



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Estudo da atividade antibacteriana da Carvona e seus derivados

Patrícia Raquel Nascimento Pinto

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

Orientador: Professor Doutor Pedro Miguel de Mendonça Rocha
Co-orientador: Professor Doutor Jesus Miguel Lopez Rodilla

Covilhã, Outubro de 2014

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida.

Aos meus pais, António Pinto e Rosa Pinto.

Às minhas irmãs, Sara Pinto e Cláudia Pinto.

Que tudo fizeram para que eu chegasse até ao final desta etapa tão importante da minha vida.

Agradecimentos

A realização deste trabalho exigiu de mim um grande esforço e dedicação mas o percurso percorrido até aqui não teria sido o mesmo se não tivesse a ajuda, a generosidade, a boa vontade, a amizade, e camaradagem de muitas pessoas. É com emoção que escrevo estas palavras de agradecimento, mas no fim de todo o empenho e dedicação não poderei deixar de agradecer a quem tudo fez para isto se tornar possível.

Em primeiro lugar, o meu enorme e especial agradecimento dirige-se aos meus pais e irmãs. Aos meus pais António Pinto e Rosa Madeira, pois sem a vossa presença, luta e esforço diário para que nada nos faltasse, isto não seria possível. Obrigada por me terem dado esta oportunidade de prosseguir Mestrado. Obrigada por estarem sempre comigo. Hoje sou a pessoa que sou, e a vós o devo. Fica aqui o meu Bem-Haja por todo o vosso apoio, sinceridade, lealdade e por tudo o que passaram para me poderem ver licenciada. Quero-vos sempre a meu lado. Às minhas irmãs Sara Pinto e Cláudia Pinto, por ao longo da minha vida e nesta etapa tão importante, nunca me deixarem só. Agradeço todo o apoio, força, carinho e amizade que existe entre nós. Agradeço-vos por serem as pessoas que são, com quem aprendo, cresço e conto seja em que momento, hora ou altura for. Jamais vos quero longe de mim. Adoro-vos.

Agradeço também ao resto da minha família, que de uma forma ou outra sempre estiveram presentes.

Agradeço ao orientador do projeto, Professor Pedro Rocha, por toda a orientação, disponibilidade de espaço no seu laboratório para a execução do projeto, pela responsabilidade, boa disposição e por sempre me ter ajudado, aconselhado e transmitido todo o conhecimento acerca do assunto estudado. Também ao Professor Rodilla, pela transmissão de conhecimentos, sabedoria e profissionalismo com que sempre me ajudou e disponibilizou muita da informação prestavelmente necessária à realização do projeto.

Sem nunca esquecer os colegas do laboratório BR - Lab. Ambiental e Alimentar Lda, que sempre se mostraram disponíveis para me ajudar no que fosse preciso, pela boa disposição e pelos bons momentos de convivência. Obrigado a todos.

Também o meu Obrigado aos colegas do laboratório de Produtos Naturais da Universidade da Beira Interior, por toda a ajuda e bons momentos passados.

Aos amigos que sempre estiveram comigo, me acompanharam e com eles desfrutei dos melhores momentos da vida, amigos desde o Externato que são essenciais na minha vida e que perto ou longe sempre estiveram disponíveis para mim, sem deixarem de ser o que eram e sem nunca perdermos o que nos liga, a Amizade.

Aos amigos que