolvida por fitopatógenos tornou alguns deles ineficazes. Isto destacou a necessidade do uso de compostos alternativos que são ecologicamente correctos e seguros para os humanos [Rhouma et al., 2009].

Assim, os óleos vegetais e extractos foram utilizados para uma ampla variedade de finalidades durante muitos milhares de anos. Essas variam desde o uso de pau-rosa e cedro em perfumaria até aromatização de bebidas com funcho, limão ou óleo de junípero e aplicação de óleo de nardo para a preservação de culturas alimentares armazenadas. Em particular, a actividade antimicrobiana de extractos e óleos vegetais tem sido a base de muitas aplicações, incluindo a conservação de alimentos crus e processados, produtos farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais [Hammer et al., 1999].

A utilização dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos tem vindo a ser descrita qualitativamente durante muitos anos começando com um estudo dos coeficientes de fenóis de um número de óleos essenciais, publicado por Martindale (1910) [Hilli et al., 1997].

O reino das plantas tem sido a melhor fonte de remédios para cura de variadas doenças e alívio de dores. É por isso que as plantas medicinais têm tido um papel chave na preservação da saúde, pelo mundo inteiro. Produtos naturais obtidos de plantas superiores são uma importante fonte de agentes terapêuticos. Por exemplo, o México tem uma vasta variedade de plantas, sendo o quarto país do mundo mais rico neste aspecto [Salazar-Aranda et al., 2009].

Já é conhecido que os constituintes de plantas medicinais podem variar muito como resultado de factores genéticos, climáticos, a qualidade do solo e outros factores externos. Assim, por exemplo no nordeste mexicano, o clima semi-árido causa a produção de metabolitos secundários diferentes de outros encontrados nas mesmas espécies cultivadas sob condições menos extremas [Salazar-Aranda et al., 2009].

Apesar de algumas plantas terem sido muito estudadas em termos de substâncias que contêm, foi sugerido que apenas 10% das, aproximadamente, 250.000 espécies foram caracterizadas em termos farmacológicos e químicos. Na maioria dos casos, não há validação científica dos produtos naturais tão utilizados, especialmente em países em desenvolvimento [Díaz et al., 2008].

Entre as substâncias com potencial terapêutico estão os óleos essenciais obtidos de diferentes partes da planta e constituídas por misturas complexas de metabolitos secundários lipofílicos e voláteis, que são geralmente responsáveis por cheiros particulares. Os compostos

voláteis são moléculas lipofílicas com alta pressão de vapor e diferentes funções ecológicas, frequentemente restritas a linhagens específicas de plantas [Díaz et al., 2008].

Assim, os óleos essenciais são definidos como compostos voláteis, naturais e complexos caracterizados por um odor forte, formados em plantas aromáticas como metabolitos secundários e obtidos de partes da planta (flor, semente, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutos e raízes) [ABI-Ayad et al., 2011] e são armazenados nas células secretoras, cavidades, vasos, células epidérmicas ou tricomas glandulares [Bakkali et al., 2008].

São extraídos de várias plantas aromáticas geralmente localizadas em países com climas temperados a quentes como a zona Mediterrânica e a zona tropical. São líquidos, voláteis, lípidos e raramente coloridos, lipossolúveis e também solúveis em solventes orgânicos com menor densidade que a água [Bakkali et al., 2008].

Há vários métodos de extracção dos óleos essenciais, incluindo uso de dióxido de carbono líquido ou micro-ondas e, principalmente destilação de baixa ou alta pressão com aplicação de água a ferver ou vapor quente. Devido às suas propriedades bactericidas e fungicidas, a sua utilização na indústria farmacêutica e alimentar é cada vez maior como alternativa a produtos químicos, de modo a favorecer o equilíbrio ecológico [Bakkali et al., 2008].

O perfil químico dos produtos do óleo essencial difere não só no número de moléculas, mas também no tipo estereoquímico das moléculas extraídas, de acordo com o tipo de extracção que é escolhida e conforme a finalidade da sua utilização. O produto da extracção pode variar em qualidade, quantidade e composição conforme o clima, composição do solo, órgão da planta, idade e estado do ciclo vegetativo. Assim, a fim de obter óleos essenciais de composição constante, eles têm de ser extraídos sob as mesmas condições e do mesmo órgão de plantas que tenham crescido no mesmo solo, sob o mesmo clima e que tenham sido colhidas na mesma altura. A maioria dos óleos essenciais comercializados são quimiotipados por cromatografia gasosa e análise por espectrometria de massa [Bakkali et al., 2008].

Hoje em dia, aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, 300 dos quais são importantes comercialmente, especialmente para as indústrias farmacêutica, agrónoma, alimentar, sanitária, cosmética e de perfumaria. Eles podem ser obtidos por fermentação ou extracção; hidrodestilação é o método mais utilizado para a produção de óleos essenciais [ABI-Ayad et al., 2011]. São conhecidos por terem actividade insecticida, antifúngica, acaricida, antibacteriana e citotóxica. Portanto, têm sido intensivamente avaliados e aplicados em várias áreas como farmacologia, microbiologia médica e clínica, patologia vegetal e preservação alimentar [Rhouma et al., 2009].

Até ao presente, estas características não mudaram muito excepto que há mais informação sobre os seus mecanismos de acção, particularmente a nível antimicrobiano [Bakkali et al., 2008]. Deve-se possivelmente às funções que os constituintes exercem nas plantas [Burt, 2004]. Na natureza, representam um importante papel na protecção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, insecticidas e também contra herbívoros, através da redução do seu apetite para tais plantas. Também podem atrair alguns

insectos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir outros que sejam indesejáveis [Bakkali et al., 2008].

A principal utilização de óleos essenciais na União Europeia (EU) é nos alimentos (como aromatizantes), perfumes e produtos farmacêuticos (pelas propriedades funcionais). O conhecido uso de óleos essenciais em aromaterapia constitui pouco mais de 2% do mercado total [Burt, 2004].

Os óleos essenciais (misturas de compostos voláteis, na maioria mono- e sesquiterpenóides, benzóides, fenilpropanóides, etc.) exercem diferentes acções biológicas nos humanos, animais e outras plantas. São extraídos por destilação e são populares como ingredientes de perfumes, cosméticos e produtos de limpeza domésticos, assim como, também são utilizados como aromatizantes de comida e bebidas. No entanto, também são bastante úteis no tratamento de diferentes doenças e a sua aplicação médica tem-se tornado muito popular [Adorjan et al., 2010].

Alguns têm revelado propriedades medicinais, podendo curar disfunções de órgãos ou distúrbios sistémicos. Devido à recente atracção para estes produtos naturais e, apesar da sua vasta utilização e de nos serem familiares como fragrâncias, é importante desenvolver uma melhor compreensão do seu princípio activo para que possam ser aplicados na saúde, agricultura e ambiente. Alguns deles podem constituir alternativas eficazes ou complementos a compostos sintéticos, sem mostrarem efeitos secundários [Bakkali et al., 2008].

A maior vantagem destes produtos naturais é que eles não adquirem resistência aos antibióticos como acontece com o uso a longo prazo de antibióticos sintéticos. Por outro lado, a composição química dos óleos essenciais, que é responsável pelas propriedades antibacterianas, é altamente dependente de vários factores como as condições climáticas e geográficas, bem como a colheita, técnicas de isolamento e armazenamento [Alexopoulos et al., 2011].

A actividade antibacteriana vai depender do tipo, composição e concentração da espécie ou do óleo essencial, a composição do substrato, o processamento e condições de armazenamento, assim como o tipo de microrganismo. Eles apresentam acção contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e ainda sobre leveduras e fungos filamentosos [Silva et al., 2009]. Um dos patógenos mais comuns que causam intoxicação alimentar e que é frequentemente responsável por infecções nosocomiais é o *Staphylococcus aureus*. O aparecimento de colónias de *S. aureus* resistentes a antibióticos com surtos de infecção entre pacientes hospitalizados é um problema grave pelo mundo inteiro [Alexopoulos et al., 2011].

Nos últimos anos, a pesquisa de agentes antimicrobianos seguros e eficazes continua, com os quais pode ser tratada uma vasta variedade de infecções bacterianas. Esta necessidade foi reforçada recentemente pelo aparecimento de muitos organismos resistentes a bactérias [ABI-Ayad et al., 2011].

A utilização de substâncias naturais como os óleos essenciais para o controlo de doenças pós-colheita e a sua utilização eficaz como agentes antimicrobianos, ingredientes funcionais em alimentos, bebidas, artigos de higiene pessoal e cosméticos está a ganhar força, tanto

pelo crescente interesse dos consumidores em ingredientes de fontes naturais, como pela preocupação com aditivos sintéticos potencialmente prejudiciais [ABI-Ayad et al., 2011].

1.1 História da utilização dos óleos essenciais

Apesar de as especiarias terem sido utilizadas pelo seu aroma, sabor e propriedades preservativas desde a antiguidade, dos óleos essenciais conhecidos, apenas o óleo de terebentina foi mencionado pelos historiadores Gregos e Romanos. A destilação como método de produção de óleos essenciais foi usado há mais de 2000 anos no Oriente (Egipto, Índia e Pérsia) e foi melhorado no século IX pelos Árabes. A primeira descrição autêntica da destilação de um óleo essencial foi atribuída a Villanova (1235-1311), um físico catalão. No decorrer do século XIII, os óleos essenciais eram feitos pelas farmácias e os seus efeitos farmacológicos foram descritos em farmacopeias, no entanto o seu uso não parece ter sido espalhado pela Europa até ao Século XVI, a partir do qual começaram a ser comercializados na cidade de Londres [Burt, 2004].

Pensa-se que o termo “óleo essencial” deriva do nome cunhado no século XVI pelo reformista de medicina suíço, Paracelsus von Hohenheim; ele nomeou o componente eficaz de uma droga *Quinta essentia* [Burt, 2004].

De acordo com um físico francês, Joseph Du Chesne (Quercetanus), no século XVII a preparação dos óleos essenciais era bastante conhecida e as farmácias normalmente armazenavam 15-20 óleos diferentes. O uso de óleo da árvore do chá para fins medicinais tem sido documentado desde a colonização da Austrália no final do século XVIII, embora seja provável que tenha sido utilizado pelos nativos australianos antes disso [Burt, 2004].

O primeiro estudo experimental das propriedades bactericidas dos vapores de óleos essenciais diz-se ter sido realizado por De La Croix em 1881. No entanto, no decorrer dos séculos XIX e XX a utilização destes óleos em medicina foi-se tornando secundária em relação à sua utilização pelo sabor e aroma [Burt, 2004].

1.2 Utilização dos óleos essenciais na indústria alimentar

Foi estimado que cerca de 30% de pessoas em países industrializados sofrem de intoxicações alimentares todos os anos e em 2000, pelo menos 2 milhões de pessoas morreram de doença gastrointestinais por todo o mundo. Há assim uma necessidade de encontrar novos métodos para reduzir ou eliminar patógenos de origem alimentar, possivelmente em combinação com métodos já existentes. Ao mesmo tempo, a sociedade ocidental parece estar a viver uma tendência de consumismo “verde”, desejando menos aditivos alimentares sintéticos e produtos com menor impacto ambiental. Além disso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem chamado a atenção para a redução no consumo de sal, de maneira a reduzir a incidência de doenças cardiovasculares (OMS, 2002b). Se o nível de sal em comidas processadas for reduzido, é possível que sejam necessários outros aditivos para manter as

propriedades e a segurança dos alimentos. Há ainda a ambição de encontrar novos métodos que sejam ecológicos e naturais. Uma possibilidade seria então a utilização de óleos essenciais como aditivos antibacterianos [Burt, 2004].

1.2.1 Actividade nos sistemas alimentares

A influência moduladora da composição dos alimentos sobre a eficácia antibacteriana dos óleos essenciais é uma área de estudo importante. Quando usados em sistemas alimentares, os óleos essenciais são necessários em grandes quantidades (1-3%) e estes níveis são muitas vezes mais elevados do que seria organolepticamente aceitável. A presença de hidratos de carbono, proteína, sal e o valor de pH influencia a eficácia destes agentes nos alimentos. O potencial antibacteriano também é reduzido nos alimentos com baixa actividade de água [Holley et al., 2005].

O óleo de menta é naturalmente hidrofóbico, logo é mais solúvel na fracção lipídica da comida, enquanto os microrganismos se isolam na parte hidrofílica. Estas reacções podem diminuir a oportunidade de contacto entre o antimicrobiano e o organismo alvo. Para além da gordura e proteína, o pH destes sistemas alimentares é um factor importante afectando a actividade dos óleos. A baixo pH, a hidrofobicidade de alguns óleos essenciais aumenta e mesmo que tendam a isolar-se na zona lipídica do alimento, também se podem dissolver mais facilmente na fase lipídica da membrana da bactéria, melhorando a acção antibacteriana [Holley et al., 2005].

Quando usados nos alimentos, os óleos essenciais voláteis às vezes perdem-se durante operações de processamento. A tecnologia de microencapsulação é um modo de prevenção para essas perdas por volatilização. Esta técnica está a ser muito utilizada na indústria farmacêutica para distribuição controlada do fármaco. Também é actualmente utilizada na indústria alimentar para estabilização do sabor. Através da encapsulação de óleos essenciais antibacterianos, não só ficam protegidos do calor, mas também podem ser aplicados nos produtos em quantidades controladas (concentrações inibitórias eficazes) durante longos períodos e assim prolongar a duração dos produtos [Holley et al., 2005].

1.2.2 Aplicações medicinais futuras

A capacidade citotóxica dos óleos essenciais, baseada numa actividade pró-oxidativa, pode fazer deles excelentes antissépticos e agentes antimicrobianos de uso pessoal, isto é, para purificação do ar, higiene pessoal ou até uso interno consumindo por via oral, e uso insecticida para preservação de culturas ou alimentos armazenados [Bakkali et al., 2008].

Uma grande vantagem dos óleos essenciais é o facto de serem desprovidos de riscos genotóxicos a longo prazo. Além disso, alguns mostram uma capacidade antimutagénica bastante evidente que pode estar ligada a uma actividade anticarcinogénica. Estudos recentes demonstraram que a actividade pró-oxidativa dos óleos essenciais ou de alguns dos seus constituintes, assim como de alguns polifenóis, é muito eficiente na redução do volume

de tumores locais ou da proliferação de células do tumor, através de efeitos necróticos ou apoptóticos [Bakkali et al., 2008].

Muitas células tumorais são caracterizadas por alterações graves no metabolismo energético, superprodução mitocondrial e stress oxidativo permanente. Os óleos essenciais, devido à sua capacidade para interferir com as funções mitocondriais, podem provocar efeitos que os tornam agentes anti-tumorais. Muitos agentes produtores de radicais são usados em tratamentos anti-tumorais. No caso dos óleos essenciais, a produção de radicais pode ser muito bem controlada e com alvos definidos sem apresentar qualquer efeito secundário tóxico ou mutagénico nos tecidos saudáveis. Assim, os óleos essenciais podem constituir um avanço da medicina tradicional para a medicina moderna [Bakkali et al., 2008].

1.3 Composição química dos óleos essenciais

A destilação a vapor é a mais utilizada para a produção de óleos essenciais numa base comercial. A extracção através de Dióxido de Carbono líquido a baixa temperatura e alta pressão produz um perfil organoléptico mais natural mas torna-se mais dispendioso. A diferença no perfil organoléptico indica a diferença na composição dos óleos obtidos por extracção por solvente ao contrário da destilação e isto também influencia as propriedades antimicrobianas. Isto pode ser confirmado pelo facto dos óleos essenciais extraídos pelo hexano mostrarem uma maior actividade antimicrobiana que os correspondentes óleos destilados a vapor. Também por serem voláteis e para prevenir alterações de composição devem ser armazenados no escuro [Burt, 2004].

Normalmente, os óleos essenciais produzidos a partir de plantas colhidas durante ou imediatamente a seguir à floração possuem uma actividade antimicrobiana muito mais forte. A composição dos óleos essenciais de diferentes partes da mesma planta também podem diferir bastante. Por exemplo, aquele obtido das sementes do coentro (*Coriandrum sativum* L.) tem uma composição bastante diferente do óleo obtido das folhas verdes da mesma planta [Burt, 2004].

Os óleos essenciais são misturas naturais muito complexas que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações bastante diferentes. São caracterizados por dois ou três componentes maioritários em concentrações bastante elevadas (20-70%) comparados com outros componentes presentes em quantidades vestigiais. Normalmente, os componentes maioritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais [Bakkali et al., 2008]. No entanto, há evidências que os componentes minoritários também têm um papel importante na actividade antibacteriana, possivelmente devido ao efeito sinérgico entre estes componentes [Burt, 2004].

Os componentes fenólicos são os principais responsáveis pelas suas propriedades antibacterianas [Burt, 2004].

Tabela 1.1: Compostos maioritários de Óleos Essenciais seleccionados com propriedades antibacterianas [Burt, 2004].

Common name of EO	Latin name of plant source	Major components	Approximate % composition ^b
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i> (immature leaves)	Linalool	26%
Coriander	<i>Coriandrum sativum</i> (seeds)	E-2-decanal	20%
		Linalool	70%
		E-2-decanal	–
Cinnamon	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	Trans-cinnamaldehyde	65%
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	Trace-80%
		Thymol	Trace-64%
		γ -Terpinene	2–52%
		p-Cymene	Trace-52%
Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pinene	2–25%
		Bornyl acetate	0–17%
		Camphor	2–14%
		1,8-cineole	3–89%
Sage	<i>Salvia officinalis</i> L.	Camphor	6–15%
		α -Pinene	4–5%
		β -pinene	2–10%
		1,8-cineole	6–14%
		α -tujone	20–42%
Clove (bud)	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	75–85%
		Eugenyl acetate	8–15%
Thyme	<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol	10–64%
		Carvacrol	2–11%
		γ -Terpinene	2–31%
		p-Cymene	10–56%

Os componentes dos óleos essenciais dividem-se em dois grupos de origem biossintética distinta, sendo o principal composto de terpenos e terpenóides, e o outro composto de constituintes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por um baixo peso molecular (Figura 1.1) [Bakkali et al., 2008].

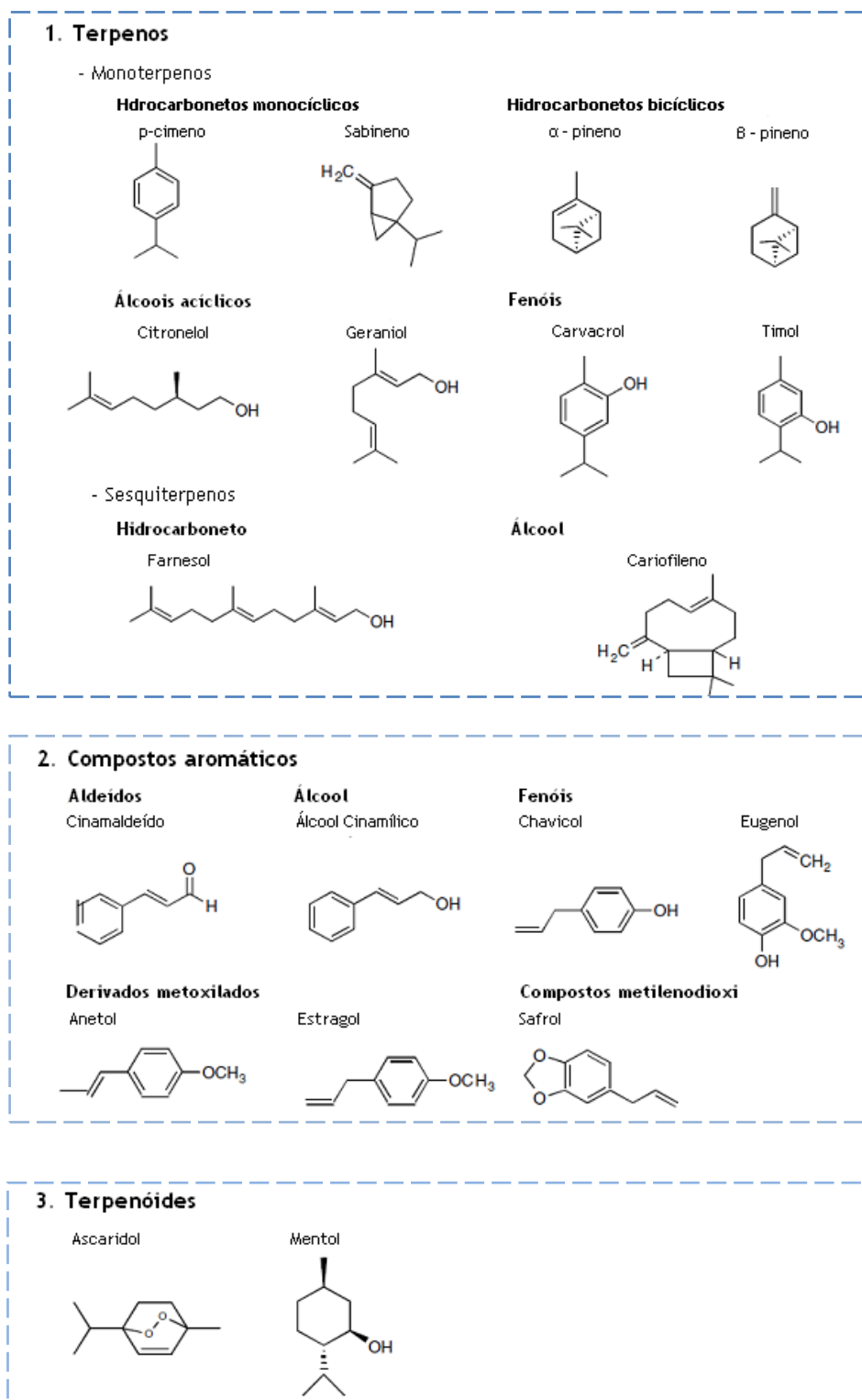


Figura 1.1 - Estruturas químicas de alguns componentes dos óleos essenciais: (1) Terpenos; (2) Compostos aromáticos; (3) Terpenóides. [Adaptado de Bakkali et al., 2008].

1.3.1 Terpenos

Os terpenos formam diferentes classes de acordo com a estrutura e função. São feitos de combinações entre várias cadeias de 5 Carbonos denominadas isoprenos. A biossíntese dos terpenos consiste na síntese do precursor difosfato de isopentenilo (IPP) [Bakkali et al., 2008].

A biossíntese dos terpenos nas plantas dá-se a partir de duas vias: a via do ácido mevalónico e a via do fosfato do metileritritol (MEP), para a produção de IPP (Figura 1.2) [Cowan, 1999].

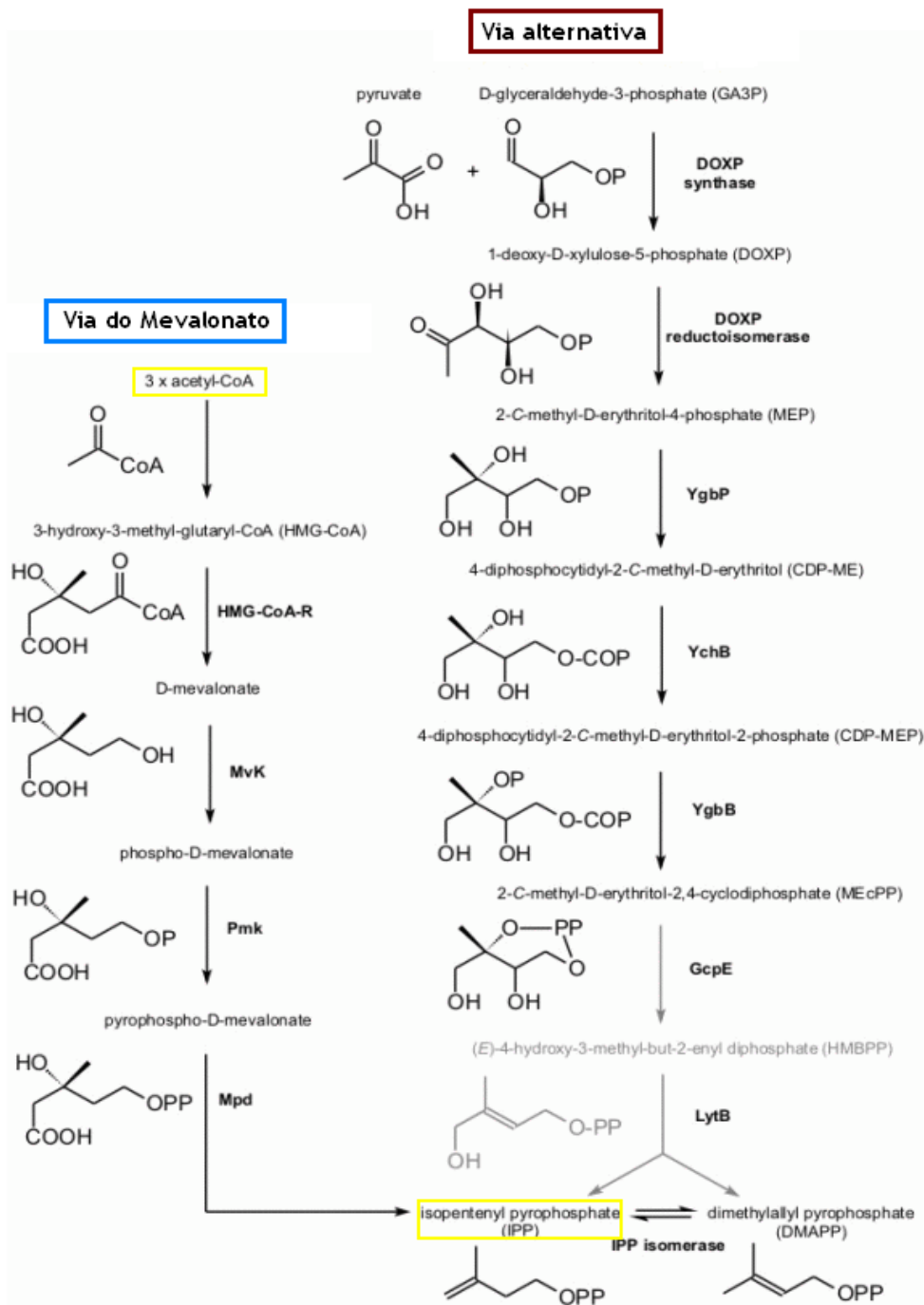


Figura 1.1 - Via do Mevalonato para produção de IPP, a unidade básica para a biossíntese de terpenos. A síntese de cada unidade requer 3 moléculas de Acetil-coA (consultada em <http://www.ugr.es/~quired/pnatu/terpenoides.htm> a 15 de Maio de 2011).

A biossíntese dos terpenos consiste na síntese do precursor do Difosfato de Isopentenil (IPP), adições repetitivas de IPP para formar o precursor prenildifosfato das várias classes de terpenos, modificação do prenildifosfato alílico por sintetases específicas de terpenos para formar o esqueleto do terpeno e, finalmente, modificação enzimática secundária (reacção redox) do esqueleto para atribuir propriedades funcionais aos diferentes terpenos [Bakkali et al., 2008].

Os principais terpenos são os monoterpénos (C₁₀) e os sesquiterpenos (C₁₅), mas os outros derivados como: os hemiterpenos (C₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀) e politerpenos também existem (Figura 3 e 4) [F. Bakkali et al, 2008]. Os terpenos apresentam várias bioactividades, sendo activos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. O seu mecanismo de acção contra os mesmos ainda não está totalmente compreendido, mas pensa-se que está envolvido com a ruptura da membrana pelos componentes lipofílicos [Cowan, 1999].

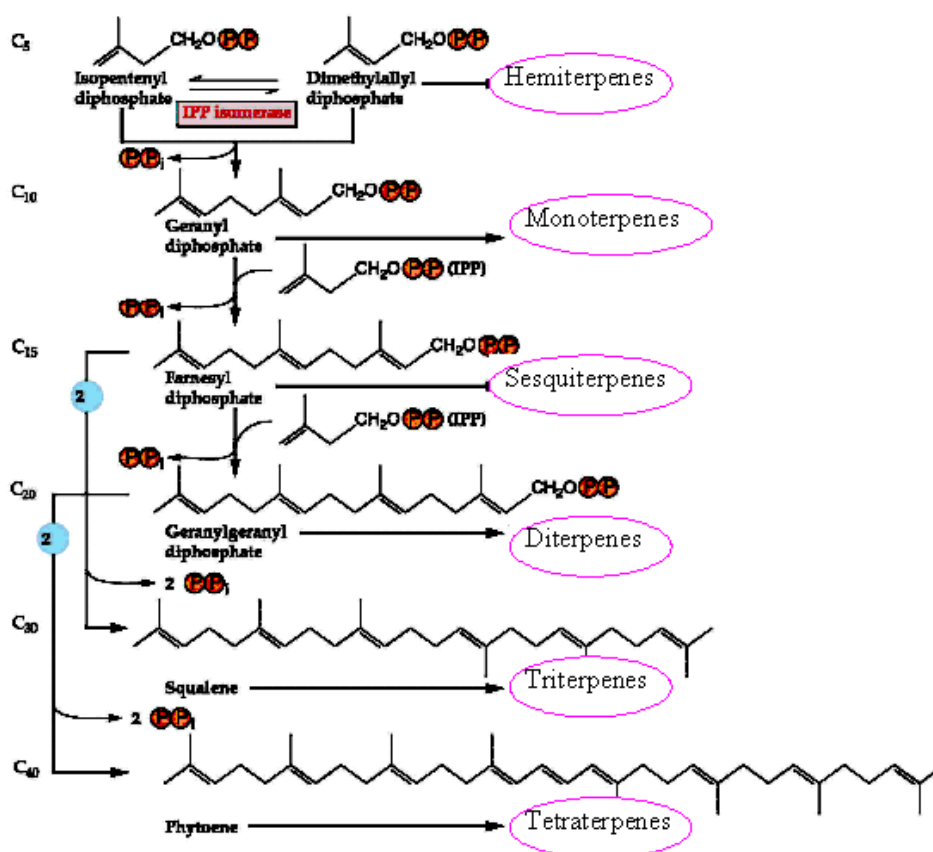


Figura 1.2 - Isomerização do IPP a Dimetilalilpirofosfato (DMAPP), adição repetitiva de IPP e DMAPP (consultada em <http://www.ugr.es/~quored/pnatu/terpenoides.htm> a 15 de Maio de 2011).

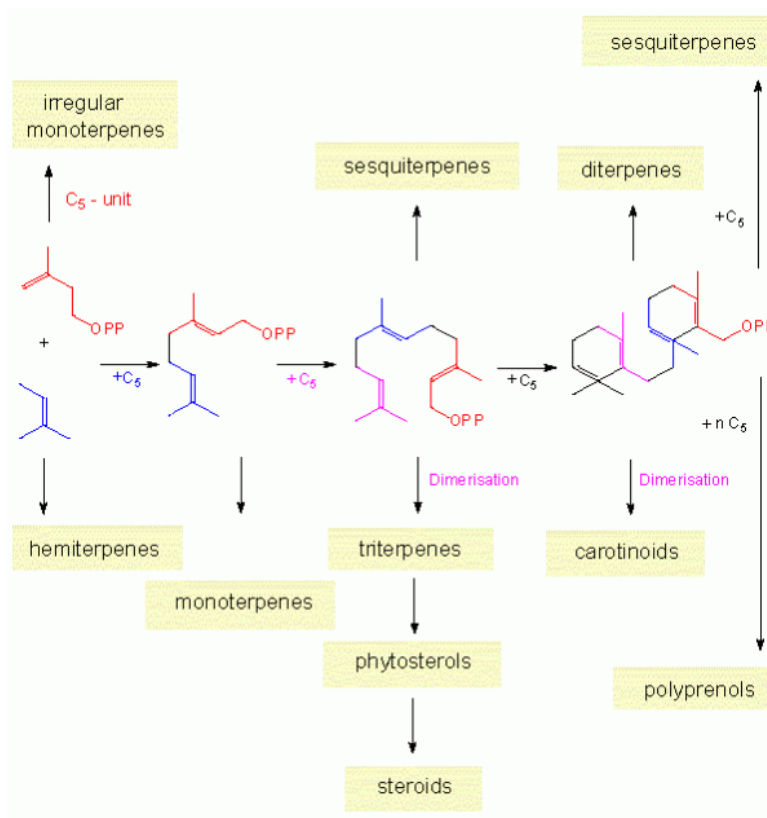


Figura 1.4 - Principais terpenos e seus derivados (consultada em <http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/terpenoides.htm> a 15 de Maio de 2011).

Um terpeno que contém oxigénio é denominado de terpenóide [Bakkali et al.,2008]. Os terpenóides são sintetizados a partir de unidades de acetato, e como tal, eles compartilham as suas origens com ácidos gordos. Estes diferenciam-se dos ácidos gordos por terem uma extensa ramificação e são ciclizados. Os terpenóides são também activos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários [Cowan, 1999].

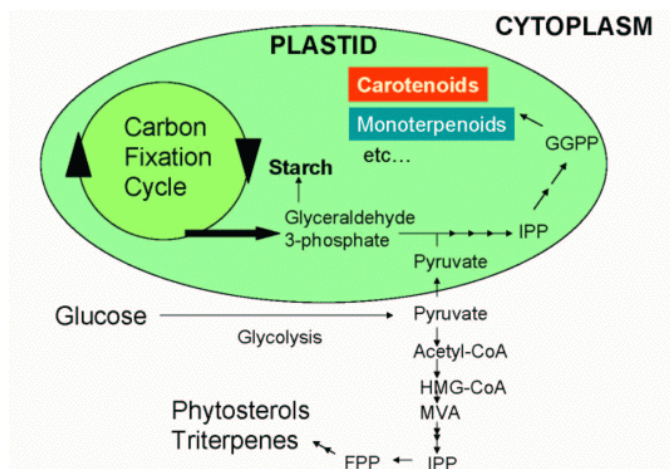


Figura 1.3 - Biossíntese de Terpenóides (consultada em <http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/terpenoides.htm> a 15 de Maio de 2011)

1.3.1.1 Monoterpenos

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

- Hidrocarbonetos:
 - *acíclicos*: mirceno, ocimeno, etc.;
 - *monocíclicos*: terpinenos, p-cimeno, felandrenos, etc.;
 - *bicíclicos*: pinenos, δ -3-careno, canfeno, sabineno, etc.
- Álcoois:
 - *acíclicos*: geraniol, linalol, citronelol, lavandulol, nerol, etc.;
 - *monocíclicos*: mentol, α -terpineol, carveol;
 - *bicíclicos*: borneol, fenchol, chrysanthenol, tuian-3-ol, etc.
- Aldeídos:
 - *acíclicos*: geranial, neral, citronelal, etc.
- Cetona:
 - *acíclicos*: tagetone, etc.;
 - *monocíclicos*: mentonas, carvona, pulegona, piperitona, etc.;
 - *bicíclicos*: canfora, fenchona, tujona, ombelulona, pinocamphona, pinocarvona, etc.
- Ésteres:
 - *acíclicos*: acetato de linalilo ou propionato, acetato de citronelilo, etc.;
 - *monocíclicos*: acetatos de mentilo ou α -terpinilo, etc.;
 - *bicíclicos*: acetato de isobornilo, etc.
- Éteres: 1,8-cineole, mentofurano, etc.
- Peróxidos: ascaridole, etc.
- Fenóis: timol, carvacrol, etc.

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

1.3.1.2 Sesquiterpenos

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

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

Exemplos de plantas que contêm estes compostos são bergamota, cominho, aipo, coentro, eucalipto, lavanda, limão, hortelã, laranja, pinho, alecrim, sálvia, tomilho [Bakkali et al., 2008].

1.3.2 Componentes aromáticos

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

Os componentes aromáticos compreendem:

- Aldeídos: cinamaldeído;
- Álcool: álcool cinâmico;
- Fenóis: chavicol, eugenol;
- Derivados metoxilados: anethole, elemicine, estragole, metileugenoles;
- Componentes metilenodioxí: apiole, miristicine, safrole.

As principais fontes de plantas para estes compostos são anís, canela, cravo, erva-doce, noz-moscada, salsa, estragão e algumas famílias botânicas (*Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*) [Bakkali et al., 2008].

Classe	Subclasse	Exemplos	Mecanismo de ação
Fenólicos	Fenóis simples	Catecol Epicatequina	Impedir entrada de substrato Desintegração da membrana
	Fenólicos ácidos	Ácido cinâmico	?
	Quinonas	Hipericina	Ligação com adesinas, inativa enzimas, complexo com parede celular
	Flavonóide	Crisina	Ligação com adesinas
	Flavonas	Abissinona	Complexo com parede celular Inativa enzimas e inibe HIV transcriptase reversa
	Taninos	Ellagitanina	Privação de substrato, perturbação da membrana, ligação com adesinas, ligação com proteínas, complexos com ion metal
	Cumarina	Warfarina	Interação com DNA eucarioto (atividade antiviral)
Terpenóides, óleos essenciais		Capsaicina	Desintegração da membrana
Alcalóides		Berberina Piperina	Interage com parede celular e/ou DNA
Lecitina e Polipeptídeos		Aglutina manose específica	Forma pontes dissulfeto e interfere com a replicação viral
Poliacetilenos			?

Fonte: Adaptado de Cowan 1999.

Figura 1.6 - Principais classes de compostos com actividade antimicrobiana obtidas de plantas [Burt, 2004].

1.4 Métodos para determinação do potencial antimicrobiano

A maioria dos métodos usados para avaliar a actividade antimicrobiana em especiarias, ervas e seus óleos essenciais são adaptações dos que foram delineados por Zaika (1988), mas a detecção de impedância e testes de gradiente em espiral são novos. A maioria dos investigadores utiliza meio agar ou uma série de diluições em caldo, ou ambos para fins comparativos porque o desempenho antimicrobiano pode variar entre os dois sistemas. Apesar de a macrodiluição em tubos e a difusão de vapor em superfícies de agar ainda serem muito utilizadas, há uma elevada confiança em sistemas com placas de micropoços contendo inibidores e organismos alvo em caldo. A eficácia do inibidor é medida pelas diferenças nas taxas de alteração da densidade óptica dos poços, e o número de bactérias nos poços sem turvação é controlado por espalhamento em placas de agar com enumeração após a incubação. No entanto, os sistemas baseados na absorvância em caldo têm falta de sensibilidade abaixo de $5 \log_{10}$ bactérias/mL. Isto foi ultrapassado pela aplicação da medição de impedância usando caldo inoculado. O *Bactometer* (Vitek Systems, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) é muito usado para medir alterações na condutividade dos testes em caldo, que ocorrem após a produção de metabolitos bacterianos. Um tempo de detecção é medido e pode ser usado para estimar alterações na duração da fase *lag* antes de se desenvolver

turvação. Estes sistemas podem também distinguir entre efeitos bacteriostáticos e bactericidas [Holley et al., 2005].

A solubilidade de muitos compostos fenólicos em meios aquosos é difícil. Os investigadores têm usado Dimetilsulfóxido (DMSO), 2.5 - 6% de etanol, Tween 20 ou 80 e até Monolaurato de sorbitano para facilitar a dispersão antimicrobiana no meio. Enquanto os controlos para monitorizar possíveis efeitos do solvente sobre a viabilidade bacteriana devem ser incluídos quando este é utilizado, há sempre a possibilidade de efeitos interactivos que não podem ser avaliados com apenas um controle para o solvente. A hidrofobicidade dos compostos fenólicos limita o valor dos testes do disco em agar ou de difusão de vapor para estimar o potencial antimicrobiano com precisão. Desde que os óleos essenciais são caracterizados como sendo voláteis, têm sido delineados e modificados métodos que testam a actividade antimicrobiana destes agentes na fase de vapor. Num estudo recente, foram inoculados discos de agar com a bactéria a ser testada e introduzidos num frasco de vidro com o óleo essencial que, por sua vez, foi colocado num vidro de relógio. O frasco foi fechado e colocado à temperatura desejada para haver libertação de vapor do óleo essencial. A viabilidade das células expostas na superfície de agar foi mais tarde avaliada. O sistema funcionou bem e permitiu a quantificação do inibidor na fase de vapor [Holley et al., 2005].

Apesar de placas de gradiente de agar não serem muito comuns, Razavi-Rohani e Griffiths (1994) usaram uma solução de Monolaurato de Glicerol (um éster de ácidos gordos) para formar um gradiente antimicrobiano concêntrico controlado na superfície de placas inoculadas com o dispositivo de *spiral plating* (Spiral Biotech, Norwood MA). Uma vez equilibrado o gradiente, a superfície das placas é inoculada com organismos teste e o teste de gradiente espiral é usado para calcular a concentração mínima inibitória (MIC, concentração mínima à qual o nível de inóculo é mantido ou reduzido). Os resultados podem ser lidos por um software e este sistema pode ser aplicado a antimicrobianos naturais menos voláteis e mais hidrofílicos [Holley et al., 2005].

Outro sistema que mostra ser promissor é o *Bioscreen Microbiological Growth Analyser* usado por Lambert *et al* (2001) para avaliar a actividade do óleo essencial de orégão e os seus componentes maioritários, timol e carvacrol, contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. O dispositivo permite a avaliação simultânea de concentrações antimicrobianas múltiplas e calcula o MIC baseado em processos matemáticos [Holley et al., 2005].

Outro desenvolvimento muito útil é a adopção de placas de micropoços contendo caldo ao qual é adicionado 0,15% de agar para suspender antimicrobianos parcialmente solúveis na matriz de agar coloidal. Este método continua a ser utilizado e, como descrito originalmente, o caldo pode conter corante de Resazurina como indicador redox para dar um sinal visível do crescimento bacteriano. Um pré-requisito é que cada cadeia de testes deve ser calibrada para a capacidade de redução do corante resazurina antes de serem feitos os testes, tendo em conta que as taxas podem variar. A concentração celular óptima é cerca de um \log_{10} mais baixo que o nível necessário para reduzir a Resazurina a uma cor rosa/violeta. As placas de micropoços são atractivas para este tipo de estudo porque são necessários pequenos volumes

de reacção ($\leq 300\mu\text{L}/\text{teste}$), os testes em replicado são facilmente preparados e podem ser estudados dois ou mais antimicrobianos simultaneamente, para examinar efeitos interactivos (sinérgicos ou antagónicos). Walsh *et al.* (2003) usou diluições em caldo convencionais para alterações na absorvância a 540 nm assim como MIC's, determinados pela colocação de 1 mL de cultura bacteriana ($6 \log_{10}$ CFU/mL) em placas de agar contendo o inibidor antimicrobiano natural. Após incubação, os testes foram comparados com as placas de controlo sem inibidor. Esta técnica pode ser recomendada para a monitorização de antimicrobianos naturais [Holley *et al.*, 2005].

Iscan *et al.* (2002) usou uma combinação de microdiluição, difusão em agar e um ensaio para examinar a actividade do óleo essencial de menta contra patógenos de humanos e plantas. Para o ensaio, as amostras foram sujeitas a cromatografia de camada fina (TLC) em placas paralelas. Uma delas foi desenvolvida quimicamente e a outra foi coberta por agar, inoculada com o organismo de teste e incubada a 37°C durante 24h. A outra foi pulverizada com 1% de violeta de tetrazolium, incubada 1h a 37°C e as zonas de inibição observadas contra o fundo colorido [Holley *et al.*, 2005].

Há a preocupação de que os óleos essenciais podem ser apenas parcialmente libertados durante a trituração, deixando parte dele em compartimentos celulares e indisponível para a reacção com os organismos alvo. Há claramente uma necessidade de adoptar protocolos padrão para a avaliação dos antimicrobianos naturais, durante testes *in vitro*, para evitar resultados contraditórios. No entanto, é pouco provável que um único método padrão seja o recurso geral. Isto porque os estudos muitas vezes têm diferentes objectivos e, frequentemente, aplicam diferentes planos experimentais. Isto leva a diferentes necessidades com respeito a temperatura de incubação, pH e duração da exposição (horas ou semanas). Há uma série de outros factores que influenciam resultados experimentais durante testes de potencial antimicrobiano. Isto inclui: variabilidade da composição ou conteúdo de agentes activos que resultam do historial agronómico, diferenças de variedade e maturidade da planta estudada; características físicas e químicas do próprio antimicrobiano (hidrofobicidade, volatilidade, compatibilidade com o sistema de teste); presença de proteína, amido ou lípido com os quais podem formar complexos e neutralizar a actividade antimicrobiana ou isolar o agente do alvo; a concentração dos inoculos, género ou espécie de microrganismo. Diferenças na sensibilidade das células-alvo possivelmente resultam de diferenças no estado fisiológico das culturas testadas, sendo as células na fase estacionária mais resistentes. O controlo incompleto destes factores pode levar a obtenção de resultados inconsistentes. Talvez a maior causa de variações nos resultados dos estudos provenha do uso de antimicrobianos naturais não padronizados de diferentes potências e composições [Holley *et al.*, 2005].

1.5 Actividade antibacteriana

Os óleos essenciais de plantas têm demonstrado actividade contra *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Shigella spp.*, *Salmonella enterica typhimurium* e *enteritidis*, e *Escherichia coli*, assim como fungos unicelulares (leveduras) e multicelulares (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*) [Holley et al., 2005].

Há pouca informação disponível sobre a interacção entre os constituintes dos óleos essenciais e dos efeitos que eles têm na actividade antimicrobiana. Os componentes fenólicos são responsáveis pela acção antimicrobiana e pensa-se que os outros constituintes têm pouca actividade. A confiança no uso dos óleos essenciais como antimicrobianos pode ser aumentada se o seu conteúdo em agentes activos for padronizado por destilação [Holley et al., 2005].

A acção aditiva ou sinérgica foi observada contra todas as bactérias Gram-positivas e ainda *Yersinia enterocolitica* e a mistura foi antagonista para *P. fragi*, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium* [Holley et al., 2005].

Óleos essenciais de plantas têm sido muito testados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Por exemplo, Farag *et al.* (1989) examinou a actividade antimicrobiana do óleo de sálvia, tomilho e folhas de rosmaninho, frutos de Alcaravia, bolbos da flor do cravo-da-índia e frutos de cominho contra bactérias Gram-negativas (*P. fluorescens*, *E. coli*, e *Serratia marcescens*) e Gram-positivas (*S. aureus*, *Micrococcus spp.*, *Sarcina spp.* e *B. subtilis*). Observou que estes óleos essenciais têm nenhum ou muito pouco efeito contra bactérias Gram-negativas. Entre estas bactérias analisadas, o género *Pseudomonas* apresenta alta ou mesmo a mais alta resistência para estes antimicrobianos. Não obstante, como as *Pseudomonas* são frequentemente responsáveis por alterações da comida armazenada a baixas temperaturas, têm sido muito utilizadas como células alvo e a aplicação de alguns componentes de óleos essenciais a altas concentrações têm sido relatados como sendo efectivos [Holley et al., 2005].

1.6 Mecanismos de acção antimicrobiana dos óleos essenciais

A expressão de actividade antimicrobiana é frequentemente muito evidente, mas o mecanismo de acção não é completamente compreendido. Um dos efeitos inibitórios mais graves surge em dois relatórios separados onde o exterior das duas membranas celulares da *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* desintegram após exposição ao carvacrol e timol [Holley et al., 2005].

Leveduras e bactérias Gram-positivas não mostraram tais alterações na morfologia da membrana celular. Provavelmente, isto deve-se à solubilidade dos lipopolissacáridos (LPS) da membrana externa, em solventes fenólicos. Houve um consenso geral que os compostos

aromáticos e fenólicos exercem os seus efeitos antimicrobianos na membrana citoplasmática alterando a estrutura e função. O efluxo de K^+ é normalmente um sinal inicial de dano e é sempre seguido por efluxo dos constituintes citoplasmáticos. A perda do carácter de permeabilidade da membrana citoplasmática é frequentemente identificada como a causa da morte celular. Alguns investigadores têm explorado mais o assunto, concluindo que a perda da função da membrana é apenas parte da explicação para a actividade antimicrobiana [Holley et al., 2005].

Considerando o número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é muito provável que a sua actividade antibacteriana não seja atribuível a um mecanismo específico. [Burt, 2004]. Outros acontecimentos que podem levar à disfunção da membrana e consequente ruptura incluem: a dissipação dos dois componentes da força motriz prótonica nas células (o gradiente de pH e o potencial eléctrico), quer por alterações no transporte iónico, quer pela despolarização causada por alterações estruturais na membrana; interferência com o sistema de geração de energia (ATP); ou ainda inibição enzimática impedindo a utilização do substrato para produção de energia [Holley et al., 2005].

Nem todos os mecanismos são alvos separados, alguns são consequência de ataques a outros pontos da célula. Uma importante característica dos óleos e seus componentes é a hidrofobicidade, o que lhes permite distribuírem-se por entre os lípidos da membrana e da mitocôndria, alterando a estrutura da célula e tornando-a mais permeável. Consequentemente, pode ocorrer perda de iões e outros conteúdos celulares que podem levar à morte da célula. Há estudos que mostram que a morte celular pode ocorrer antes da lise [Burt, 2004].

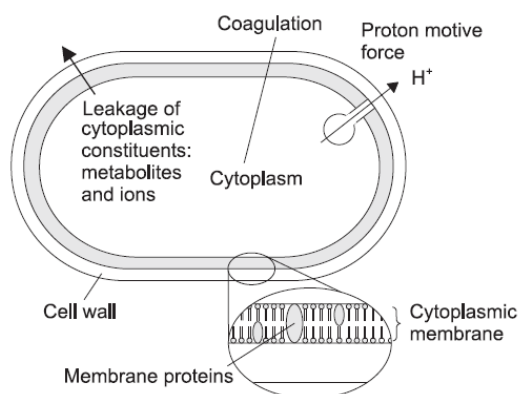


Figura 1.7 - Localizações e mecanismos na célula bacteriana dos sítios de acção dos componentes dos óleos essenciais: degradação da parede celular; dano da membrana citoplasmática; dano das proteínas membranares; fuga dos componentes da célula; coagulação do citoplasma e diminuição da força motriz dos prótons [Adaptado de Burt, 2004].

Muitos óleos essenciais têm a capacidade de aumentar a distribuição transdermal de drogas. São conhecidos como promotores da absorção ou aceleradores. Também podem

penetrar na pele e diminuir a barreira de resistência, pela interacção com os lípidos da pele [Adorjan et al., 2010].

Apresentam propriedades anti-nociceptivas (ligado ao sistema nervoso), anticancerígenas, anti-inflamatórias, repelentes de insectos, antivirais e antioxidantes [Adorjan et al., 2010].

Os óleos essenciais actuam contra os microrganismos causando muitas vezes instabilidade na membrana plasmática levando à lise celular. Este efeito é devido à existência de compostos antimicrobianos nos óleos que pertencem à classe dos terpenóides (mas não unicamente a essa classe) como o timol e carvacrol. Apesar de a actividade antimicrobiana poder ser desencadeada por um único composto químico, normalmente parece um resultado da sinergia entre vários compostos químicos presentes no óleo [Silva et al., 2010].

Os óleos essenciais e seus componentes são conhecidos por serem activos contra uma vasta variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram-negativas. Todas as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana exterior que constitui uma superfície hidrofílica, devido à presença de lipopolissacáridos (LPS). Pequenas moléculas hidrofílicas são capazes de atravessar essa membrana exterior através de porinas que constituem canais transmembranares hidrofílicos, assim a membrana serve como barreira contra macromoléculas e compostos hidrofóbicos e é por essa razão que as bactérias Gram-negativas são relativamente resistentes aos antibióticos hidrofóbicos ou drogas tóxicas. No entanto, a membrana nem sempre é totalmente impermeável a estas moléculas, por isso, atravessá-la é um pré-requisito para qualquer substância exercer a sua actividade bactericida contra estas bactérias Gram-negativas [Helander et al., 1998].

Em bactérias Gram-positivas como a espécie *Staphylococcus aureus*, há evidências de uma forte inibição de crescimento e actividade de algumas características metabólicas como a coagulase, lipase e tolerância ao sal [Alexopoulos et al., 2011].

Por conseguinte, deverá ser útil avaliar a actividade dos compostos antimicrobianos presentes nas plantas contra as bactérias em vários sistemas alimentares [Helander et al., 1998].

A estrutura química dos componentes afecta o seu modo de acção e actividade antibacteriana. A importância da presença do grupo hidroxilo nos compostos fenólicos como o carvacrol e timol foi confirmada. A posição relativa do grupo hidroxilo no anel fenólico não parece influenciar muito o grau de actividade antibacteriana [Burt, 2004].

Componentes dos óleos essenciais também actuam nas proteínas membranares. Enzimas como ATPases estão localizadas na membrana citoplasmática e rodeadas de moléculas lipídicas. Dois possíveis mecanismos foram sugeridos sendo que os hidrocarbonetos cíclicos podem actuar nestes. As moléculas hidrocarbonadas lipofílicas podem acumular-se na bicamada lipídica e deformar a interacção lípido-proteína; em alternativa, é possível haver interacções directas dos compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas da proteína [Burt, 2004].

Cox *et al.* (2000) mostrou que o óleo da árvore do chá que contém terpinen-4-ol (um monoterpene cíclico que é o principal responsável pela actividade antimicrobiana) inibiu a

respiração oxidativa em *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e uma levedura; assim como induziu o inchaço da membrana e aumentou a permeabilidade membranar. Certamente, a capacidade dos fenólicos para interferir com o metabolismo celular através de um número de mecanismos (complexos de substrato, ruptura da membrana, inactivação enzimática e quelação de metais) é bem conhecida. É também evidente que a sua capacidade de se isolarem da água e penetrarem na membrana são factores importantes que têm influência na sensibilidade ou resistência das células expostas [Holley et al., 2005].

Estudos com sondas fluorescentes confirmaram que os óleos essenciais aumentam a permeabilidade da membrana e que os componentes do óleo se dissolvem na membrana causando inchaço e reduzindo a função da membrana. A dimensão da diluição na membrana do antimicrobiano não está relacionada com a actividade antimicrobiana global no caso do carvacrol e o seu precursor p-Cimeno [Holley et al., 2005].

É concebível que pequenas diferenças na concentração do antimicrobiano pode determinar o acontecimento bioquímico que domina a inibição do crescimento celular ou causa a morte. A presença de grupos hidroxilo nos álcoois de longa cadeia está correlacionada com a actividade inibitória [Holley et al., 2005].

1.6.1 Carvacrol e Timol

O modo de acção do carvacrol, um dos componentes dos óleos de orégão e tomilho, recebeu uma maior atenção dos investigadores. O timol é estruturalmente muito semelhante ao carvacrol, tendo o grupo hidroxilo numa diferente localização do anel fenólico. Ambos têm um efeito de permeabilização da membrana [Burt, 2004].

O carvacrol e o timol são capazes de desintegrar a membrana exterior de bactérias Gram-negativas, libertando lipopolissacáridos (LPS) e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática para o ATP. A presença de Cloreto de Magnésio mostrou influenciar esta acção, sugerindo um outro mecanismo que não a simples quelação de catiões na membrana exterior [Burt, 2004].

Estudos com *Bacillus cereus* demonstraram que o carvacrol interage com a membrana celular, onde se dissolve na bicamada fosfolipídica e se alinha entre as cadeias de ácidos gordos. Esta distorção da estrutura física pode causar expansão e destabilização da membrana, aumentando a fluidez da membrana, o que por sua vez poderá aumentar a permeabilidade passiva. [Burt, 2004]. A medição da temperatura média da fase de transição dos lípidos bacterianos confirmou que as membranas instantaneamente se tornam mais fluidas na presença de carvacrol. A passagem de metabolitos celulares de *B. cereus* através da membrana celular durante a exposição ao carvacrol, também tem sido investigada. Medições de ATP intracelular e extracelular revelaram que o nível de ATP dentro das células diminui, ao passo que, fora da célula não há qualquer aumento proporcional. Presume-se então que a taxa de síntese de ATP diminuiu ou que a taxa de hidrólise de ATP aumentou. Medições do potencial de membrana de células em crescimento exponencial revelaram uma diminuição brusca quando adicionado carvacrol e indicaram um enfraquecimento da força

motriz dos protões. O gradiente de pH na membrana celular também foi enfraquecido pela presença de carvacrol e dissipou-se completamente na presença de 1 mM ou mais. Para além disso, os níveis intracelulares de iões Potássio caíram enquanto os níveis extracelulares aumentaram proporcionalmente, mantendo-se os níveis totais. Concluiu-se que o carvacrol forma canais através da membrana pelo afastamento das cadeias de ácidos gordos dos fosfolípidos, permitindo aos iões sair do citoplasma. O óleo essencial de orégão, contendo carvacrol como componente maioritário, causa a fuga de iões fosfato da *Staphilococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* [Burt, 2004].

Juven *et al.* (1994) examinou os efeitos do timol contra *Staphilococcus aureus* e criou a hipótese que o timol se liga às proteínas membranares hidrofobicamente e por ligações de hidrogénio, alterando deste modo a permeabilidade da membrana. O timol é mais inibidor a pH mais baixo, pois a molécula estará indissociável, logo mais hidrofóbica. Assim, pode-se ligar melhor às zonas hidrofóbicas das proteínas e dissolver-se melhor na fase lipídica [Burt, 2004].

1.6.2 Eugenol

O Eugenol é o componente maioritário (aproximadamente 85%) do óleo de cravo. Concentrações sub-letais do Eugenol podem inibir a produção de amilases e proteases pela *B.cereus*. A deterioração da parede celular e um elevado grau de lise celular também foram observados. Pensa-se que o grupo hidroxilo do Eugenol liga às proteínas, prevenindo a acção enzimática na *Enterobacter aerogenes* [Burt, 2004].

1.6.3 p-Cimeno

É o precursor biológico do carvacrol e é hidrofóbico, causando inchaço da membrana citoplasmática, em maior extensão que o carvacrol. Não é um antibacteriano eficaz quando usado sozinho, mas ao ser combinado com carvacrol pôde-se observar sinergismo contra *B.cereus in vitro*. A maior eficácia do p-Cimeno, ao incorporar-se na bicamada lipídica do *B. cereus*, facilita o transporte do carvacrol através da membrana citoplasmática [Burt, 2004].

1.6.4 Carvona

Quando testada num sistema modelo de lipossoma, em concentrações acima da MIC, a carvona (2-metil-5-(1-metiletenil)-2ciclo-hexen-1-ona) dissipa o gradiente de pH e o potencial membranar das células. As taxas de crescimento específicas da *Escherichia coli*, *Streptococcus termophilus* e *Lactococcus lactis* diminuíram com o aumento das concentrações de Carvona, sugerindo que esta actua pela perturbação no estado de energia metabólica das células. Em contraste, outro estudo demonstrou que a carvona não é eficaz na membrana exterior de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, e também não afecta a taxa de ATP intracelular [Burt, 2004].

1.6.5 Cinamaldeído

Apesar de o cinamaldeído (3-fenil-2-propenal) ser conhecido por inibir o crescimento da *Escherichia coli* O157:H7 e da *Salmonella typhimurium* em concentrações semelhantes às do carvacrol e timol, não desintegra a membrana externa ou esgota o ATP intracelular. Pensa-se que o grupo carbonilo se liga às proteínas, impedindo a acção das descarboxilases dos aminoácidos na *Enterobacter aerogenes* [S. Burt, 2004].

1.6.6 Terpineno

O γ -Terpineno não antagoniza o crescimento da *Salmonella typhimurium*, enquanto o α -terpineno inibe 11 das 25 espécies bacterianas estudadas [Burt, 2004].

1.7 Sinergismo e antagonismo entre os componentes dos óleos essenciais

Em relação às propriedades biológicas, tem que se ter em conta que os óleos essenciais são misturas complexas de numerosas moléculas, e pode-se questionar se os seus efeitos biológicos são resultado de sinergismo entre as moléculas ou se são apenas devido aos componentes principais presentes em elevadas concentrações, segundo a análise cromatográfica [Bakkali et al., 2008].

Normalmente, os componentes maioritários reflectem bastante bem as características biofísicas e biológicas dos óleos essenciais a partir dos quais foram isolados, a amplitude dos seus efeitos é dependente das suas concentrações quando testados isolados ou incorporados nos óleos essenciais [Bakkali et al., 2008].

Deste modo, as funções sinérgicas das várias moléculas contidas nos óleos essenciais, em comparação com a acção de um ou dois componentes principais do óleo, parecem questionáveis. No entanto, é possível que a actividade destes componentes principais seja modulada por outras moléculas minoritárias. Para além disso, é provável que vários componentes dos óleos essenciais desempenhem um papel na definição da fragrância, da densidade, da textura, da cor e, acima de tudo, a entrada nas células, atracção lipofílica ou hidrofílica, fixação nas paredes e membranas celulares e distribuição celular. Esta última característica é muito importante porque a distribuição do óleo na célula determina os diferentes tipos de reacções radicais produzidas, dependendo da sua compartimentação na célula. Nesse sentido, para fins biológicos, é mais importante estudar um óleo inteiro em vez de alguns dos seus componentes, porque o conceito de sinergismo parece ser mais significativo [Bakkali et al., 2008].

A actividade inerente a um óleo pode estar relacionada com a configuração química dos componentes, as proporções em que estão presentes e as interacções entre eles. Um efeito aditivo é observado quando o efeito combinado é igual à soma dos efeitos individuais. O antagonismo é observado quando o efeito de um ou ambos os componentes é menor quando

são aplicados em conjunto, do que aplicados individualmente. O sinergismo acontece quando o efeito da combinação dos componentes é maior do que a soma dos efeitos individuais. Alguns estudos concluíram que o óleo essencial inteiro tem uma maior actividade antibacteriana que os componentes maioritários misturados, o que sugere que os componentes minoritários são importantes para a actividade e podem ter um efeito sinérgico ou influência potenciadora [Burt, 2004].

1.8 Métodos para avaliação da actividade antibacteriana

Actualmente existem diversas técnicas de *screening* para definir se o extracto de uma determinada planta possui actividade antimicrobiana, desde as mais simples, que podem ser realizadas rotineiramente, até às mais sofisticadas, que muitas vezes se tornam indisponíveis em alguns laboratórios. Apesar disso, há poucos estudos que relatam qual o melhor método de *screening* a ser utilizado de acordo com o tipo de extracto a ser testado, mesmo no que se refere às técnicas mais simples [Alves et al., 2008].

Os métodos mais conhecidos incluem o método de difusão em agar e o método de diluição em caldo (macrodiluição e microdiluição) [Ostrosky et al., 2008].

A actividade antimicrobiana de extractos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo a ser testado; esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CMI). Um aspecto bastante relevante na determinação da CMI de extractos vegetais é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais relativos aos compostos naturais ou as suas combinações [Ostrosky et al., 2008].

Diversas modificações já foram realizadas nas metodologias de *screening* a fim de se obter resultados mais confiáveis, uma vez que alguns factores, tais como composição do meio de cultura, microrganismos testados, método de extracção, pH e solubilidade das amostras no meio de cultura, podem alterar os resultados, sendo difícil, portanto, padronizar um procedimento [Alves et al., 2008].

1.8.1 Métodos de difusão em agar

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

Quando se utiliza o método de difusão vários factores podem tornar-se fontes de erros, tais como: composição e espessura do meio de cultura, preparação incorrecta do meio de cultura, densidade incorrecta do inóculo, uso de *swab* com excesso de caldo para inoculação das placas, temperatura e tempo de incubação inadequados, interacções entre o antimicrobiano e o meio de cultura, leitura prematura, erro na medida das zonas de inibição ou uso de culturas mistas ou contaminadas [Alves et al., 2008].

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

- ✓ Sensíveis, quando o diâmetro do halo de inibição é maior ou igual que o halo do controlo positivo;
- ✓ Moderadamente sensíveis, o halo de inibição é maior que 2 mm, mas menor em \pm 3 mm, em relação ao controlo positivo;
- ✓ Resistentes, o diâmetro do halo de inibição é igual ou menor que 2 mm [Ostrosky et al., 2008].

Como controlo positivo, aplica-se um quimioterapêutico padrão, e como controlo negativo a solução utilizada para a dissolução dos extractos [Ostrosky et al., 2008].

As condições de incubação recomendadas são temperatura de 35-37 °C, durante 24 a 48 horas para bactérias, e de 25 a 27 °C durante 48 a 72 horas para fungos. As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em agar [Ostrosky et al., 2008].

1.8.1.1 Teste de difusão em disco

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

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

1.8.1.2 Cilindros de aço inoxidável

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

1.8.1.3 Perfuração em agar

Na técnica de perfuração em agar, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas [Ostrosky et al., 2008].

1.8.2 Método de diluição em caldo

Actualmente, o método de diluição é usado para determinar a concentração mínima de um agente necessária para inibir ou matar um microrganismo (CMI). Os procedimentos para determinar a actividade inibitória podem ser realizados tanto pelas técnicas de diluição em caldo como em agar [Alves et al., 2008].

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

Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Mínima Inibitória (CMI). As CMI's são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos [Alves et al., 2008].

Não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições superiores [Duarte et al., 2006].

Assim, propôs-se uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como:

- ✓ forte inibição - MIC até 500 µg/mL;
- ✓ inibição moderada - MIC entre 600 e 1500 µg/mL;
- ✓ fraca inibição - MIC acima de 1600 µg/mL [Duarte et al., 2006].

A actividade bactericida também pode ser determinada pelos métodos das diluições em caldo. A Concentração Mínima Bactericida (CMB). A concentração mínima bactericida (CMB) é a menor concentração necessária de antibiótico/fármaco que mata a maioria (99,9%) dos microrganismos do inoculo original num determinado tempo (após incubação durante 18-24h) [Barry et al., 1999].

O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. A sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos e quando os agentes antimicrobianos a serem testados são pouco solúveis em solução aquosa (no caso da maioria dos óleos essenciais). Como controlo positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterapêutico padrão com a suspensão padronizada de microrganismo em teste, e como controlo negativo utiliza-se o meio de cultura com o solvente usado na dissolução da amostra e a suspensão microbiana.

Duas metodologias podem ser aplicadas: macrodiluição e microdiluição [Ostrosky et al., 2008].

Os factores primários que influenciam nos valores de CIM no método de diluição em caldo são os mesmos tanto para a técnica de macrodiluição como para a de microdiluição, ou seja, a sensibilidade do organismo, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento bacteriano [Alves et al., 2008].

1.8.2.1 Macrodiluição

A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando entre 1 e 10 mL. Por ser trabalhoso, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gerar grande quantidade de resíduos é usado um pequeno número de réplicas [Ostrosky et al., 2008].

A metodologia é realizada em tubos de ensaio com tampas de rosca ligeiramente soltas, tampas de metal, de plástico ou tampões de algodão. Preparam-se volumetricamente as diluições finais 1:2 (v/v) do agente antimicrobiano a testar em caldo. O volume mínimo final necessário para cada solução é de 1 ml. Visto que haverá uma diluição de 1:2 dos agentes quando for acrescentado um volume equivalente de inoculo, as diluições de antimicrobiano são preparadas, com frequência, no dobro da concentração final desejada. Ou seja, isto vai resultar numa diluição de 1:2 de cada concentração de antimicrobiano e uma diluição de 1:2 do inoculo [Ferraro et al., 2003].

O tempo e as temperaturas de incubação variam de acordo com o tipo de microrganismo a ser testado. Normalmente, usa-se uma temperatura de $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, durante 18-24 h para os microrganismos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp* [Alves et al., 2008].

Após incubação examinam-se os tubos de ensaio e determinam-se a CMI e a CMB. A CMI e a CMB podem ser detectadas a “olho nu” ou através de aparelhos baseados em leitura óptica [Alves et al., 2008]. A quantidade de crescimento nos tubos contendo o antibiótico deve ser comparada com a quantidade de crescimento nos tubos de controlo de crescimento (sem antibiótico), usada em cada conjunto de testes. Para que o teste seja considerado válido, é necessário que haja crescimento ($\geq 2\text{mm}$ turbidez definitiva) no poço de controlo positivo [Ferraro et al., 2003].

1.8.2.2 Microdiluição

A técnica de microdiluição em caldo é uma adaptação da macrodiluição em caldo. É denominada assim, porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo (entre 0,1 e 0,2 mL) colocados em placas de plástico estéreis de 80, 96 ou mais poços de fundo redondo ou cónico, próprias para microdiluição. As placas de microdiluição inoculadas devem ser incubadas a 35 °C por 16-24 h, com no máximo quatro placas em cada pilha, a fim de manter a mesma temperatura de incubação para todas as culturas [Alves et al., 2008].

Utilizou-se a técnica de diluição em microplacas para verificar a actividade antimicrobiana em extractos vegetais e observou-se inconvenientes na técnica, tais como células de alguns

microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão. Contudo, concluiu-se que o método de microplacas é barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requer pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registo permanente [Ostrosky et al., 2008].

1.8.3 Método de efeito do vapor do óleo essencial

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

1.8.4 Teste da Resazurina

O teste da Resazurina tem sido utilizado desde a década de 50 para avaliar contaminação por bactérias ou fungos em fluidos biológicos e leite. Resazurina é o nome original para Alamar Blue, antes de ter sido utilizada para proliferação celular *in vitro* em mamíferos. Há uma correlação directa entre a redução da Resazurina no meio de crescimento e a quantidade/proliferação de células viáveis, variando de bactérias a células de mamíferos. Neste teste dá-se a redução da resazurina (azul) a resorufina (rosa) e depois a dehidro-resorufina (incolor) [O'Brien et al., 2000].

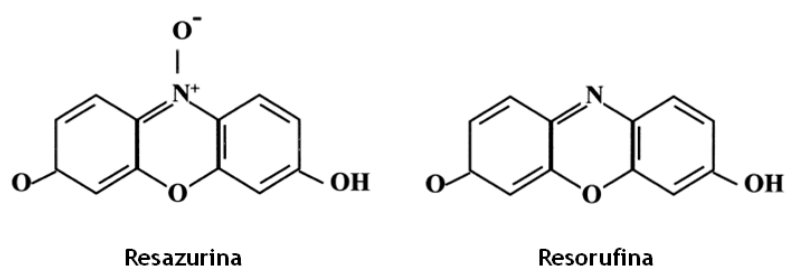


Figura 1.8 - Estruturas da Resazurina (forma oxidada) e Resorufina (forma reduzida) [Adaptada de: O'Brien et al., 2000].

É preparada em NaCl e esterilizada (filtrada); pode ser guardada a 4°C durante 1 semana [Palomino et al., 2002].

Uma mudança de cor azul (estado oxidado) para rosa (estado reduzido) indica crescimento bacteriano e a concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a concentração mais baixa de antibacteriano que impede esta mudança de cor [Montoro et al., 2005].

1.9 Factores que interferem nos métodos

Têm-se desenvolvido métodos de investigação *in vitro* que produzam resultados confiáveis e possam ser reproduzidos e validados. Contudo, essa tarefa tem sido dificultada pelas peculiaridades que os óleos apresentam, características que interferem significativamente nos resultados. Por isso, em testes de susceptibilidade microbiana, deve-se levar em consideração a técnica usada, o meio de cultura, o(s) microrganismo(s) e o óleo essencial testados [Nascimento et al., 2007].

As substâncias normalmente testadas pelos métodos propostos pelo NCCLS (actualmente designado por Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) têm natureza hidrofílica e os testes são padronizados para esta condição. Nos ensaios com óleos essenciais, deve-se considerar que os óleos são voláteis, insolúveis em água, viscosos e complexos. Além disso, podem formar uma suspensão turva que impede a determinação visual da eficácia antimicrobiana do óleo, devido à interferência da dissolução insuficiente dos componentes testados, sendo assim, a falta de padronização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana tem sido um dos empecilhos encontrados para a realização desse tipo de estudo [Nascimento et al., 2007].

Tais dificuldades tornam os resultados disponíveis na literatura difíceis de comparar. Por outro lado, os métodos usados diferem largamente e factores importantes que influenciam os resultados são frequentemente negligenciados [Nascimento et al., 2007].

Assim, diversos são os factores que afectam a susceptibilidade do método de difusão e de diluição, há assim, a necessidade do conhecimento das condições experimentais e padronização rigorosa na execução do teste. Os aspectos importantes a serem considerados são [Ostrosky et al., 2008]:

1.9.1 Meios de cultura

Os meios de cultura devem proporcionar um crescimento adequado dos organismos a serem estudados e não conter substâncias antagónicas à actividade antimicrobiana em estudo. No método de difusão a concentração do agar e a sua origem podem influenciar os resultados dos ensaios. Entre os meios de cultura utilizados para teste de susceptibilidade de bactérias, o Müller-Hinton é o mais citado, contudo há outros meios bastante utilizados como o de caseína soja (TSA e TSB) e o meio líquido Luria-Bertani [Ostrosky et al., 2008].

Recomenda-se o caldo de Müller-Hinton como meio de primeira escolha para testes de sensibilidade de organismos facultativos ou organismos aeróbios de crescimento rápido. O caldo Mueller-Hinton apresenta uma boa reprodutibilidade nos testes de sensibilidade; possui baixos teores de inibidores de sulfonamida, trimetoprim e tetraciclina; e produz crescimento satisfatório da maioria dos patógenos. Além disso, há uma grande recolha de dados e experiências sobre testes realizados com este meio. Além disso, o caldo de Mueller-Hinton pode ser suplementado para suportar o crescimento de bactérias fastidiosas [Ferraro et al., 2003].

Há substâncias no meio de cultura que influenciam a susceptibilidade do teste, como a timidina que antagoniza a actividade de sulfonamidas e trimetroprinas, conduzindo a um resultado falso de resistência a tais agentes. Se o meio contiver altas concentrações de timidina, pode-se adicionar sangue lisado de cavalo ou timidina fosforilada para remover a timidina livre. O catião monovalente Na^+ aumenta a actividade de bacitracina, ácido fusídico e novobiocina contra *Staphylococcus* spp e da penicilina contra *Proteus* spp. Cátions bivalentes tais como Mg^{2+} e Ca^{2+} reduzem a actividade de aminoglicosídeos e polimixinas contra *Pseudomonas* spp e da tetraciclina contra uma série de organismos [Ostrosky et al., 2008].

1.9.2 pH

O pH do sistema deve ser compatível com o crescimento microbiano, com a actividade e a estabilidade das substâncias testadas. O aumento da acidez do meio diminui a actividade antibacteriana de substâncias básicas como a estreptomicina, e por outro lado, provoca o aumento da actividade de substâncias ácidas como a penicilina. A atmosfera com concentração de CO_2 elevada deve ser evitada, já que altera o pH da superfície, sendo então capaz de afectar a actividade antimicrobiana de alguns agentes [Ostrosky et al., 2008].

1.9.3 Disponibilidade de oxigénio

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

1.9.4 Inoculo

A susceptibilidade dos agentes antimicrobianos é dependente da quantidade do inoculo. A padronização deste é então necessária e a quantidade inoculada deverá ser estabelecida para cada método desenvolvido. No teste de susceptibilidade de metilina contra *Staphylococcus*, este padrão deve ser de 10^6 UFC/mL. Para os testes de diluição em caldo, o padrão é de 10^5 UFC/mL no início do período de incubação [Ostrosky et al., 2008].

A preparação do inoculo os métodos de diluição e difusão deve ser feita a partir de 4 ou 5 colónias da cultura pura do microrganismo a ser estudado. O padrão de leitura 0,5 na escala McFarland fornece densidade de aproximadamente 10^8 UFC/mL. Alternativamente, o inoculo pode ser ajustado fotometricamente ou por diluição padronizada do caldo nutriente, se a densidade de tais culturas for razoavelmente constante. As placas devem ser inoculadas num período máximo de 15 minutos após a padronização do inoculo, para que a densidade celular não se altere (o ideal será que cada tubo de ensaio ou placa de Petri contenha 5×10^5 UFC/mL) [Ostrosky et al., 2008].

Os estudos da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais, muitas vezes não fornecem detalhes sobre a quantidade, o tipo de microrganismo utilizado e o espectro desta actividade, dificultando a sua reprodutibilidade e a comparação de dados. Além disso, a escolha dos microrganismos testados apresenta uma tendência para se utilizarem linhagens de diferentes géneros, o que resulta numa variação significativa entre o diâmetro dos halos de inibição, tornando difícil a comparação. Por isso, é sugerido que o teste da acção antimicrobiana dos óleos essenciais seja realizado com isolados múltiplos para cada espécie testada [Nascimento et al., 2007].

1.9.5 Condições de incubação

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

No caso do método de microdiluição, para manter a temperatura de incubação constante para todas as culturas, só deverá haver quatro placas de microdiluição em cada pilha [Ferraro et al., 2003].

1.9.6 Óleo essencial e emulsionante utilizado

Em relação às particularidades do óleo, algumas pesquisas a respeito de sua composição mostram que mesmo variações genéticas intraespecíficas da espécie vegetal podem alterar o teor do princípio activo presente no óleo. Ademais, outros factores, como clima, solo, época e forma de plantação, adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, tempo e condições ambientais, proveniência do material da planta (fresco ou seco), técnica de extracção, fonte botânica, colheita e padrões de variação geográfica (latitudes e longitudes) afectam a composição química dos óleos, podendo provocar alterações na actividade antimicrobiana [Nascimento et al., 2007].

Vários estudos têm confirmado a influência dos factores acima citados como determinantes na acção antimicrobiana dos óleos essenciais. A actividade antimicrobiana de um mesmo óleo pode ser, às vezes, bem diferente. O volume e a concentração dos óleos são parâmetros que também devem ser observados na avaliação do efeito antimicrobiano, pois podem afectar os resultados do teste. Por isso, nos estudos em que se utilizam poços no meio de cultura, é necessário que estes contenham um volume mínimo de óleo que possibilite a visualização da inibição. Entretanto, a significância dos volumes na descrição da actividade antimicrobiana de um óleo essencial não é conhecida. Quando são usados cilindros e discos de diâmetros similares para o mesmo óleo, são encontrados diâmetros de inibição iguais. Isto é relevante porque a aplicação de volumes difere largamente [Nascimento et al., 2007].

Na técnica de difusão em disco e em agar, a natureza hidrófoba da maioria dos óleos essenciais de plantas impede a difusão uniforme destas substâncias através do meio contendo agar. Outro problema observado é quando se utiliza a técnica de difusão em agar, pois a difusão irregular dos componentes lipofílicos dos óleos resulta em concentrações desiguais do óleo no agar causando a formação de regiões com actividade antimicrobiana variável [Nascimento et al., 2007].

Desta forma, acredita-se que os métodos disponíveis não favorecem a padronização e a consequente reprodução de resultados que efectivamente expressem a realidade, sendo, por isso, incapazes de comparar directamente a verdadeira actividade dos óleos. Visando melhorar a qualidade dos procedimentos com óleos essenciais, tornou-se comum a utilização de solventes, detergentes, ou agentes emulsionantes, por exemplo, Tween 20, Tween 80, DMSO (dimetilsulfóxido) e etanol, para facilitar a dispersão dos mesmos através do meio de cultura. As propriedades físicas e químicas desses agentes são importantes para auxiliar na visualização da actividade antimicrobiana dos óleos, no entanto, deve-se levar em consideração que ao se introduzir um agente emulsionante, este está sujeito a possíveis interacções com a substância em teste, bem como, possuir actividade antimicrobiana. Esses efeitos podem ser acentuados [Nascimento et al., 2007].

A interferência do agente emulsionante na susceptibilidade da bactéria ao óleo essencial pode ser explicada pela possível influência que este exerce sobre o crescimento bacteriano e/ou sobre a permeabilidade da membrana celular. Os emulsionantes podem agir antagónica ou sinergicamente aos componentes activos do óleo. Altas concentrações de Tween, por exemplo, podem aumentar a actividade antibacteriana produzindo resultados falso-positivos ou reduzir a bioactividade do óleo, este último é, possivelmente, causado pela formação de micelas que dificultariam o contacto directo do óleo com os microrganismos. Para minimizar esses efeitos, alguns autores propuseram que os emulsionantes Tween 20, Tween 80 e outros, sejam utilizados em concentrações que variem entre 0.5 a 20% em solução com óleo. Especificamente para o Tween 80, recomenda-se a concentração de 0,02% com o objectivo de padronizar o método de diluição em caldo para a determinação da concentração mínima inibitória - CMI, estando os valores desta relacionados ao agente emulsionante usado [Nascimento et al., 2007].

Na técnica de difusão em disco e em agar a vantagem é limitada à geração de dados preliminares fornecendo, somente, dados qualitativos, devido à natureza hidrófoba da maioria dos óleos essenciais de plantas, uma vez que essa característica impede a difusão uniforme destas substâncias através do meio contendo agar [Nascimento et al., 2007].

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

Contudo, acredita-se que os métodos disponíveis não favorecem a padronização e a consequente reprodução de resultados que efectivamente expressem a realidade, sendo, por

isso, incapazes de comparar directamente a verdadeira actividade dos óleos [Nascimento et al., 2007].

1.10 Recursos utilizados para melhoria da leitura do diâmetro do halo de inibição no método de difusão em agar

A espessura e a uniformidade do agar são essenciais para a boa resolução dos resultados. Deve-se controlar rigorosamente o volume de agar transferido para a placa de Petri, e o meio de cultura deve ser distribuído de modo a evitar formação de estrias superficiais e bolhas. Quando ocorrem halos de pequenas dimensões, o recurso utilizado é a diminuição do volume do meio, o que leva a diminuição a espessura do meio na placa. A pré-incubação é utilizada quando se visa diminuir a dimensão do halo e a pré-difusão para aumentar a zona de inibição [Ostrosky et al., 2008].

1.11 Microrganismos

Quando a vida surgiu na Terra há cerca de 4 biliões de anos atrás, os primeiros tipos de células a desenvolverem-se foram células procarióticas. Durante aproximadamente 2 biliões de anos este tipo de células foi a única forma de vida na Terra [Todar, 2011].

As bactérias são organismos unicelulares que não se desenvolvem ou diferenciam em formas multicelulares. Muitas bactérias crescem em filamentos ou massas celulares, mas cada célula na colónia é idêntica às outras e capaz de existir independentemente. Pertencem ao Domínio Bactéria, Reino Monera, apresentando células procariotas e devido ao facto de conseguirem suportar elevadas pressões osmóticas, elevadas temperaturas e pH elevado, podem ser encontradas em todos os meios, ou seja, no ar, na água, no solo ou até mesmo no interior de organismos [Todar, 2011].

As bactérias fazem parte de um grupo de microrganismos unicelulares com configuração celular procariótica. O material genético (DNA) das células procarióticas está em contacto com o citoplasma das células. Não há membrana nuclear, sendo esta a principal característica das células eucarióticas. Até há pouco tempo, as bactérias eram o único tipo de células procarióticas. Na década de 1980, com o desenvolvimento de técnicas moleculares aplicadas à filogenia da vida, outro grupo foi definido e informalmente chamado “archaebacteria”. Este grupo foi depois redefinido como *Archaea* e colocado ao mesmo nível que os domínios *Bacteria* e *Eucarya* [Todar, 2011].

Do ponto de vista metabólico, os procariotas são extraordinariamente diversos, e exibem vários tipos de metabolismo como fixação de azoto, metanogénese, produção de energia e até fotossíntese [Todar, 2011].

A vida das plantas e dos animais está dependente da actividade de células bacterianas. Estas entram em várias relações de simbiose que normalmente beneficiam os dois organismos, no entanto, algumas bactérias são agentes que provocam doenças [Todar, 2011].

As actividades metabólicas dos procaríotas têm um enorme impacto na fertilidade dos solos, o que pode afectar a agricultura e as colheitas. No ambiente global, são essenciais para conduzir os ciclos dos elementos que compõem os sistemas de vida, como o carbono, oxigénio, azoto. As bactérias podem ser usadas para criar resistência às doenças nas plantas, assim como os produtos bacterianos podem ser utilizados para combater doenças infecciosas ou constituir componentes de vacinas para prevenção. Assim, apesar de muitas das espécies de bactérias serem patogénicas, muitas delas são imprescindíveis [Todar, 2011].

→ Diferença entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Nas bactérias Gram-positivas (aquelas que retêm o corante violeta de cristal, quando sujeitas à coloração de Gram), a parede celular é espessa (15 a 80 nm) e consiste em várias camadas de peptidoglicanos. Na perpendicular aos peptidoglicanos encontra-se um grupo de moléculas chamadas ácidos teicóicos que são as únicas na parede celular das bactérias Gram-positivas (Figura 1.9) [Todar, 2011].

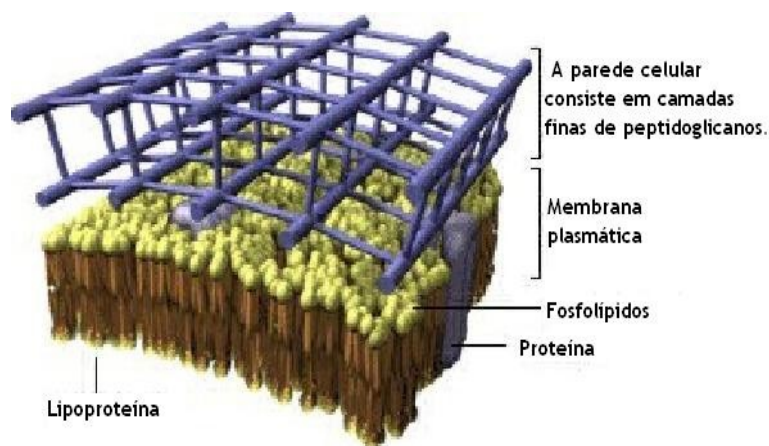


Figura 1.9 - Esquematização da parede celular de uma Bactéria Gram-positiva. (consultada em <http://pt.scribd.com/doc/2182053/Bacterias> a 29 de Maio de 2010).

Nas bactérias Gram-negativas (que não retêm o corante violeta de cristal), a parede celular é relativamente fina (10 nm), composta por uma única camada de peptidoglicanos rodeados por uma estrutura membranosa chamada membrana externa. Esta contém um único componente, lipopolissacárido (LPS) que é tóxico para os animais. A membrana externa é normalmente considerada como parte da parede celular (Figura 1.10) [Todar, 2011].

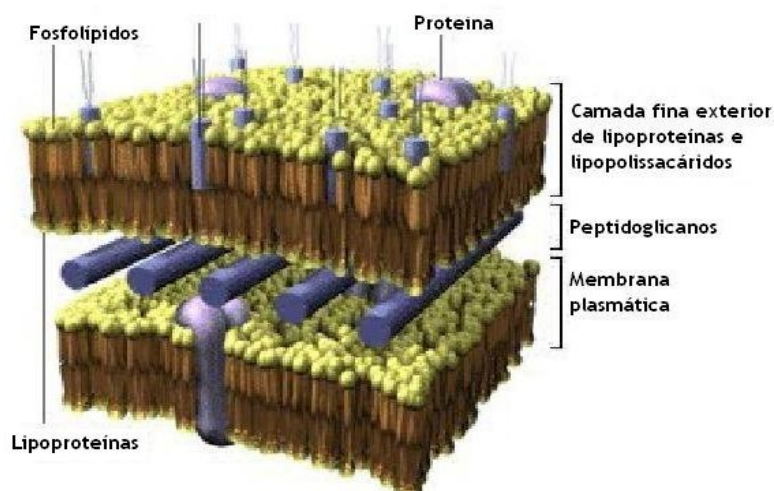


Figura 1.10 - Esquemática da parede celular de uma bactéria Gram-negativa (Consultada em <http://pt.scribd.com/doc/2182053/Bacterias> a 29 de Maio de 2010).

1.11.1 *Staphylococcus aureus*



Figura 1.11 - *Staphylococcus aureus* (em “Online textbook of Bacteriology”, Kenneth Todar, 2011).

Staphylococci são bactérias perfeitamente esféricas com cerca de 1 micrómetro de diâmetro e Gram-positivas, que aparecem em cachos semelhantes aos de uvas. Em 1884, Rosenbach descreveu os dois tipos de colônias pigmentadas e propôs a nomenclatura apropriada: *Staphylococcus aureus* (amarela) e *Staphylococcus albus* (branca). Mais de 20 espécies de *Staphylococcus* estão descritas no Manual

de Bergey (2001), mas apenas a *Staphylococcus aureus* e a *Staphylococcus epidermidis* são significantes pelas suas interações com os humanos [Todar, 2011].

A *Staphylococcus aureus* coloniza principalmente as vias nasais, mas pode ser encontrada regularmente noutros locais como a pele, cavidade oral e tracto gastrointestinal [Todar, 2011].

A *S. aureus* forma grandes colônias amarelas em meio de cultura rico, é sempre hemolítica em agar-sangue. É uma bactéria anaeróbia facultativa que cresce por respiração aeróbia ou fermentação que produz principalmente ácido láctico. A bactéria é catalase-positiva, oxidase-negativa e quase todas as suas cadeias produzem a enzima coagulase. Pode crescer a temperaturas entre os 15 e 45 graus e em concentrações de NaCl tão altas quanto 15% e deve ser sempre considerada como potencial patógeno [Todar, 2011].

A forma e configuração destas bactérias Gram-positivas permitem distingui-las de outras pois apresentam-se como células ligeiramente oblongas, organizadas em cadeias que podem ser consideradas semelhantes a bacilos [Todar, 2011].

A *Staphylococcus aureus* causa uma variedade de infecções e intoxicações em humanos: lesões superficiais na pele como bolhas e furúnculos; infecções mais graves como pneumonia, mastite, plebite, meningite e infecções no tracto urinário; e infecções profundas como osteomielite e endocardite. Esta bactéria é a maior causa de infecções nosocomiais (adquiridas em hospitais) e infecções associadas com materiais médicos invasivos. Também pode causar intoxicações alimentares pela libertação de enterotoxinas na comida, e ainda síndrome de choque tóxico através da libertação de superantigénios para a corrente sanguínea [Todar, 2011].

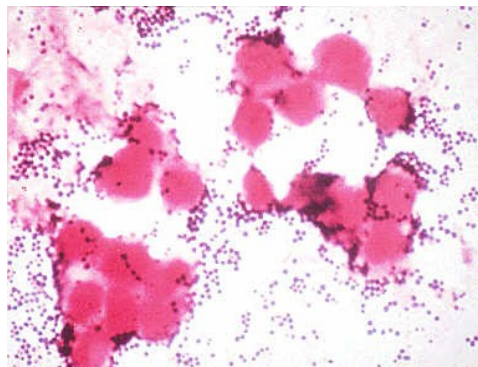


Figura 1.12 - *Staphylococcus aureus* com coloração de Gram (em “Online textbook of Bacteriology”, Kenneth Todar, 2011).

As cadeias de *S.aureus* existentes em hospitais são normalmente resistentes a uma variedade de antibióticos. A bactéria desenvolve esta resistência através de mutações nos genes cromossomais seguidas de selecção de cadeias resistentes, e obtenção de genes de resistência [Todar, 2011].

1.11.2 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é um membro da classe *Gamma Proteobacteria* do Domínio *Bacteria*. São bacilos (com cerca de 0.5 to 0.8 μm por 1.5 to 3.0 μm) Gram-negativos, aeróbios pertencentes à família *Pseudomonadaceae*. Quase todas as cepas são móveis por meio de um único flagelo polar. A *Pseudomonas aeruginosa* é a espécie-tipo do seu grupo, que contém outros 12 membros [Todar, 2011].



Figura 1.13 - Bacilos de *Pseudomonas aeruginosa* (em “Online textbook of Bacteriology”, Kenneth Todar, 2011).

É uma bactéria independente, normalmente encontrada na água e no solo. No entanto, aparece regularmente nas superfícies de plantas e ocasionalmente em superfícies de animais. Membros deste género são bem conhecidos em estudos de microbiologia, pois

este é um dos poucos grupos de bactérias que são patogénicos para as plantas. Também tem

vindo a ser cada vez mais reconhecido como um patógeno de relevância clínica, causador de infecções nosocomiais, o que indica um aumento da resistência da bactéria a antibióticos [Todar, 2011].

A bactéria tem um metabolismo que é respiratório e nunca fermentativo, mas cresce na ausência de O_2 , se houver NO_2 disponível como receptor de electrões respiratórios. É também uma das bactérias mais fortes e que mais rapidamente se desloca, exigindo uma nutrição muito 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 graus, mas tem a capacidade de crescer a temperaturas tão altas como 42 graus. É resistente a altas concentrações de sal e corante, anti-sépticos fracos e muitos antibióticos frequentemente utilizados [Todar, 2011].

Os isolados de *P. aeruginosa* podem produzir 3 tipos de colónias: isolados naturais de água ou solo produzem colónias pequenas e irregulares; amostras clínicas, geralmente produzem dois tipos de colónias mais regulares. Um tipo apresenta colónias com aparência regular, grande e um ligeiro relevo; o outro apresenta colónias com aparência mucóide, atribuída à produção de alginato (obtido de secreções do tracto urinário e respiratório). Presume-se que as colónias regulares e mucóides desempenham um papel na colonização e virulência [Todar, 2011].

A *Pseudomonas aeruginosa* produz dois tipos de pigmentos solúveis, o pigmento fluorescente pioverdina e o pigmento azul piocianina. O último é característico em infecções supurativas causadas por esta bactéria [Todar, 2011].

A *Pseudomonas aeruginosa* é notória pela sua resistência a antibióticos e é, por isso, um patógeno particularmente perigoso. A bactéria é naturalmente resistente a muitos antibióticos devido à barreira de permeabilidade que a sua membrana externa de gram-negativa oferece. Apenas alguns antibióticos são eficazes contra esta bactéria (ex: gentamicina), mas não contra todas as cepas [Todar, 2011].

A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista, ou seja, tira partido de alguma falha nas defesas do hospedeiro para iniciar uma infecção. Quase nunca infecta tecidos com a defesa intacta, no entanto não há nenhum tecido com a defesa comprometida que não infecte de alguma maneira. Causa 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 pela *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% [Todar, 2011].



Figura 1.14 - Colónias de *Pseudomonas aeruginosa* em agar (em “*Online textbook of Bacteriology*”, Kenneth Todar, 2011).

1.11.3 *Escherichia coli*

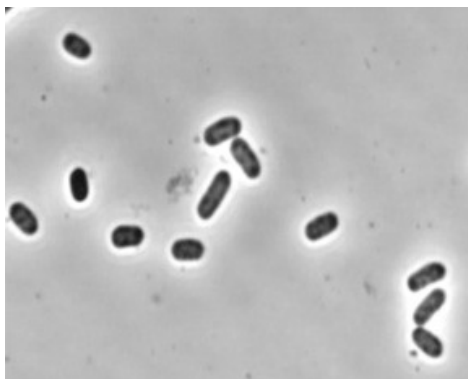


Figura 1.15 - Bactéria *E. coli* O157:H7 imobilizada em agar (em “*Online textbook of Bacteriology*”, Kenneth Todar, 2011).

indivíduos que lidam com a criança. Pode persistir durante meses ou anos, depois de se ter estabelecido na mucosa do intestino grosso [Todar, 2011].

A *E. coli* é a mais importante na família *Enterobacteriaceae*, bactérias entéricas, que são anaeróbias facultativas, Gram-negativas e vivem no tracto intestinal dos animais saudáveis ou mesmo doentes [Todar, 2011].

Fisiologicamente, a *E. coli* é versátil e bem adaptada ao seu habitat característico. Pode crescer em meios com glucose, como único constituinte orgânico. O tipo selvagem desta bactéria, metabolicamente pode transformar glucose em todos os componentes macromoleculares que constituem a célula. A bactéria pode crescer na presença ou ausência de O_2 , sendo que em condições anaeróbias cresce por meio de fermentação produzindo uma mistura de ácidos e gás como produtos finais. No entanto, também pode crescer por meio de respiração anaeróbia, desde que possa utilizar NO_3 , NO_2 ou fumarato como aceitador de electrões para os processos respiratórios de transporte de electrões. Desta maneira, a *E. coli* adapta-se ao seu meio anaeróbio no intestino e também a habitats exteriores [Todar, 2011].

A *E. coli* pode responder a sinais ambientais como químicos, pH, temperatura, osmolaridade de várias maneiras, considerando que é um organismo unicelular. Com os seus mecanismos complexos para regulação do metabolismo, a bactéria pode procurar os componentes químicos no seu ambiente em vez de sintetizar as enzimas que os metabolizam [Todar, 2011]

Esta bactéria existe no tracto intestinal humano 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, 2011].

A *E.coli* é responsável por três tipos de infecções nos humanos: Infecção no tracto urinário, meningite neonatal e doenças intestinais (gastroenterites). As doenças vão depender

da distribuição e expressão de determinantes de virulência como adesinas, invasinas, toxinas e capacidade para resistir às defesas do hospedeiro [Todar, 2011].

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

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

Das bactérias Gram-negativas, o género *Pseudomonas*, em particular a *Pseudomonas aeruginosa*, parece ser a menos sensível à acção dos óleos essenciais [Burt, 2004].

1.13 Óleo essencial - *Schinus molle*

A família *Anacardiaceae* é de ocorrência pantropical, incluindo alguns representantes em regiões temperadas. Compreende aproximadamente 70 géneros e 600 espécies, muitas das quais de importância alimentar, como manga (*Mangifera indica* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.), seriguela (*Spondias mombin* L.) e pistáchio (*Pistacia vera* L.). Sob o ponto de vista médico, muitas espécies revelam-se de interesse ao causarem dermatites em indivíduos susceptíveis, devido a catecóis presentes na resina secretada. Outras são empregadas tradicionalmente como cicatrizante, estomáquico e antidiarréico, pela presença de taninos e óleo-resinas, a exemplo de caju-do-cerrado (*Anacardium humile* A. St.-Hil.), arendiúva (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) e pimenteiro (*Schinus molle* L.) [Duarte et al., 2007].



Figura 1.16 - Árvore *Schinus molle* [Adaptado de: http://www.mikecruise.ch/Cote_azur/Menton/pages/Schinus%20molle.html (consultado em 5 de Junho de 2011)].

Schinus molle (aroeira-falsa), da família *Anacardiaceae*, é também conhecida como pimenta Californiana ou pimenta rosa, nativa da América do Sul, mas foi introduzida para a maioria das áreas tropicais e subtropicais do mundo assim como no Mediterrâneo (Rhouma et al., 2009).

É uma árvore persistente com folhagem caída, 3 a 15 m de altura; com tronco curto; copa igualmente distribuída; madeira castanha escura, com fissuras e descamada; forma-se uma resina pegajosa se o tronco está danificado [Orwa et al., 2009].

Amplamente distribuída no Rio Grande do Sul, *Schinus molle* L. (*Anacardiaceae*) também conhecida como anacuita ou aroeira-mansa é uma espécie heliófita e com características xerofíticas, usualmente empregada em paisagismo ou arborização das ruas. É originária do Peru e encontra-se como nativa no Brasil, Uruguai, Argentina e outros países da região Andina [Atti dos Santos et al., 2007].

Na Argentina aparece naturalmente desde o limite setentrional até ao Rio Negro. É uma espécie rústica resistente a climas frios e secos. Era a árvore de azevinho da civilização Inca e originalmente era chamada por eles de “mulli”. A denominação foi depois hispanizada para *molle*. O seu fruto (baga), conhecido como pimenta rosa, é semelhante ao da pimenta branca e tem um aroma e um sabor suave, ligeiramente picante (Padín et al., 2007).

As folhas (Figura 1.17) são do tipo pinulada-ímpar, com 20 a 40 folíolos, lanceolada, margens inteiras ou denteadas. As flores podem crescer até 30 cm de comprimento, têm pétalas de cerca de 2 mm de comprimento; têm uma cor amarela e desenvolvem-se para formar cachos com bagas cor-de-rosa. Estes frutos são pequenos arredondados e desenvolvem-se de verde para rosa e depois para preto [Orwa et al., 2009]. A *Schinus molle* é uma árvore muitas vezes utilizada em climas subtropicais para paisagismo e utilizada pelos indígenas nos trópicos [Deveci et al., 2010]. Floresce nos meses de Agosto a Novembro e a maturação dos frutos inicia-se no final do mês de Dezembro até Janeiro [Silva et al., 2005].



Figura 1.17 - Folha da *Schinus molle* [Adaptado de: http://ag.arizona.edu/pima/gardening/aridplants/Schinus_molle.html (consultado em 5 de Junho de 2011)].

As suas folhas e frutos contêm óleos essenciais picantes que são bastante utilizados na medicina popular, sendo conhecida na Costa Rica como “chile” ou “pimenta da Califórnia” [Atti dos Santos et al., 2007].

Este óleo apresenta propriedades antimicrobianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antiespasmódicas, antipiréticas e cicatrizantes. A composição química do óleo essencial consiste principalmente de hidrocarbonetos monoterpênicos, alguns sesquiterpenos e fenóis. No entanto, a composição química de plantas de mesma espécie irá depender de diversos factores, tais como estado fenológico da planta, factores geográficos (localização), ecológicos (habitat), variabilidade genética (expressa através dos quimiotipos), processo de extracção empregado, entre outros [Atti dos Santos et al., 2007].



Figura 1.18 - Tronco da *Schinus molle* [Adaptado de: http://ag.arizona.edu/pima/gardening/aridplants/Schinus_molle.html (consultado em 5 de Junho de 2011)].

As frutas, folhas e a seiva do tronco (Figura 1.18) têm sido utilizadas pelas suas propriedades anti-hipertensivas e diuréticas. Estudos anteriores demonstraram que as actividades de diferentes extractos destas espécies incluem a de agente hipotensivo, analgésico e depressor do sistema nervoso e antiespástico (Marzouk et al., 2006). Outros estudos farmacológicos realizados com extractos de *Schinus molle* mostraram que esta planta tem propriedades antitumorais, antifúngicas, antibacterianas, anti-inflamatórias, analgésicas, antidepressivas, mas não há nenhuma evidência de qualquer efeito contra fitopatógenos (Rhouma et al., 2009).

A pequena semente do fruto (Figura 1.19) é utilizada como especiaria, por entre as muitas existentes, essencialmente, para acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária universal. É também usada como depurativo e para infecções uterinas. A pimenta rosa é activadora da produção de sangue na medula óssea, portanto é anti-raquítica, actua também na depuração e purificação do organismo, é anti-vermífuga e anti-inflamatória. Acredita-se que o uso sob a forma de chá entre 600 a 1000 mL por dia pode atenuar a debilidade orgânica, trazer activação glandular e muita vitalidade [Silva et al., 2005].

Os principais componentes que foram isolados da *S. molle* são cetoácidos triterpenóides. Um número de mono-, sesqui- e triterpenos, flavonóides, taninas e ácidos gordos têm sido identificados na *S. molle*. Um estudo mais recente levou ao isolamento de três agentes anti-inflamatórios, dois são ácidos triterpenóides e outro uma biflavanona (Marzouk et al., 2006).



Figura 1.19 - Fruto da árvore *Schinus molle* [Adaptado de: <http://ameliapalmela.webnode.com/products/schinus-molle/> (consultado a 5 de Junho de 2011)].

Esta espécie sobressai por ser indiferente ao tipo de solo, com excepção de solos com muito calcário ou muita humidade. Pode suportar variadas condições climatéricas, é resistente a longos períodos de seca; reproduz-se facilmente e cresce rapidamente. A árvore normalmente é mais usada como planta de decoração paisagística e o tronco produz uma resina com propriedades que permitem que seja utilizada na produção de vernizes [Mejía-Díaz et al., 2007].

No entanto a árvore *Schinus molle* tem limites biofisiológicos que são os seguintes: altitudes de 0 a 2400 ou 3900 m, temperaturas médias anuais de 15-20°C e precipitação média anual de 300-600 mm [Orwa et al., 2009].

Concentrado nas folhas e frutos encontra-se um óleo essencial que é aplicado em remédios caseiros contra manchas na córnea, assim como no tratamento de doenças venéreas e problemas no sistema urinário e genital. A madeira da árvore (Figura 17) é usada como uma infusão para diminuir inflamações e ajudar a curar úlceras [Mejía-Díaz et al., 2007].

1.14 Antibióticos antibacterianos

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

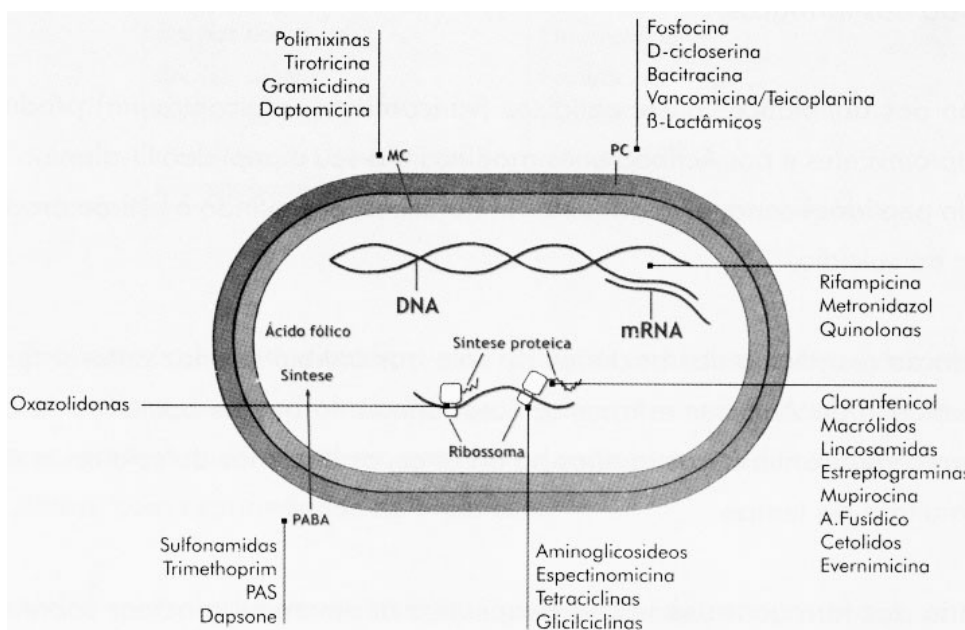


Figura 1.20 - Locais de acção dos diferentes grupos de antibióticos.

Os antibióticos antibacterianos têm um tropismo para a célula procariota, interagindo com os respectivos alvos, exercendo a sua actividade bacteriostática ou bactericida [Sousa, 2006].

Os antibióticos aminoglicosídicos-aminociclíticos e os antibióticos β -lactâmicos são considerados os principais agentes do armamentário terapêutico, utilizados, em monoterapia ou em associação, no tratamento das sepsis graves provocadas por bacilos Gram-negativos e por cocos Gram-positivos. Constituem um grupo bastante heterogêneo quanto à sua composição química, propriedades antibacterianas e propriedades farmacológicas [Sousa, 2006].

As moléculas destes antibióticos têm em comum um anel aminociclitol, derivado do inositol, unido a açúcares aminados, através de ligações glicosídicas, devendo por isso designar-se antibióticos aminoglicosídeos-aminociclíticos. Podem obter-se por processos naturais, à custa de culturas do género *Streptomyces* (estreptomina, neomicina, canamicina e amicacina) e do género *Micronospora* (gentamicina, sisomicina e netilmicina), sendo alguns deles obtidos por síntese química à custa dos produtos naturais, com a introdução de novos radicais. A designação inglesa dos aminoglicosídeos-aminociclíticos tem a ver com a sua origem, sendo que os antibióticos produzidos por *Streptomyces terminam em -mycin* (ex: *Streptomycin*) e os derivados de *Micronospora* terminam em *-micin* (ex: *Gentamicin*) [Sousa, 2006].

Têm uma actividade acentuada contra *S.aureus* e contra bacilos Gram-negativos aeróbios. Os aminoglicosídeos, dado o seu amplo espectro de actividade, têm sido utilizados em monoterapia e no tratamento de infecções graves [Sousa, 2006].

Em resumo, os aminoglicosídeos exibem as seguintes vantagens terapêuticas: estabilidade metabólica, rápida acção bactericida, largo espectro de acção antibacteriana, sinergismo com os antibióticos beta-lactâmicos e raros fenómenos de hipersensibilidade [Sousa, 2006].

1.14.1 Química dos aminoglicosídeos-aminociclíticos

São constituídos por 2 ou mais açúcares aminados unidos por ligações glicosídicas a um núcleo aminociclitol, daí a designação aminoglicosídeos-aminociclíticos. Possuem açúcares hidrofílicos com múltiplos grupos amino, protonados a pH fisiológico, funcionando portanto como moléculas policatiónicas e facilitando a ligação às regiões polianiónicas de rRNA 16S na subunidade 30S ribossomal [Sousa, 2006].

A maioria dos aminoglicosídeos contém como aminociclitol, 2-deoxistreptamicina. A família da gentamicina inclui as gentamicinas C1, C1a e C2, sisomicina e netilmicina. Estes compostos têm um aminoaçúcar específico - a garosamina - que é uma 3-aminopentose, na posição III. As variações de metilação no aminoaçúcar em I originam diversos tipos de gentamicina, mas essas modificações não alteram praticamente a actividade biológica [Sousa, 2006].

A classificação dos aminoglicosídeos é baseada na estrutura química do aminociclitol (estreptidina, estreptamina e 2-deoxiestreptamina), incluindo aqueles em que os aminoaçúcares estão ligados aos 4-OH e 5-OH e aos disubstituídos em 4 e 6-OH (Fig. 1.21).

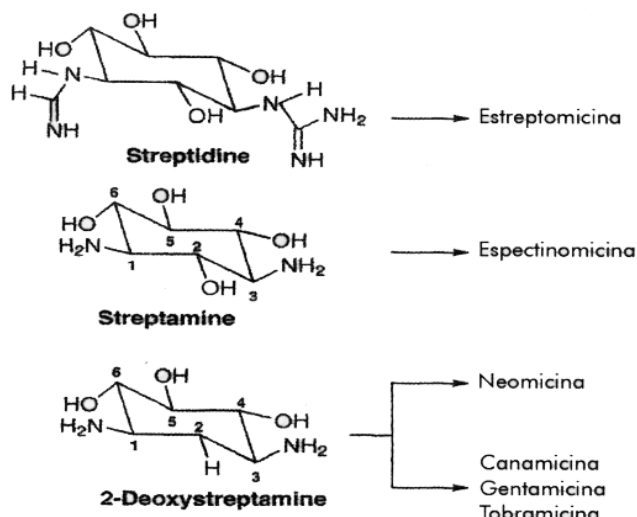


Figura 1.21 - Classificação dos aminoglicosídeos de acordo com a estrutura química.

1.14.2 Mecanismo de acção

Ao aminoglicosídeos são considerados habitualmente antibióticos inibidores da síntese proteica. Têm efeitos pleiotrópicos sobre a célula bacteriana (inibição da síntese proteica, produção de proteínas anómalas “non sense”, alteração da permeabilidade celular e inibição da replicação do DNA), sendo aceite que a inibição da síntese proteica é o principal mecanismo da morte celular [Sousa, 2006].

1.14.3 Gentamicina:

- **Composição química e propriedades:**

É produzida naturalmente por *Micromonospora purpúrea* e é constituída por vários produtos, contendo as formas farmacêuticas injectáveis, aproximadamente, iguais proporções de gentamicina C1, C1a e C2 (Fig. 1.22), com potência similar [Sousa, 2006].

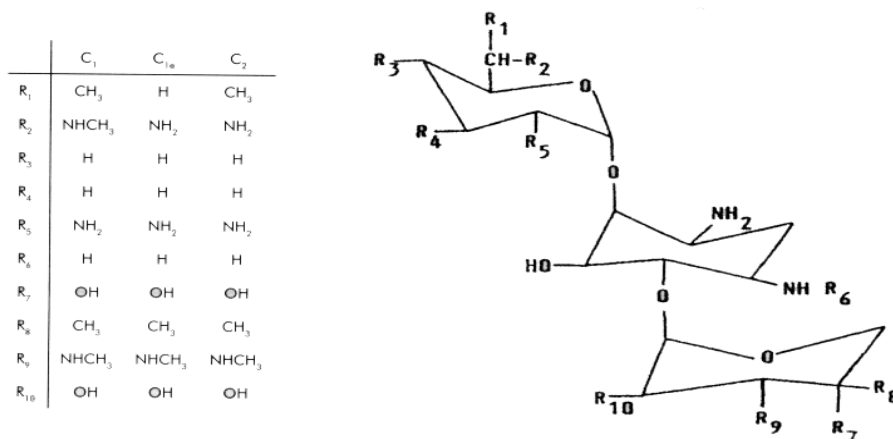


Figura 1.22 - Composição química e estrutura da Gentamicina.

Apresenta incompatibilidade química, *in vitro*, com as β -lactaminas. Provoca a abertura nucleofílica do anel β -lactâmico inactivando-o e por sua vez este reage com o grupo metilamino da gentamicina, originando uma amina farmacologicamente inactiva. Esta interacção é lenta e só é significativa, de um ponto de vista clínico, quando a gentamicina e o β -lactâmico são misturados em líquido de perfusão parenteral de administração lenta. O teor da inactivação *in vitro* depende da temperatura, tempo de contacto, composição do meio e da concentração do β -lactâmico [Sousa, 2006].

- **Espectro antibacteriano:**

É um antibiótico de largo espectro, activo contra *Staphylococcus aureus* e bacilos Gram-negativos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*. Contra estirpes bacterianas susceptíveis, a gentamicina é geralmente mais eficaz que os outros aminoglicosídeos. Por exemplo, gentamicina é cerca de 4 vezes mais activa que estreptomina e amicacina contra *S. aureus*.

A Gentamicina é cerca de 5 vezes menos activa do que tobramicina contra estirpes susceptíveis de *P.aeruginosa* [Sousa, 2006].

Em virtude da sua larga utilização terapêutica tem-se assistido a um número crescente de estirpes bacterianas resistentes à gentamicina, predominantemente nas infecções nosocomiais [Sousa, 2006].

Capítulo 2

Objectivo

Tendo em conta todas as informações recolhidas de estudos anteriores, o principal objectivo deste trabalho foi determinar a actividade antibacteriana do óleo essencial *Schinus molle* (extraído das folhas da planta) e seus componentes contra estirpes Gram-negativas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, assim como, de uma estirpe Gram-positiva de *Staphylococcus aureus*, utilizando os seguintes métodos: difusão em agar com cavidades cilíndricas (poços) para a determinação dos halos de inibição, macrodiluição para a determinação das CMI e CMB e o teste em placa para a determinação do efeito de vapor.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Óleo essencial utilizado:



Figura 3.1 - *Schinus molle*. Exemplares para produção de 6-7 anos - COE.

O óleo essencial de *Schinus molle* foi cultivado e adaptado na zona de Santa Fé (Argentina). É normalmente extraído de árvores de vários anos e principalmente dos frutos, neste caso a extracção foi realizada a partir dos frutos triturados por extracção industrial por arraste em corrente de vapor. As plantas que dão origem aos óleos

foram recolhidas na época de floração da zona.

As plantas encontram-se no: “Centro Operativo Experimental “Ángel Gallardo” da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Nacional do Litoral, Santa Fe, Argentina”.

Tabela 3.1 - Composição dos OE's de frutos e folhas de *S.molle* em Santa Fé, Argentina.

Compostos	Frutos verdes	Folhas e caules Novembro '05	Frutos maduros	Folhas e Caules
	móidos Novembro '05		móidos Março '06	Abril '04
tuyeno	0,5	0,8	1,2	2,0
α-pineno	1,6	5,1	14,3	10,0
canfeno	0,1	0,1	0,3	1,8
β-pineno	2,6	5,6	12,9	15,1
sabineno	31,4	63,0	43,1	38,3
mirceno	1,7	1,7	1,7	1,5
α-felandreno	0,1	0,1	0,2	0,1
α-terpineno	1,7	0,5	0,5	0,6
limoneno	3,3	4,1	10,8	12,6
γ-terpineno	3,3	0,9	0,2	1,3
p-cimeno	0,9	0,3	0,4	0,4
terpinoleno	0,9	0,2	0,1	0,5
terpinen-4-ol	13,3	2,5	0,1	2,9
β-cariofileno	5,3	2,6	1,9	1,3
α-humuleno	0,9	0,5	0,5	0,2
α-terpineol	0,6	0,1	0,4	0,1
germacreno D	3,7	2,5	5,2	1,3
oxicariofileno	0,2	0,2	0,2	0,3

Tabela 3.2 - Intervalos de percentagem de compostos maioritários dos OE's de frutos de *S.molle* da Argentina.

Compostos	Mínimo (%)	Máximo (%)
α -pineno	1,5	12,5
β -pineno	2,5	20,0
sabineno	31,0	55,0
terpinen-4-ol-1	0,5	13,5
germacreno D	5,2	10,0

Tabela 3.3 - Intervalos de propriedades físicas dos OE's de frutos de *S.molle* da Argentina.

Propriedade	Mínimo	Máximo
Densidade relativa a 20°C/20°C	0,850	0,900
Índice de refração a 20°C	1,4750	1,4850
Rotação óptica a 20°C	- 40	- 65
Solubilidade em etanol de 90 ml/100 ml	7	9

O óleo essencial foi cedido pelo Prof. Jesus M. Rodilla, da Universidade da Beira Interior. Foi analisado por espectrometria de massa, de maneira a distinguir os diferentes componentes e separado por cromatografia em coluna.

Os dados apresentados acima foram fornecidos pelo Eng^o Heriberto Elder da Faculdade de Engenharia Química, da Universidade Nacional do Litoral, em Santa Fé, Argentina.

3.2 Microrganismos:

Os organismos testados foram o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) provenientes da American Type Culture Collection (ATCC) a partir de *Culti-loops*[®] (OXOID LDA.) (armazenadas a 2-8°C) que permitem que culturas padronizadas sejam testadas facilmente e com segurança.

O critério de escolha destas estirpes foi: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), representante da flora humana superficial, como p. ex. a pele e fossas nasais, *Escherichia coli* (ATCC 25922) representante da flora intestinal, e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) uma bactéria ubíqua representativa do meio ambiente.

As culturas puras de cada microrganismo testado, foram mantidas em placas (preparado no laboratório) no meio Muller-Hinton Agar (MHA) (Ref. 784397 - OXOID LTD).

3.3 Meios de cultura:

Para os ensaios de actividade antibacteriana, os meios de cultura utilizados foram o MH2 (Ref. 43301; MH2 - BioMérieux SA) e o caldo Müller-Hinton Broth (MHB) (Ref. 724245 - OXOID LTD).

O meio MH2 é um meio pré-preparado e comercializado em placas, que possui 4 mm de espessura (a mais indicada para este estudo). É um meio indicado para susceptibilidade antibacteriana testada por difusão em agar, tendo uma composição que permite a cultura de bactérias não-fastidiosas (*Enterobacteriaceae*, bacilos Gram-negativos, Staphylococci e Enterococci) encontradas em patologias humanas. Também garante interferência mínima dos seus constituintes nos resultados dos testes. O uso de Müller Hinton 2 agar está em conformidade com os padrões da NCCLS (CLSI) e CA-SFM.

A preparação do meio MHB foi feita de acordo com as instruções do fabricante. No método de diluição em caldo pela técnica de macrodiluição para a determinação da CMI e da CMB, utilizou-se o meio MHB, e também DMSO ou 0.15% Agar para possibilitar uma melhor solubilização do óleo com o meio. A posterior contagem de colónias foi feita no meio sólido MH2. Para o teste do efeito do vapor dos óleos essenciais, utilizou-se também o agar MH2.

3.4 Separação dos componentes do óleo através de cromatografia em coluna:

A cromatografia em coluna é uma técnica usada para a separação de compostos orgânicos. Essa técnica fundamenta-se basicamente na polaridade relativa das moléculas envolvidas.

Para a coluna em seco, foi utilizada uma coluna de vidro onde foi colocada e compactada a sílica-gel (material polar), ou seja, a fase estacionária.

De seguida, passou-se o eluente pela coluna com a ajuda de uma bomba de injeção, de maneira a que a fase estacionária seja toda percorrida pelo eluente. Neste caso, o eluente adicionado inicialmente foi Ciclo-hexano no início, adicionando depois misturas de Ciclo-hexano/Acetato de Etilo (Fase móvel), de polaridade crescente.

Quando a coluna ficou pronta e restava uma diminuta quantidade de solvente na base superior, foram introduzidos no topo da coluna, de maneira homogénea, 12 mL (\approx 10 g) do óleo essencial a separar (*Schinus molle*).

Durante a separação foi-se adicionando o eluente em pequenas fracções de maneira a manter a velocidade de separação, e aumentando gradualmente a polaridade do sistema de eluente com o aumento da concentração do solvente mais polar, neste caso acetato de etilo. Para isso seguiram-se as seguintes etapas:

1. 600 mL de ciclo-hexano;
2. 600 mL de ciclo-hexano/Acetato de Etilo (95:5);
3. 400 mL de ciclo-hexano/Acetato de Etilo (95:5);
4. 500 mL de ciclo-hexano/Acetato de Etilo (90:10);

5. 400 mL de ciclo-hexano/Acetato de Etilo (80:20);
6. 400 mL de ciclo-hexano/Acetato de Etilo (70:30);
7. 400 mL de ciclo-hexano/Acetato de Etilo (60:40);
8. Acetato de Etilo até ao final da separação (aproximadamente 200 mL).

Assim, os componentes do óleo saem conforme a polaridade, ou seja, os menos polares são os primeiros a sair pois têm menos afinidade para a fase estacionária.

As fracções que foram saindo da coluna, foram sendo recolhidas em tubos de ensaio de vidro (devidamente numerados), em volumes aproximadamente iguais, com a ajuda de um colector de fracções (Büchi Fraction Collector C-660).

À medida que foram sendo recolhidas, fez-se um acompanhamento das fracções recolhidas por cromatografia em camada fina (CCF), para verificar quais as fracções que podiam ser combinadas, pois um único composto raramente se encontra apenas numa única fracção e também para saber se todos os componentes tinham sido eluídos.

Para isso, procedeu-se à aplicação de cada fracção, com a ajuda de capilares, em placas cromatográficas de sílica-gel, a 1 cm da base e de modo a obter uma mancha. Cada uma das placas foi colocada numa câmara de eluição preparada previamente com eluente (Ciclo-hexano e Acetato de Etilo) em mistura de polaridades crescentes para que os componentes sejam devidamente separados (os mais polares têm um maior factor de retenção). O nível de eluente deve estar abaixo das manchas das fracções colocadas na placa.

Sem deixar o eluente chegar ao cimo da placa, retira-se esta da câmara e verifica-se o avanço dos componentes. Verifica-se quais têm os mesmos factores de retenção, ou seja, quais são as fracções que contêm componentes iguais. Finalmente, juntam-se essas fracções que contêm os mesmos componentes de maneira a maior concentração dos mesmos no mesmo extracto.

Uma vez que as fracções recolhidas se encontravam diluídas, foi necessário evaporar o solvente para obter um composto puro. Para isso, colocaram-se as fracções em balões de fundo redondo e evaporaram-se utilizando um evaporador (Rotavapor Büchi RE111) e um banho (Water Bath Büchi 461) a baixa temperatura, visto que o óleo essencial é extremamente volátil.



Figura 3.2 - Cromatografia em coluna (CC) [Adaptada de <http://www.pharmaceuticals1.coc/supplier/sorbead-india-1/column-chromatography-bulk-media-for-research.html> (consultada em 15 de Junho de 2010)].

3.5 Preparação das culturas primárias:

Deve-se ter em conta que, utilizando *Culti-loops* de microrganismos, há um procedimento recomendado que é o seguinte:

1. Aquecer a placa de meio a uma temperatura de 37°C, de modo a eliminar a humidade;
2. Remover o invólucro e colocar a ansa em contacto com o meio aquecido durante 10 a 15 segundos, para permitir a absorção do liofilizado;
3. Utilizar o método de estrias;
4. Incubar as placas à temperatura óptima para o crescimento do organismo.

3.6 Preparação da densidade do inoculo:

Tendo em conta que a densidade do inoculo influencia o resultado dos ensaios, padronizou-se a quantidade de inoculo a ser utilizada, a fim de assegurar a reprodutibilidade analítica. Após recuperação das estirpes liofilizadas de ATCC, seguindo as instruções do fabricante, inocularam-se pelo método de estrias, três placas de MH2 (uma para cada microrganismo). Incubaram-se a 36 °C ± 1 °C durante 18-24 h. De modo a obter-se um inoculo correspondente a uma concentração bacteriana aproximada de 10⁶ UFC/ml, procedeu-se do seguinte modo:

- Retiraram-se algumas colónias do microrganismo a testar para 3 mL de NaCl (ampola BioMérieux - 0,85%), de modo a obter uma turvação correspondente ao padrão de McFarland de 0,5 (comprimento de onda de 550 nm, A ≈ 0,125). Assim, para a padronização do inoculo foi utilizado o aparelho DENSIMAT - Densitómetro de faixa entre 0,5 e 7,5 na escala de McF (Cód. 99234 BioMérieux). O Densitómetro é activado simplesmente pela colocação da ampola de NaCl (0,85%) no compartimento de leitura. A densidade bacteriana é medida instantaneamente, sendo directamente proporcional à densidade da suspensão expressa em unidades de MacFarland (0,5 corresponde a 10⁸ UFC/mL);
- De seguida, diluiu-se a suspensão de 10⁸ UFC/mL, retirando 0,1 mL desta e misturando com 9,9 mL de meio MHB (Müller-Hinton Broth). Obtém-se assim uma diluição de 10⁶ UFC/mL num volume final de 10 mL. Utilizou-se sempre como solução de diluição o meio líquido MHB.

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

3.6.1 Confirmação da concentração do inoculo:

A concentração do inoculo é feita a partir de diluições sucessivas em soro fisiológico estéril. Para isso, retirou-se 0,1 mL do inoculo (10⁶ UFC/mL) e diluiu-se em 9,9 mL de soro fisiológico (NaCl 0.85%). Homogeneizou-se bem e daqui obteve-se uma diluição de 10⁴ UFC/mL. Deste último retirou-se 1 mL e diluiu-se em 9 mL de soro fisiológico (10³ UFC/mL),

homogeneizando bem. Inoculou-se 0,1 ml desta última diluição por espalhamento no meio MH2. Incubou-se cada placa a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 h. Procedeu-se à contagem das colónias na placa (devendo ser aproximadamente 100 UFC/mL). Deste modo confirmou-se a concentração do inoculo que variou sempre entre 10^5 UFC/ml e 10^6 UFC/ml.

3.7 Avaliação da actividade antibacteriana:

A avaliação da actividade antimicrobiana foi realizada através do método de difusão com perfuração do agar, de modo a obter cavidades cilíndricas (poços) com uma altura aproximada de 4 mm e diâmetro de 5 mm. Este método permite-nos ter uma ideia da potencial actividade antimicrobiana do óleo essencial em estudo, através da leitura dos halos de inibição, visualmente ou com um microscópio estereoscópico. Como controlo positivo, utilizou-se o antibiótico Gentamicina na concentração de 10 mg/ml (acção de largo espectro), da Sigma-Aldrich. Como controlo negativo foi utilizada a solução 0,15 % agar + DMSO 5%.

Para o estudo da actividade antibacteriana dos vapores do óleo essencial, utilizou-se o método que consiste no impacto do vapor (a 1 cm de distância) no agar inoculado, respectiva difusão no agar e posterior medição do halo de inibição.

Finalmente, procedeu-se à determinação do CMI e CMB pela técnica de macrodiluição em caldo MHB. Como controlo positivo utilizou-se o caldo MHB com inoculo e sem o óleo essencial. Como controlo negativo, utilizou-se o caldo MHB, sem inoculo, e com a solução (0,15 % agar + DMSO 5 %) de óleo essencial.

3.7.1 Procedimento do método de difusão em agar pela técnica do poço:

Para este procedimento, seguiu-se a metodologia de difusão em agar com o uso de discos proposta pela CLSI (M02-A10), mas substituindo os discos de papel estéreis por poços cilíndricos de 4 mm de altura e 5 mm de diâmetro, perfurados no agar. O inoculo utilizado foi de, aproximadamente, 10^6 UFC/ml. O protocolo prático foi realizado do seguinte modo:

1. Embebeu-se um swab (zaragatoa) estéril no inoculo previamente preparado (10^5 - 10^6 UFC/mL), tendo o cuidado de pressionar o swab contra a parede do tubo, de modo a eliminar o excesso de liquido. De seguida espalhou-se uniformemente sobre a placa de agar MH2, de maneira a cobrir toda a superfície do agar com o inoculo.
2. Deixou-se em repouso durante 15 a 20 minutos de modo a que o meio de cultura absorva o inoculo. De seguida, os poços foram feitos com um utensílio próprio de modo a obter poços de 5 mm de diâmetro e 4 mm de altura.
3. Posteriormente, os poços foram preenchidos com 70 μL do óleo essencial a ser testado ou os seus componentes e respectivos controlos.

4. Após um período de repouso de 15 minutos à temperatura ambiente, o que permite a difusão dos óleos, controlo negativo e positivo, as placas foram incubadas (sem inverter) a uma temperatura média de 37 °C durante 18-24 h.
5. Após o período de incubação, foram analisados os resultados, medindo os halos de inibição obtidos para cada poço.

Os ensaios foram realizados em triplicado (sempre que possível) para o óleo inteiro e os seus componentes, assim como para as estirpes utilizadas. Todo este processo foi realizado em condições de esterilidade.

3.7.2 Procedimento do método dos vapores:

A técnica seguida para o estudo do efeito dos vapores dos óleos essenciais nos microrganismos a testar baseou-se na metodologia proposta por Lisin et al. (1999). O protocolo prático foi realizado do seguinte modo:

1. Espalhou-se uniformemente, com uma zaragatoa estéril, o inóculo do microrganismo a testar sobre a placa de agar MH2.
2. Deixou-se repousar durante 15 minutos de modo a que o meio de cultura absorva o inóculo.
3. Adicionou-se 70 µl de óleo no centro da tampa da placa de Petri, a uma distância de, aproximadamente, 1 cm do agar inoculado, de maneira a realizar um teste comparativo com o método de difusão em agar pela técnica dos poços.
4. Inverteu-se a placa e incubou-se a uma temperatura média de 37 °C durante 18-24 h. Ao fim do período de incubação, registou-se o efeito do óleo no crescimento bacteriano medindo o halo de inibição obtido.

Este processo foi realizado em condições estéreis e sempre que possível em triplicado.

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

A determinação da CMI e da CMB foi realizada pela técnica de macrodiluição, de acordo com a metodologia M07-A8, proposta pelo CLSI. A esta metodologia foi adicionado o teste da Resazurina, para melhor detecção de crescimento bacteriano.

Nos MIC's, foram realizados ensaios preliminares com o óleo essencial emulsionado em 0,15% agar + DMSO 5%. Paralelamente, testaram-se com estas emulsões, o uso da rezasurina com um período de incubação de 18 horas e adição apenas no final.

Concluimos que os melhores resultados foram os obtidos com o óleo emulsionado na solução de 0,15% agar + DMSO 5% e com adição da rezasurina apenas no final do período de incubação.

3.7.3.1 Diluições consecutivas de 1:2 do óleo essencial *Schinus molle*:

Preparou-se o inoculo do microrganismo a testar num volume suficiente para realizar os ensaios de macrodiluição e numa concentração de 10^6 UFC/mL.

Foi também necessário preparar uma solução de Resazurina 1% em Soro Fisiológico (NaCl 0.85 %). Para isso preparou-se a solução de NaCl 0.85% (100 mL) à qual se adicionou a Resazurina (1 mg). Esta solução foi esterilizada com filtros estéreis de 0,45 μ m de porosidade.

De seguida preparou-se uma primeira solução de óleo na concentração de 90 mg/mL, adicionando 2 mL de solução de 0.15% agar + DMSO 5% a 180 mg de *S. molle*. Foram preparados 8 tubos estéreis para cada ensaio:

✓ **Tubos 1 a 6:**

Prepararam-se 8 tubos estéreis. Nos primeiros 6 tubos colocou-se 1 mL de caldo MHB (concentração dupla). De seguida, ao 1º tubo adicionou-se 1 mL de solução de óleo essencial perfazendo. Após homogeneizar no vórtex, transferiu-se 1 ml do 1º tubo (diluição 1:2) para o 2º tubo diluindo para 1:4 e assim sucessivamente. Por ultimo, adicionou-se 1 ml do inoculo em todos os tubos com excepção do controlo negativo.

✓ **Controlo positivo / crescimento:**

Num tubo adicionou-se 1 mL de caldo MHB (concentração dupla) mais 1 mL do inoculo.

✓ **Controlo negativo/ esterilidade:**

Num tubo adicionou-se 1 mL de caldo MHB (concentração dupla) mais 1 mL da emulsão do óleo.

Todos os tubos de ensaio (1 a 8), bem homogeneizados, foram incubados durante 18-24 h à temperatura de aproximadamente 37 °C. Após o tempo de incubação, os tubos foram examinados visualmente e de seguida, adicionou-se 1 ml solução de Resazurina o que facilitou a visualização do crescimento bacteriano.

Para a determinação da CMB, inoculou-se 0,1 ml de cada tubo pelo método de espalhamento em placas de Petri com o meio de cultura MH2. Incubou-se a aproximadamente 37 °C durante 18-24 h e procedeu-se à contagem das colónias. Todos os ensaios foram realizados em câmara de segurança biológica, em condições estéreis e em triplicado (ver figura seguinte).

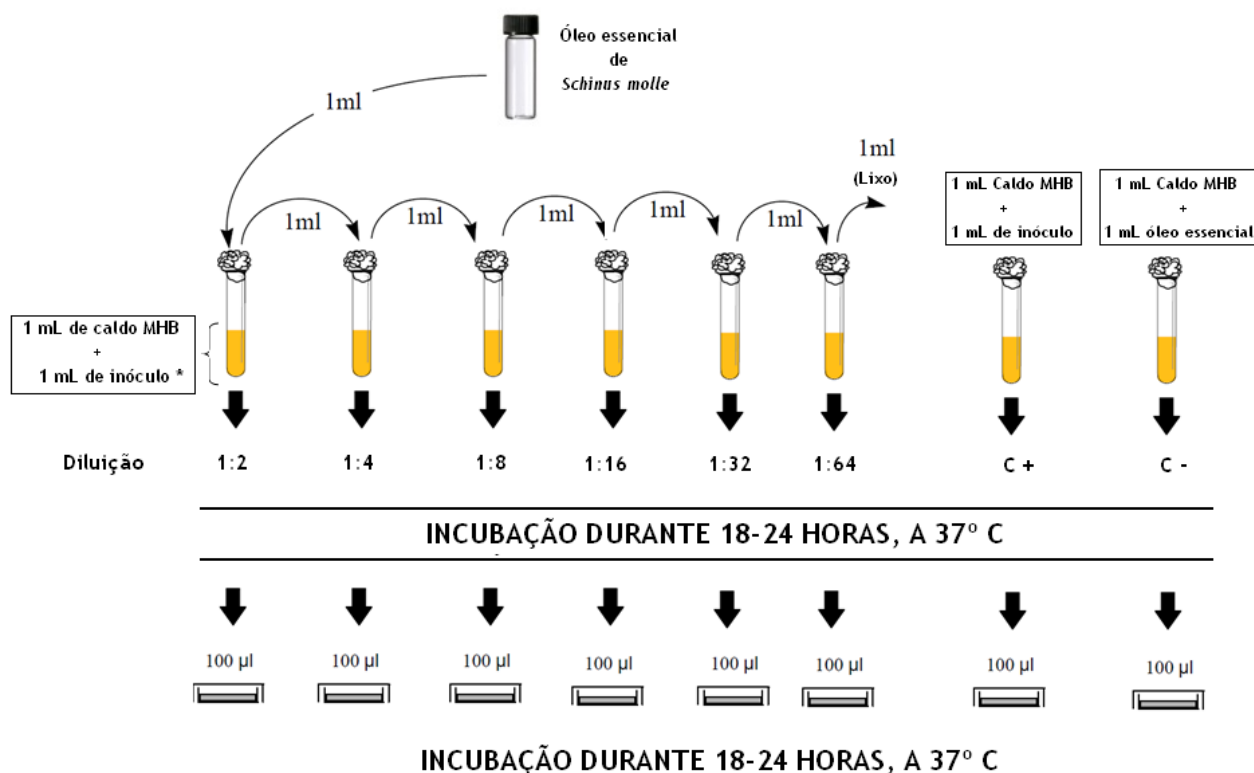


Figura 3.3 - Esquema resumido do procedimento para as diluições consecutivas de 1:2, para execução dos ensaios pelo método de macrodiluição em caldo, igual para todos os ensaios.

(*O inóculo utilizado foi de 3 estirpes: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*)

3.8 Ensaio realizados:

As metodologias usadas nesta tese tiveram como base uma vasta consulta bibliográfica, de onde se constatou a utilização de uma grande variedade de técnicas utilizadas. Os métodos apresentados neste trabalho tiveram como suporte variados ensaios experimentais que aqui não são descritos, assim como alterações de métodos já existentes, possibilitando a otimização prática e a formulação de ideias para possíveis estudos futuros.

3.9 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa SPSS statistics 17.0. Foi feita uma análise de variância, através de *two-way ANOVA*, visto que existem dois factores (estirpes e diluições ou extractos de óleo e diluições, dependendo dos dados analisados). A variável dependente será, em todos os casos, a medida dos halos de inibição. Para complementar, foi feito um estudo de comparação a posteriori (*post-hoc*) que foi o Teste de Tukey.

O teste Tukey permitiu estabelecer a diferença mínima significativa, ou seja, a menor diferença entre as médias que deve ser tomada como significativa a determinado nível de significância, neste caso quando o valor de probabilidade $p < 0,05$.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

O óleo essencial de *Schinus molle* testado foi obtido por extracção industrial por arraste em corrente de vapor. A composição do óleo foi adquirida através do método de espectrometria de massa e os extractos foram separados por cromatografia.

Os dados da composição do óleo testado, informações referentes à extracção e aos seus componentes, foram cedidos pelo Prof. Jesus M. Rodilla, da Universidade da Beira Interior.

4.1 Óleo de *Schinus molle*:

Foram identificados muitos componentes do óleo essencial *Schinus molle*, dos quais o Sabineno (39,27%) e o α -pineno (39,27%) são os maioritários num total de 94% do óleo essencial (Tabela 5). Estudos anteriores demonstraram que o α -pineno, β -pineno e também o Sabineno pertencem aos compostos maioritários do óleo essencial de *Schinus molle*. Mas existe uma grande variação dos compostos maioritários consoante os factores ambientais e factores antrópicos a que a planta é sujeita, o que pode exercer variações nas rotas metabólicas da planta. Na separação cromatográfica em coluna, os componentes que se obtiveram em maior quantidade foram precisamente o sabineno, α -pineno e β -pineno.

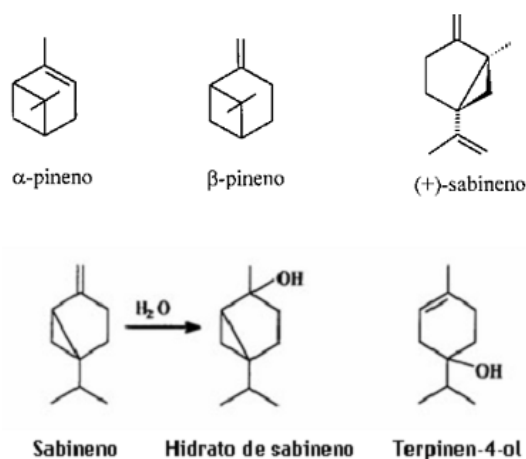
Tabela 4.1 - Composição do óleo essencial *Schinus molle* obtido dos frutos maduros.

Compostos	Frutos maduros
Tuyeno	1,2
α -pineno	14,3
Canfeno	0,3
β -pineno	12,9
Sabineno	43,1
Mirceno	1,7
α -felandreno	0,2
α -terpineno	0,5
Limoneno	10,8
γ -terpineno	0,2
p-cimeno	0,4
Terpinoleno	0,1
Terpinen-4-ol	0,1
β -cariofileno	1,9
α -humuleno	0,5
α -terpineol	0,4
Germacreno D	5,2
Oxicariofileno	0,2

Das fracções separadas a partir do óleo inteiro, obtiveram-se algumas com os principais componentes, os quais foram usados nos ensaios realizados para este estudo.

Tabela 4.2 - Composição dos extractos de óleo *Schinus molle* utilizados neste estudo.

Extractos	Componentes (%)				
	α - pineno	β - pineno	Sabineno	Espatulenol	Terpen-4-ol
F7	19	2,5	25	-	-
F12	-	-	11	-	-
F13	-	-	12	16	-
F51	-	-	-	18	21
F52	-	-	-	14	25
F53	-	-	-	7	19

Figura 4.1 - Componentes maioritários do óleo essencial *Schinus molle*.

Os extractos usados neste estudo, mencionados na tabela anterior, foram diluídos numa concentração de 90 mg/mL de modo a ficarem todos com a mesma concentração do componente existente em menor quantidade.

4.2 Actividade antibacteriana do óleo essencial

A determinação da actividade antimicrobiana, do óleo essencial contra os microrganismos testados, foi realizada através de três métodos: o método de difusão em agar pela técnica do poço, o método por libertação de vapor e o método das diluições em caldo (macrodiluição) para determinar as CMI e as CMB, que foram descritos anteriormente. Na técnica de difusão em agar e método de vapor, após o período de incubação das placas com os microrganismos e óleos a serem testados, foram feitas as medições dos halos de inibição.

Os resultados foram obtidos medindo o diâmetro do halo de inibição (incluindo os 5 mm do poço).

Para o método de diluição em caldo, macrodiluição, os resultados foram registados através de observação visual dos tubos (com e sem resazurina) e da contagem de UFC pelo método de espalhamento em placas de Petri, de modo a confirmar as CMI e as CMB do óleo *S. molle*.

4.2.1 Halos de inibição resultantes do método de vapores:

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

Susceptibilidade do microrganismo	Medida do Halo de inibição (mm)
Sensíveis	≥ halo controlo positivo.
Moderadamente sensíveis	> 2 e ≤ ≈3 mm controlo positivo.
Resistentes	Menor ou Igual que 2 mm.

Assim, tendo como controlo positivo o antibiótico Gentamicina (largo espectro), e comparando os halos de inibição das três estirpes testadas com o *Schinus molle* com os halos resultantes do antibiótico, verificou-se que o óleo essencial mostrou maior efeito inibidor de vapor, relativamente à estirpe Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25922).

Tabela 4.3 - Halos de inibição da actividade antibacteriana do vapor do óleo essencial, *Schinus molle*, contra os microrganismos testados, segundo o método dos vapores.

Estirpe	Média dos halos de inibição (mm)	
	<i>Schinus molle</i> (vapor)	DMSO/Agar
<i>Staphylococcus aureus</i>	28	6
<i>Escherichia coli</i>	NI	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NI	5

*NI - Não houve inibição (ausência de halo de inibição).

** Para todos os ensaios do efeito de vapor foram realizados triplicados.

4.2.2 Halos de inibição pela técnica do poço:

Seguindo os critérios dos halos de difusão referidos no ponto anterior, o extracto bruto de *Schinus molle* apresentou boa inibição contra a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, o que está de acordo com os valores obtidos para os ensaios de vapor. O extracto bruto de *Schinus molle* apresentou um fraco efeito inibidor relativamente a *Escherichia coli* ATCC 25923, estando de acordo com os valores obtidos nos ensaios de efeito de vapor. Segundo estudos realizados anteriormente, indicaram que a actividade do *Schinus molle* pode ser atribuída devido aos monoterpenos hidrocarbonados (compostos maioritários), uma vez que estes compostos apresentam uma actividade de forte a moderada contra bactérias Gram-positivas e actividades mais débeis contra bactérias Gram-negativas. Estes dados coincidem

com o presente trabalho. A actividade do óleo pode dever-se aos compostos maioritários que estão presentes, assim como à possível sinergia entre alguns deles.

4.2.2.1 Ensaio realizado com óleo bruto

Num estudo inicial, foi realizada a análise dos efeitos antibacterianos do óleo *Schinus molle* (com diferentes concentrações) em três diferentes estirpes.

Tabela 4.4 - Resultados obtidos nos ensaios com aplicação do método de difusão em agar pela técnica do poço, para as três estirpes e com as diferentes diluições do óleo *Schinus molle* bruto (ensaios realizados em hexaplicado).

		Diluição do óleo <i>Schinus molle</i>						
		Óleo Bruto	1:2	1:4	1:8	1:10,5	1:16	1:32
(mg/mL)		950	475	237	118	90	60	30
(mg/poço)		66,5	33,3	16,6	8,3	6,3	4,2	2,1
Estirpe								
<i>S. aureus</i>		38	30	26	18	16	14	6
		38	29	25	16	15	15	5
		38	29	25	17	15	15	5
		39	29	26	19	15	14	5
		38	29	25	18	16	14	6
		38	29	25	17	15	15	5
<i>E. coli</i>		22	15	11	9	5	5	5
		22	15	10	9	5	5	5
		22	15	11	8	6	5	5
		22	15	11	8	5	5	5
		22	16	11	9	5	5	5
		22	16	11	9	5	5	5
<i>P. aeruginosa</i>		16	11	8	5	5	5	5
		16	12	7	6	5	5	5
		16	12	7	5	5	5	5
		16	11	7	5	5	5	5
		16	12	7	6	5	5	5
		16	11	7	5	5	5	5



Tabela 4.5 - Resultados (médias) obtidos nos ensaios para os controlos positivo e negativo, com aplicação do método de difusão em agar pela técnica do poço, para três estirpes.

Estirpe	Controlo negativo (DMSO/Agar)	Controlo positivo (Gentamicina)
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	41
<i>Escherichia coli</i>	5	38
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	39

Exemplo de cálculo:

A densidade do óleo essencial *Schinus molle* é de 0,95 g/mL.

Assim, foram calculadas as concentrações de óleo por poço:

- Emulsão original do óleo → 3 mL de *S. molle* + 3 mL de sol. (0,15% agar+5% DMSO)

Assim, como $0,95 \times 3 = 2,85 \text{ g} = 2850 \text{ mg}$ em 6 mL de solução total

há 475 mg de *S. molle* /mL, na emulsão original.

Tendo em conta que em cada poço são colocados 70 µL de óleo, obtemos:

$$\begin{array}{r} 475 \text{ mg} \text{ ----- } 1000 \text{ } \mu\text{L} \\ \times \text{ mg} \text{ ----- } 70 \text{ } \mu\text{L} \end{array}$$

Assim, teremos 33,3 mg por 70 µL, ou seja, 33,3 mg/poço.

Para a análise estatística, as variáveis envolvidas são Halos de inibição (dependente, quantitativa) e dois factores que são as três estirpes em estudo e as diluições do óleo essencial (variáveis nominais). A variável dependente apresentou-se normal, permitindo a utilização da ANOVA two-way.

O resultado da significância para a homogeneidade da variância é <0,05 [Teste de Levene - Anexo I], o que mostra que as variâncias nos grupos são diferentes (não são homogéneos).

Verifica-se que todos os valores são significantes ($p < 0.05$), ou seja, tanto as diluições como os extractos do óleo afectam o diâmetro dos Halos de inibição. No caso da interacção entre os dois factores, conclui-se que os factores estirpe e diluição são dependentes entre si ($p < 0,05$) [Tabela 2 7.2 - Anexo I].

Como não há indicação de qual diluição ou estirpe afecta mais a inibição bacteriana, é necessário efectuar-se um teste *post hoc*. Por múltiplas comparações e efectuando o teste de Tukey, obtêm-se os seguintes resultados [Tabela 7.3 - Anexo I]:

Tabela 4.6 - Comparação entre diluições e estirpes; resultados expressos pela média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) \pm o desvio padrão (Teste de Tukey, a 5% de probabilidade).

Diluição de <i>S. molle</i>	Estirpe testada		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Bruto	38,167 \pm 0,181 Aa	22,000 \pm 0,181 Ba	16,000 \pm 0,181 Ca
1:2	29,167 \pm 0,181 Ab	15,333 \pm 0,181 Bb	11,500 \pm 0,181 Cb
1:4	25,333 \pm 0,181 Ac	10,833 \pm 0,181 Bc	7,167 \pm 0,181 Cc
1:8	17,500 \pm 0,181 Ad	8,667 \pm 0,181 Bd	5,333 \pm 0,181 Cd
1:10,5	15,333 \pm 0,181 Ad	5,167 \pm 0,181 Bd	5,000 \pm 0,181 Cd
1:16	14,500 \pm 0,181 Ad	5,000 \pm 0,181 Bd	5,000 \pm 0,181 Cd
1:32	5,333 \pm 0,181 Ae	5,000 \pm 0,181 Be	5,000 \pm 0,181 Ce

* Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam ausência de diferença estatística (Teste de Tukey's HSD, $p > 0,05$) entre as três estirpes; letras minúsculas na mesma coluna indicam ausência de diferença estatística (Teste de Tukey's HSD, $p > 0,05$) entre as seis diluições de *Schinus molle*.

Assim, pôde-se verificar que as estirpes têm igual significância estatística ($p < 0,05$) na inibição bacteriana. A diluição que obteve melhor média de inibição bacteriana foi a de 1:2, aplicada à estirpe *Staphylococcus aureus*.

No entanto, o óleo bruto consegue obter ainda melhor inibição para esta mesma estirpe como seria de esperar.

4.2.2.2 Ensaio realizado com os componentes do óleo essencial

Após a análise estatística dos ensaios realizados com o óleo bruto e respectivas diluições, procedeu-se à análise de cada um dos seus componentes para cada estirpe. Para isso utilizaram-se vários extractos do óleo *Schinus molle*, em diferentes concentrações.

As variáveis envolvidas são Halos de inibição (dependente, quantitativa) e dois factores que são os diferentes extractos de óleo e as diluições dos mesmos (variáveis nominais). A variável dependente apresentou-se normal, permitindo a utilização da ANOVA.

Tabela 4.7 - Composição dos extractos obtidos da separação do óleo de *Schinus molle*.

Extractos	Componentes (%)				
	α - pineno	β - pineno	Sabineno	Espatulenol	Terpen-4-ol
F7	19	2,5	25	-	-
F12	-	-	11	-	-
F13	-	-	12	16	-
F51	-	-	-	18	21
F52	-	-	-	14	25
F53	-	-	-	7	19

4.2.2.2.1 *Staphylococcus aureus*

O resultado da significância para a homogeneidade da variância é $>0,05$, o que mostra que as variâncias nos grupos são iguais, levando a concluir que é conhecido o pressuposto da ANOVA [Tabela 7.4 - Anexo II].

Verifica-se que todos os valores são significantes ($<0,05$), ou seja, tanto as diluições como os extractos do óleo afectam o diâmetro dos Halos de inibição. No caso da interacção entre os dois factores conclui-se que os factores extracto e diluição são dependentes entre si ($p < 0,05$) [Tabela 7.5 - Anexo II].

Como não há indicação de qual diluição ou extracto afecta mais a inibição bacteriana, é necessário efectuar-se um teste *post hoc*.

Por múltiplas comparações e efectuando o teste de Tukey, obtêm-se os seguintes resultados:

Tabela 4.8 - Resultados expressos pela média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm) \pm o desvio padrão (Teste de Tukey, a 5% de probabilidade) - Tabela 7.7 - Anexo II.

Estirpe	Extractos de <i>S. molle</i>	Concentração dos Extractos de óleo (mg/mL)			
		90	45	22,5	
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	29,500 \pm 0,289	25,833 \pm 0,289	17,667 \pm 0,289	A
	12	22,667 \pm 0,289	18,500 \pm 0,289	14,667 \pm 0,289	C
	13	25,500 \pm 0,289	14,667 \pm 0,289	11,333 \pm 0,289	B
	51	14,333 \pm 0,289	11,500 \pm 0,289	8,167 \pm 0,289	D
	52	22,333 \pm 0,289	16,000 \pm 0,289	12,667 \pm 0,289	C
	53	22,333 \pm 0,289	16,000 \pm 0,289	12,500 \pm 0,289	C

* Letras iguais na coluna indicam ausência de diferença estatística (Teste de Tukey's HSD, $p > 0,05$) entre os diferentes extractos.

Pôde-se concluir que todas as diluições são estatisticamente significantes, pois o valor- $p < 0,05$ [Tabela 7.6 - Anexo II].

De acordo com a tabela 7.7 apresentada no Anexo II, há uma maior diferença significativa entre o diâmetro dos halos de inibição para o extracto 7 em relação aos outros extractos testados.

Teve-se em conta que para todos os extractos, as diferentes concentrações têm diferença estatística ($p < 0,05$), sendo que a de 90 mg/mL é a que tem melhores resultados.

Assim, verifica-se que o extracto que obteve melhor média de inibição bacteriana foi o 7 (19% de α -pineno, 2,5% de β -pineno e 25% de sabineno), seguido do 12 (11% de sabineno).

4.2.2.2.2 *Escherichia coli*

O resultado da significância para a homogeneidade da variância é $<0,05$, o que mostra que as variâncias nos grupos são diferentes (não são homogêneos), o que leva a concluir que não são conhecidos os pressupostos da ANOVA [Tabela 7.8 - Anexo III].

Verifica-se que todos os valores são significantes ($<0,05$), ou seja, tanto as diluições como os extractos do óleo afectam o diâmetro dos Halos de inibição. No caso da interacção entre os dois factores conclui-se que os factores extracto e diluição são dependentes entre si ($p < 0,05$) [Tabela 7.9 - Anexo III].

Como não há indicação de qual diluição ou extracto afecta mais a inibição bacteriana, é necessário efectuar-se um teste *post hoc*.

Por múltiplas comparações e efectuando o teste de Tukey, obtêm-se os seguintes resultados:

Tabela 4.9 - Resultados expressos pela média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm) \pm o desvio padrão (Teste de Tukey, a 5% de probabilidade) -Tabela 7.11 (Anexo III).

Estirpe	Extractos de <i>S. molle</i>	Concentração dos Extractos de óleo (mg/mL)			
		90	45	22,5	
<i>Escherichia coli</i>	7	11,000 \pm 0,210	6,833 \pm 0,210	5,000 \pm 0,210	C
	12	11,333 \pm 0,210	5,667 \pm 0,210	5,000 \pm 0,210	C
	13	5,000 \pm 0,210	5,000 \pm 0,210	5,000 \pm 0,210	D
	51	10,833 \pm 0,210	6,500 \pm 0,210	5,000 \pm 0,210	C
	52	18,500 \pm 0,210	13,500 \pm 0,210	6,833 \pm 0,210	A
	53	16,333 \pm 0,210	10,000 \pm 0,210	9,833 \pm 0,210	B

* Letras iguais na coluna indicam ausência de diferença estatística (Teste de Tukey's HSD, $p > 0,05$) entre os diferentes extractos.

Pôde-se concluir que todas as diluições são estatisticamente significantes, pois o valor- $p < 0,05$ [Tabela 7.10 - Anexo III].

De acordo com a tabela 7.11 apresentada no Anexo III, há uma maior diferença significativa entre o diâmetro dos halos de inibição para os extractos 52 e 53 em relação aos outros extractos testados.

Teve-se em conta que para todos os extractos, as diferentes concentrações têm diferença estatística ($p < 0,05$), sendo que a de 90 mg/mL é a que tem melhores resultados.

Assim, verifica-se que o extracto que obteve melhor média de inibição bacteriana foi o 52 (14% de espatulenol e 25% de terpen-4-ol), seguido do 53 (7% de espatulenol e 19% de terpen-4-ol).

4.2.2.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

O resultado da significância para a homogeneidade da variância é $<0,05$, o que mostra que as variâncias nos grupos são diferentes (não são homogêneos), o que leva a concluir que não são conhecidos os pressupostos da ANOVA [Tabela 7.12 - Anexo IV].

Verifica-se que todos os valores são significantes ($<0,05$), ou seja, tanto as diluições como os extractos do óleo afectam o diâmetro dos Halos de inibição. No caso da interacção entre os dois factores conclui-se que os factores extracto e diluição são dependentes entre si ($p < 0,05$) [Tabela 7.13 - Anexo IV].

Como não há indicação de qual diluição ou extracto afecta mais a inibição bacteriana, é necessário efectuar-se um teste *post hoc*.

Por múltiplas comparações e efectuando o teste de Tukey, obtêm-se os seguintes resultados:

Tabela 4.10 - Resultados expressos pela média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm) \pm o desvio padrão (Teste de Tukey, a 5% de probabilidade) - Tabela 7.15 (Anexo IV).

Estirpe	Extractos de <i>S. molle</i>	Concentração dos Extractos de óleo (mg/mL)			
		90	45	22,5	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	8,667 \pm 0,213	6,833 \pm 0,213	5,500 \pm 0,213	B
	12	11,333 \pm 0,213	6,167 \pm 0,213	5,167 \pm 0,213	A
	13	10,167 \pm 0,213	7,333 \pm 0,213	5,667 \pm 0,213	A
	51	8,000 \pm 0,213	6,000 \pm 0,213	5,667 \pm 0,213	B
	52	9,333 \pm 0,213	7,333 \pm 0,213	6,833 \pm 0,213	A
	53	9,000 \pm 0,213	8,000 \pm 0,213	6,500 \pm 0,213	A

* Letras iguais na coluna indicam ausência de diferença estatística (Teste de Tukey's HSD, $p > 0,05$) entre os diferentes extractos.

Pode-se verificar que todas as diluições são estatisticamente significantes, pois o valor- $p < 0,05$ [Tabela 7.14 - Anexo IV].

De acordo com a tabela 7.15 apresentada no Anexo IV, há uma maior diferença significativa entre o diâmetro dos halos de inibição para os extractos 12 e 13 em relação aos outros extractos testados.

Teve-se em conta que para todos os extractos, as diferentes concentrações têm diferença estatística ($p < 0,05$), sendo que a de 90 mg/mL é a que tem melhores resultados.

Assim, verifica-se que o extracto que obteve melhor média de inibição bacteriana foi o 12 (11% de sabineno), seguido do 13 (12% de sabineno e 16% de espatulenol).

4.2.2.2.4 Análise geral

Os extractos utilizados que resultaram numa maior inibição bacteriana foram os seguintes:

- ✓ O extracto bruto apresenta melhor actividade contra a estirpe *S. aureus*.
- ✓ Para *Staphylococcus aureus* → Extractos 7 e 12;
- ✓ Para *Escherichia coli* → Extractos 52 e 53;
- ✓ Para *Pseudomonas aeruginosa* → Extractos 12 e 13.

Nota:

Tabela 4.11 - Composição dos extractos obtidos da separação do óleo de *Schinus molle*

Extractos	Componentes (%)				
	α - pineno	β - pineno	Sabineno	Espatulenol	Terpen-4-ol
F7	19	2,5	25	-	-
F12	-	-	11	-	-
F13	-	-	12	16	-
F51	-	-	-	18	21
F52	-	-	-	14	25
F53	-	-	-	7	19

Os componentes maioritários do óleo essencial de *Schinus molle*, Sabineno, α -pineno e β -pineno são compostos hidrocarbonados e lipofílicos. Assim, têm a capacidade de se distribuir pela membrana celular, aumentando a permeabilidade e destabilizando a estrutura das células bacterianas. O Espatulenol e o Terpen-4-ol são álcoois sesquiterpênicos também lipofílicos.

Poderá haver uma possível sinergia entre o sabineno e os pinenos, pois a fracção 7 foi a que teve melhores resultados em relação à estirpe Gram-positiva.

No caso da bactéria *Escherichia coli* parece ser que os álcoois foram os componentes que tiveram melhores resultados, apesar de não serem muito conclusivos.

Em relação à bactéria *Pseudomonas aeruginosa* as fracções que contêm o sabineno foram as que apresentaram maior actividade bactericida.

4.2.3 CMI e CMB - Método de Macrodiluição:

A determinação da CMI e da CMB, foi realizada segundo a metodologia descrita anteriormente, pela técnica de macrodiluição. Alguns dos problemas desta metodologia, é o facto de ser muito trabalhosa, exigir algum tempo para a sua realização e a emulsão do óleo.

Os resultados encontram-se nas tabelas apresentadas a seguir. 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, esta é sempre considerada menor ou igual à CMI, dado que representa o efeito bactericida no crescimento bacteriano em meio de cultura sólido, correspondente à inibição de no mínimo 99,9% do inoculo original. Dado que nos nossos ensaios, foi usado um inoculo de 10^6 UFC/ml, consideramos como CMB as placas que tenham um crescimento bacteriano $\leq 0,1\%$ do inoculo original, ou seja, o corresponde a ≤ 100 UFC/placa (pelo método de espalhamento de 0,1 ml).

Tabela 4.12 - Resultados experimentais de CMI e CMB para as três estirpes como óleo essencial *S. molle*.

* Óleo emulsionado numa solução de Agar 0,15% + DMSO 5%.

* Adição de 1 ml de Resazurina após 18 horas / 37°C.

* Leituras efectuadas ao fim de 30 minutos da adição da Resazurina.

Diluições ↓	mg/mL	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		CMI (Cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (Cor)	CMB (ufc/placa)	CMI (Cor)	CMB (ufc/placa)
1:2	44,8	AE	0	AE	0	AE	0
1:4	22,5	AE	0	AE	0	AE	44
1:8	11,3	AE	0	R	> 300	R	> 300
1:16	5,6	AE	0	R	> 300	NR	NR
1:32	2,8	R	> 300	NR	NR	NR	NR
1:64	1,4	R	> 300	NR	NR	NR	NR
C - (negativo/esterilidade)		AE	0	AE	0	AE	0
C+ (positivo/crescimento)		R	> 300	R	> 300	R	> 300

AE - Tonalidade azul/verde ; R - Tonalidade rosa/vermelho ; NR - Ensaio não realizado.

Tabela 4.13 - CMI e CMB reais e observadas, e concentrações correspondentes do óleo essencial de *Schinus molle*, de acordo com os resultados da tabela anterior.

	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Valores observados						
Diluições	1:16	1:16	1:4	1:4	1:4	1:4
Concentração (mg/mL)	5,6	5,6	22,4	22,4	22,4	22,4
Valores reais						
Diluições	[1:16 ; 1:32]		[1:4 ; 1:8]		[1:4 ; 1:8]	
Concentração (mg/mL)	[5,6 ; 2,8]		[22,5 ; 11,3]		[22,5 ; 11,3]	

4.2.4 Comparação entre os halos de inibição e a CMI e CMB:

Tabela 4.14 - Comparação dos halos de inibição obtidos pela técnica de perfuração em agar; macrodiluição para determinação da CMI e da CMB, para as três estirpes.

Estirpe	Halos de inibição (perfuração em agar)			CMI_{real}	CMB_{real}
	[Óleo] (mg/mL)	Media (mm)	[Óleo] (mg/70 μ L)	[Óleo] (mg/mL)	[Óleo] (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	90	15,3	6,3	[5,6; 2,8]	[5,6; 2,8]
<i>E. coli</i>	90	5,2	6,3	[22,5; 11,3]	[22,5; 11,3]
<i>P. aeruginosa</i>	90	5,0	6,3	[22,5; 11,3]	[22,5; 11,3]

Nesta tabela, podemos constatar as diferenças, mais ou menos acentuadas entre os halos de inibição em placa e as CMI e CMB obtidas. De acordo com estes resultados, os valores são mais consistentes com a estirpe Gram-positiva, *S. aureus*.

4.3 Modo de acção bacteriana:

O modo de acção antibacteriana dos óleos essenciais reflecte como estes conduzirão à morte da célula (microrganismo). Esta acção pode ser sugerida pela composição de cada óleo essencial. Pensa-se que a actividade antibacteriana dos óleos essenciais não seja atribuída a um só mecanismo específico, mas que existem vários alvos na célula, devido aos vários componentes existentes nos óleos essenciais, como já foi referido anteriormente. Nem todos estes mecanismos se realizam em separado. Alguns são afectados como uma consequência de outro mecanismo.

Como se pôde verificar neste estudo, há componentes maioritários no *Schinus molle* que têm um efeito antimicrobiano mais acentuado, apesar de poder ser resultante de uma sinergia entre os vários componentes constituintes do óleo. O antagonismo entre as diversas fracções também deverá ser tido em conta.

4.4 Projectos futuros:

A área das bioactividades de óleos essenciais é muito vasta e pode seguir variadas direcções em muitas áreas. Dado que nesta tese se estudou a actividade antibacteriana do óleo essencial *Schinus molle* no seu todo e também os seus componentes maioritários, seria interessante futuramente aprofundar as bioactividades deste óleo essencial, tendo em conta os seguintes pontos:

- ✓ Estudar mais aprofundadamente os efeitos sinérgicos e antagónicos dos vários componentes maioritários;
- ✓ Estudar o modo de acção bacteriana de cada componente maioritário dos óleos essenciais;
- ✓ Estudar a existência de possíveis interacções entre o óleo essencial e o emulsionante, verificando se agem antagónica ou sinergicamente, testando com vários tipos de emulsionantes;
- ✓ Os efeitos sinérgicos podem ser explorados de maneira a maximizar a actividade antibacteriana e minimizar as concentrações necessárias para atingir um efeito antibacteriano específico;
- ✓ A estabilidade dos óleos essenciais durante o processamento dos alimentos também poderia ser estudada;
- ✓ Também poderá ser aperfeiçoado o método de diluição em caldo (macrodiluição) utilizando o teste da Resazurina, visto que este facilita a interpretação dos resultados.

Capítulo 5

Conclusão

Este trabalho teve como principal objectivo estudar as actividades antibacterianas do óleo essencial *Schinus molle* para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tendo sido escolhidas as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), representante da flora humana superficial, como por exemplo a pele e fossas nasais, *Escherichia coli* (ATCC 25922) representante da flora intestinal, e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) uma bactéria ubíqua representativa do meio ambiente. Para isso foram utilizadas três metodologias: difusão em agar (perfuração em agar e pela técnica de vapor), diluição em caldo (macrodiluição). Os ensaios realizados neste estudo basearam-se em técnicas já existentes e descritas em diversos artigos, ensaios experimentais que aqui não são descritos e que ajudaram a aperfeiçoar a prática de modo a tentar obter resultados mais conclusivos e metodologias mais consistentes. No nosso entender, a metodologia prática para o estudo da actividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos dos extractos de plantas deve ser optimizado. Este trabalho pretende contribuir para tal.

A solução de diluição/emulsão de Agar 0,15% + DMSO5% parece ser mais adequada, com menor interferência nos resultados.

De acordo com os resultados e estudos prévios, o método de difusão em agar pela técnica dos poços é mais satisfatório para a detecção da actividade antibacteriana.

O teste de Resazurina permite uma melhor visualização do crescimento bacteriano pelo método de macrodiluição (torna-se bastante difícil a visualização da turvação devido à emulsão do óleo).

Concluimos que o extracto bruto do óleo apresenta uma boa inibição da estirpe *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e uma fraca inibição das estirpes Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Para o extracto bruto do óleo, houve uma melhor concordância entre os resultados obtidos nos métodos de difusão em agar e diluição em caldo para *Staphylococcus aureus*.

Em relação ao estudo dos componentes do óleo essencial, concluiu-se que o efeito de vapor é devido aos componentes α -pineno e o β -pineno.

O componente maioritário que poderá potenciar os efeitos antibacterianos do óleo será o sabineno. No entanto, este terá um maior efeito quando misturado com outros componentes maioritários, neste caso o α -pineno e o β -pineno. Comparando os resultados da fracção 7 e da fracção 12, verifica-se uma menor inibição no caso da fracção 12 que é aquela que contém o sabineno isolado, ou seja, poderá haver efeitos sinérgicos entre estes dois compostos. Em relação às fracções 52 e 53 também pôde verificar-se uma inibição fraca/moderada sobre a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, mas também sobre a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. Isso poderá estar relacionado com a lipofilicidade dos componentes que é

maior quanto maior for o peso molecular. Os álcoois sesquiterpênicos Espatulénol e terpen-4-ol têm um maior peso molecular e a sinergia entre eles poderá aumentar a lipofilicidade, facilitando a permeabilização da bactéria Gram-negativa. Comparando os resultados das fracções 51, 52 e 53, também pôde concluir-se que quando a percentagem de Terpen-4-ol é muito maior que a de Espatulénol há maiores efeitos bactericidas. Em relação à fracção 13 (12% Sabineno e 16% Espatulénol), os resultados da inibição foram fracos, o que pode dever-se a falta de sinergia entre estes compostos ou até presença de antagonismo entre eles.

A bactéria mais resistente encontrada neste estudo foi *Pseudomonas aeruginosa*.

Em geral, conclui-se que o óleo em estudo, *Schinus molle*, tem efeitos antibacterianos fortes sobre bactérias Gram-positivas e mais fracos sobre as bactérias Gram-negativas. Os componentes maioritários têm bastante influência sobre esses efeitos antibacterianos, reagindo sinergicamente entre eles e potenciando os efeitos. O que se encontra em maior quantidade é o sabineno, no entanto a maior inibição bacteriana encontrada não foi provocada apenas pelo Sabineno, mas pela interacção entre este composto e os Pinenos (α -pineno e o β -pineno).

O óleo essencial *Schinus molle* poderá ser uma alternativa na área alimentar e na área da saúde, entre outras, para a conservação dos alimentos armazenados ou para protecção contra infecções nosocomiais, por exemplo.

Como vantagens tem as baixas concentrações necessárias para se conseguirem efeitos antibacterianos e não terem sido encontrados quaisquer efeitos tóxicos, de acordo com os artigos pesquisados.

Bibliografia

ABI-Ayada, F. Z., ABI-Ayada, M., Lazzounia, H. A., Rebiahib, S. A., e Bessiere. (2011) Antibacterial activity of essential oil extracted from leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters from Algeria flora, *J. Microbiol. Biotech. Res.* , 1 (1): 1-6.

Adorjan, B., e Buchbauer, G. (2010) Biological properties of essential oils: an updated review, *Flavour and Fragrance Journal* 25, 407-426.

Alexopoulos, Kimbaris, C., Plessas, S., Mantzourani, I., Theodoridou, I., Stavropoulou, E., Polissiou, M. G., e Bezirtzoglou, E. (2011) Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Anaerobe*. Elsevier Ltd 1-4.

Alves, E. G., Vinholis, A. H. C., Casemiro, L. A., Furtado, N. A. J. C., Silva, M. L. A. E., Cunha, W. R., e Martins, C. H. G. (2008) Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras, *Química Nova* 31, 1224-1229.

Atti dos Santos, A. C., Rossato, M., Agostini, F., Lermen de Almeida, M., Pauletti, G. F., Serafini, L. A., Moyna, P., e Dellacassa, E. (2008) Caracterização química de populações de *Schinus molle* L. do Rio Grande do Sul, *Revista Brasileira de Biociências* 5, pg-1014.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., e Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils - a review, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 46, 446-75.

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, *Methods*.

Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review, *International journal of food microbiology* 94, 223-53.

Chung, Kyong-hwan, Kang, K., Kim, J., e Lee, K. (2007) Antibacterial Activity of Essential Oils on the Growth of *Staphylococcus aureus* and Measurement of their Binding Interaction Using Optical Biosensor, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17 (11), 1848-1855.

Cowan, M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents, *Clinical microbiology reviews* 12, 564-82.

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.

Duarte, M. C. T., Leme, Delarmelina, C., Figueira, G. M., Sartoratto, A., e Rehder, V. L. G. (2006) Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec Escherichia coli, *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.8, p.139-143.

DUARTE, M. R., TOLEDO, M. G., e OLIVEIRA, R. L. B. (2007) Diagnose morfoanatómica de aroeira (Schinus terebinthifolius Raddi, Anacardiaceae), *Visão Acadêmica* 7.

Ferraro, M. J., Wikler, M. A., Craig, W. A., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Hecht, D. W., Hindler, J., Reller, L. B., Sheldon, A. T., Swenson, J. M., Tenover, F. C., Testa, R. T., e Weinstein, M. P. (2003) Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico : *Norma Aprovada - Sexta Edição*, NCCLS, M7-A6, Vol.23, No. 2.

Hammer, K., Carson, C. F., e Riley, T. V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of applied microbiology* 86, 985-90.

Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., e Wright, A. von. (1998) Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3590-3595.

Hili, P., Evans, C. S., and Veness, R. G. (1997) Antimicrobial action of essential oils : the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil, *Letters in Applied Microbiology*, 269-275.

Holley, R., e Patel, D. (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials, *Food Microbiology* 22, 273-292.

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.

Marzouk, M. S., Moharram, F., Haggag, E. G., Ibrahim, M. T., e Badary, O. (2006) Antioxidant flavonol glycosides from *Schinus molle*., *Phytotherapy research : PTR* 20, 200-5.

Mejía-Díaz, L. A., e Rutiaga-Quiñones, J. G., (2008) Chemical composition of *Schinus molle* L. wood and kraft pulping process, *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 7, No. 2, 145-149.

Montoro, E., Lemus, D., Echemendia, M., Martin, A., Portaels, F., e Palomino, J. C. (2005) Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 55, 500-5.

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

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., e Pognan, F. (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, *European journal of biochemistry / FEBS* 267, 5421-6.

Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., Simons, A. (2009) Agroforestry Database: a tree reference and selection guide, version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>).

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 18, 301-307.

Padín, E. V., Pose, G. N., e Pollio, M. L. (2007) Antibacterial activity of Oleoresin from *Aguaribay (Schinus molle L.)*, *Journal of Food Technology* 5(1), 5-8.

Palomino, J.-carlos, Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., e Swings, J. (2002) Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Society* 46, 2720-2722.

Rhouma, A., Daoud, H. B., Ghanmi, S., Salah, H., Romdhane, M., e Demak, M. (2009) Antimicrobial activities of leaf extracts of *Pistacia* and *Schinus* species against some plant pathogenic fungi and bacteria, *Journal of Plant Pathology* 91, 339-345.

Salazar-Aranda, R., Pérez-López, L. A., López-Arroyo, J., Alanís-Garza, B. A., e Waksman de Torres, N. (2009) Antimicrobial and Antioxidant Activities of Plants from Northeast of Mexico., *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 4-9.

Silva, B., Silva, T., Franco, E. S., Rabelo, S., Lima, E. R., Mota, R., Câmara, C. G. D., Pontes-Filho, N. T., e Lima-Filho, J. V. (2010) Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi), *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 158-163.

Silva, L. V., Constancio, S.C. M., Mendes, M.F., e Coelho, G.L.V. (2005) Extração do óleo essencial da pimenta rosa (*Schinus molle*) usando hidrodestilação e soxhlet, *VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, 1-7.

Sousa, J.C. (2006) Manual de Antibióticos Antibacterianos. *Universidade Fernando Pessoa*, 2ª Edição, Pag. 201-204 e 394-398.

Todar, K. (2004), *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. www.textbookofbacteriology.net, Capítulos 1, 17, 23 e 25.

Anexos

Anexo I

→ Óleo essencial de *Schinus molle* inteiro

Tabela 7.1 - Teste de Levene para igualdade de Variâncias^a

Variável Dependente: Halos de inibição (mm)

F	df1	df2	Sig.
8,614	20	105	,000

Testa a hipótese nula que diz que a variância do erro da variável dependente é igual entre grupos.

a. Intersecção + Estirpe + Diluição + Estirpe * Diluição

Tabela 7.2 - Teste de efeitos entre grupos.

Variável dependente: Halos de inibição (mm)

Parâmetro	Soma dos quadrados tipo III	df	Quadrado da média	F	Sig.
Modelo corrigido	10373,206 ^a	20	518,660	2635,129	,000
Intercepção	21190,127	1	21190,127	107659,516	,000
Estirpe	3950,540	2	1975,270	10035,645	,000
Diluição	5395,873	6	899,312	4569,086	,000
Estirpe * Diluição	1026,794	12	85,566	434,731	,000
Erro	20,667	105	,197		
Total	31584,000	126			
Total Corrigido	10393,873	125			

a. R quadrado = 0,998 (R Squared Ajustado = 0,998)

Verifica-se aqui que todos os valores são significantes ($p < 0.05$), ou seja, tanto as diluições como os extractos do óleo afectam o diâmetro dos Halos de inibição. No caso da interacção entre os dois factores conclui-se que os factores estirpe e diluição são dependentes entre si ($p < 0,05$).

Como não há indicação de qual diluição ou estirpe afecta mais a inibição bacteriana, é necessário efectuar-se um teste *post hoc*.

Por múltiplas comparações e efectuando o teste de Tukey, obtêm-se os seguintes resultados:

Tabela 7.3 - Comparação entre os grupos das três estirpes.

(I) Estirpe	(J) Estirpe	Diferença de médias (I-J)	Erro padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
S. aureus	E. coli	10,4762*	,09681	,000	10,2460	10,7064
	P. aeruginosa	12,9048*	,09681	,000	12,6746	13,1349
E. coli	S. aureus	-10,4762*	,09681	,000	-10,7064	-10,2460
	P. aeruginosa	2,4286*	,09681	,000	2,1984	2,6587
P. aeruginosa	S. aureus	-12,9048*	,09681	,000	-13,1349	-12,6746
	E. coli	-2,4286*	,09681	,000	-2,6587	-2,1984

Baseado em médias observadas.

O termo erro refere-se ao Quadrado da média (Erro) = 0,197

*A diferença de médias é significativa no valor de 0,05

Pode-se verificar que todas as estirpes são estatisticamente significantes, pois o valor- $p < 0,05$.

Anexo II

→ Componentes do óleo essencial de *Schinus molle* - *Staphylococcus aureus*

Tabela 7.4 - Teste de Levene para igualdade de Variâncias^a

Variável Dependente: Halos de inibição (mm)

F	df1	df2	Sig.
,534	17	90	,929

Testa a hipótese nula que diz que a variância do erro da variável dependente é igual entre grupos.

b. Intercepção + Diluições + Extractos + Diluições * Extractos

Tabela 7.5 - Teste de efeitos entre grupos.

Variável dependente: Halos de inibição (mm)

Parâmetro	Soma dos quadrados tipo III	df	Quadrado da média	F	Sig.
Modelo corrigido	3551,380 ^a	17	208,905	416,268	,000
Intercepção	33320,454	1	33320,454	66395,000	,000
Diluições	1792,574	2	896,287	1785,959	,000
Extractos	1558,824	5	311,765	621,229	,000
Diluições * Extractos	199,981	10	19,998	39,849	,000
Erro	45,167	90	,502		
Total	36917,000	108			
Total Corrigido	3596,546	107			

a. R quadrado = 0,987 (R Squared Ajustado = 0,985)

Verifica-se aqui que todos os valores são significantes (<0.05), ou seja, tanto as diluições como os extractos do óleo afectam o diâmetro dos Halos de inibição. No caso da interacção entre os dois factores conclui-se que os factores extracto e diluição são dependentes entre si ($p < 0,05$).

Nesta tabela não há indicação de qual diluição ou extracto afecta mais a inibição bacteriana. Sendo assim, é necessário efectuar-se um teste *post hoc*.

Por múltiplas comparações e efectuando o teste de Tukey, obtêm-se os seguintes resultados:

Tabela 7.6 - Comparação entre os grupos das diluições.

(I) Diluições	(J) Diluições	Diferença de médias (I-J)	Erro padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
90 mg/ml	1:2	5,69*	,167	,000	5,30	6,09
	1:4	9,94*	,167	,000	9,55	10,34
1:2	90 mg/ml	-5,69*	,167	,000	-6,09	-5,30
	1:4	4,25*	,167	,000	3,85	4,65
1:4	90 mg/ml	-9,94*	,167	,000	-10,34	-9,55
	1:2	-4,25*	,167	,000	-4,65	-3,85

Baseado em médias observadas.

O termo erro refere-se ao Quadrado da média (Erro) = 0,502

*A diferença de médias é significativa no valor de 0,05

Pode-se verificar que todas as diluições são estatisticamente significantes, pois o valor- $p < 0,05$.

Tabela 7.7 - Comparação entre os vários extratos, em relação ao *Staphylococcus aureus*.

(I) Extractos	(J) Extractos	Diferença de médias (I-J)	Erro padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
7	12	5,72*	,236	,000	5,03	6,41
	13	7,17*	,236	,000	6,48	7,85
	51	13,00*	,236	,000	12,31	13,69
	52	7,33*	,236	,000	6,65	8,02
	53	7,39*	,236	,000	6,70	8,08
12	7	-5,72*	,236	,000	-6,41	-5,03
	13	1,44*	,236	,000	,76	2,13
	51	7,28*	,236	,000	6,59	7,97
	52	1,61*	,236	,000	,92	2,30
	53	1,67*	,236	,000	,98	2,35
13	7	-7,17*	,236	,000	-7,85	-6,48
	12	-1,44*	,236	,000	-2,13	-,76
	51	5,83*	,236	,000	5,15	6,52
	52	,17	,236	,981	-,52	,85
	53	,22	,236	,935	-,47	,91
51	7	-13,00*	,236	,000	-13,69	-12,31
	12	-7,28*	,236	,000	-7,97	-6,59
	13	-5,83*	,236	,000	-6,52	-5,15
	52	-5,67*	,236	,000	-6,35	-4,98
	53	-5,61*	,236	,000	-6,30	-4,92
52	7	-7,33*	,236	,000	-8,02	-6,65
	12	-1,61*	,236	,000	-2,30	-,92
	13	-,17	,236	,981	-,85	,52
	51	5,67*	,236	,000	4,98	6,35
	53	,06	,236	1,000	-,63	,74
53	7	-7,39*	,236	,000	-8,08	-6,70
	12	-1,67*	,236	,000	-2,35	-,98
	13	-,22	,236	,935	-,91	,47
	51	5,61*	,236	,000	4,92	6,30
	52	-,06	,236	1,000	-,74	,63

Baseado em médias observadas.

O termo erro refere-se ao Quadrado da média (Erro) = 0,502

*A diferença de médias é significante no valor de 0,05

Anexo III

→ Componentes do óleo essencial de *Schinus molle* - *Escherichia coli*

Tabela 7.8 - Teste de Levene para igualdade de Variâncias^a

Variável Dependente: Halos de inibição (mm)

F	df1	df2	Sig.
4,715	17	90	,000

Testa a hipótese nula que diz que a variância do erro da variável dependente é igual entre grupos.

c. Intercepção + Diluições + Extractos + Diluições * Extractos

Tabela 7.9 - Teste de efeitos entre grupos.

Variável dependente: Halos de inibição (mm)

Parâmetro	Soma dos quadrados tipo III	df	Quadrado da média	F	Sig.
Modelo corrigido	1801,380 ^a	17	105,964	400,142	,000
Intercepção	8233,787	1	8233,787	31092,622	,000
Diluições	695,907	2	347,954	1313,951	,000
Extractos	856,602	5	171,320	646,944	,000
Diluições * Extractos	248,870	10	24,887	93,979	,000
Erro	23,833	90	,265		
Total	10059,000	108			
Total Corrigido	1825,213	107			

a. R quadrado = 0,987 (R Squared Ajustado = 0,984)

Verifica-se aqui que todos os valores são significantes (<0.05), ou seja, tanto as diluições como os extractos do óleo afectam o diâmetro dos Halos de inibição. No caso da interacção entre os dois factores conclui-se que os factores extracto e diluição são dependentes entre si ($p < 0,05$).

Nesta tabela não há indicação de qual diluição ou extracto afecta mais a inibição bacteriana. Sendo assim, é necessário efectuar-se um teste *post hoc*.

Por múltiplas comparações e efectuando o teste de Tukey, obtêm-se os seguintes resultados:

Tabela 7.10 - Comparação entre os grupos das diluições.

(I) Diluições	(J) Diluições	Diferença de médias (I-J)	Erro padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
90 mg/ml	1:2	4,25 [*]	,121	,000	3,96	4,54
	1:4	6,06 [*]	,121	,000	5,77	6,34
1:2	90 mg/ml	-4,25 [*]	,121	,000	-4,54	-3,96
	1:4	1,81 [*]	,121	,000	1,52	2,09
1:4	90 mg/ml	-6,06 [*]	,121	,000	-6,34	-5,77
	1:2	-1,81 [*]	,121	,000	-2,09	-1,52

Baseado em médias observadas.

O termo erro refere-se ao Quadrado da média (Erro) = 0,265

*A diferença de médias é significativa no valor de 0,05

Pode-se verificar que todas as diluições são estatisticamente significantes, pois o valor- $p < 0,05$.

Tabela 7.11 - Comparação entre os vários extratos, em relação à *Escherichia coli*.

(I) Extractos	(J) Extractos	Diferença de médias (I-J)	Erro padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
7	12	,28	,172	,588	-,22	,78
	13	2,61*	,172	,000	2,11	3,11
	51	,17	,172	,926	-,33	,67
	52	-5,33*	,172	,000	-5,83	-4,83
	53	-4,44*	,172	,000	-4,94	-3,94
12	7	-,28	,172	,588	-,78	,22
	13	2,33*	,172	,000	1,83	2,83
	51	-,11	,172	,987	-,61	,39
	52	-5,61*	,172	,000	-6,11	-5,11
	53	-4,72*	,172	,000	-5,22	-4,22
13	7	-2,61*	,172	,000	-3,11	-2,11
	12	-2,33*	,172	,000	-2,83	-1,83
	51	-2,44*	,172	,000	-2,94	-1,94
	52	-7,94*	,172	,000	-8,44	-7,44
	53	-7,06*	,172	,000	-7,56	-6,56
51	7	-,17	,172	,926	-,67	,33
	12	,11	,172	,987	-,39	,61
	13	2,44*	,172	,000	1,94	2,94
	52	-5,50*	,172	,000	-6,00	-5,00
	53	-4,61*	,172	,000	-5,11	-4,11
52	7	5,33*	,172	,000	4,83	5,83
	12	5,61*	,172	,000	5,11	6,11
	13	7,94*	,172	,000	7,44	8,44
	51	5,50*	,172	,000	5,00	6,00
	53	,89*	,172	,000	,39	1,39
53	7	4,44*	,172	,000	3,94	4,94
	12	4,72*	,172	,000	4,22	5,22
	13	7,06*	,172	,000	6,56	7,56
	51	4,61*	,172	,000	4,11	5,11
	52	-,89*	,172	,000	-1,39	-,39

Baseado em medias observadas.

O termo erro refere-se ao Quadrado da média (Erro) = 0,265

*A diferença de médias é significativa no valor de 0,05

Anexo IV

→ Componentes do óleo essencial de *Schinus molle* - *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 7.12 - Teste de Levene para igualdade de Variâncias^a

Variável Dependente: Halos de inibição (mm)

F	df1	df2	Sig.
2,217	17	90	,008

Testa a hipótese nula que diz que a variância do erro da variável dependente é igual entre grupos.

d. Intercepção + Diluições + Extractos + Diluições * Extractos

Tabela 7.13 - Teste de efeitos entre grupos.

Variável dependente: Halos de inibição (mm)

Parâmetro	Soma dos quadrados tipo III	df	Quadrado da média	F	Sig.
Modelo corrigido	307,750 ^a	17	18,103	66,501	,000
Intercepção	5940,750	1	5940,750	21823,163	,000
Diluições	236,056	2	118,028	433,571	,000
Extractos	24,750	5	4,950	18,184	,000
Diluições * Extractos	46,944	10	4,694	17,245	,000
Erro	24,500	90	,272		
Total	6273,000	108			
Total Corrigido	332,250	107			

a. R quadrado = 0,926 (R Squared Ajustado = 0,912)

Verifica-se que todos os valores são significantes ($<0,05$), ou seja, tanto as diluições como os extractos do óleo afectam o diâmetro dos Halos de inibição. No caso da interacção entre os dois factores conclui-se que os factores extracto e diluição são dependentes entre si ($p < 0,05$).

Nesta tabela não há indicação de qual diluição ou extracto afecta mais a inibição bacteriana. Sendo assim, é necessário efectuar-se um teste *post hoc*.

Por múltiplas comparações e efectuando o teste de Tukey, obtêm-se os seguintes resultados:

Tabela 7.14 - Comparação entre os grupos das diluições.

(I) Diluições	(J) Diluições	Diferença de médias (I-J)	Erro padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
90 mg/ml	1:2	2,47*	,123	,000	2,18	2,77
	1:4	3,53*	,123	,000	3,23	3,82
1:2	90 mg/ml	-2,47*	,123	,000	-2,77	-2,18
	1:4	1,06*	,123	,000	,76	1,35
1:4	90 mg/ml	-3,53*	,123	,000	-3,82	-3,23
	1:2	-1,06*	,123	,000	-1,35	-,76

Baseado em médias observadas.

O termo erro refere-se ao Quadrado da média (Erro) = 0,272

*A diferença de médias é significativa no valor de 0,05

Pode-se verificar que todas as diluições são estatisticamente significantes, pois o valor- $p < 0,05$.

Tabela 7.15 - Comparação entre os vários extratos, em relação à *Pseudomonas aeruginosa*.

(I) Extractos	(J) Extractos	Diferença de médias (I-J)	Erro padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
7	12	-,56*	,174	,023	-1,06	-,05
	13	-,72*	,174	,001	-1,23	-,22
	51	,44	,174	,119	-,06	,95
	52	-,83*	,174	,000	-1,34	-,33
	53	-,83*	,174	,000	-1,34	-,33
12	7	,56*	,174	,023	,05	1,06
	13	-,17	,174	,930	-,67	,34
	51	1,00*	,174	,000	,49	1,51
	52	-,28	,174	,603	-,78	,23
	53	-,28	,174	,603	-,78	,23
13	7	,72*	,174	,001	,22	1,23
	12	,17	,174	,930	-,34	,67
	51	1,17*	,174	,000	,66	1,67
	52	-,11	,174	,988	-,62	,40
	53	-,11	,174	,988	-,62	,40
51	7	-,44	,174	,119	-,95	,06
	12	-1,00*	,174	,000	-1,51	-,49
	13	-1,17*	,174	,000	-1,67	-,66
	52	-1,28*	,174	,000	-1,78	-,77
	53	-1,28*	,174	,000	-1,78	-,77
52	7	,83*	,174	,000	,33	1,34
	12	,28	,174	,603	-,23	,78
	13	,11	,174	,988	-,40	,62
	51	1,28*	,174	,000	,77	1,78
	53	,00	,174	1,000	-,51	,51
53	7	,83*	,174	,000	,33	1,34
	12	,28	,174	,603	-,23	,78
	13	,11	,174	,988	-,40	,62
	51	1,28*	,174	,000	,77	1,78
	52	,00	,174	1,000	-,51	,51

Baseado em médias observadas.

O termo erro refere-se ao Quadrado da média (Erro) = 0,272

*A diferença de médias é significativa no valor de 0,05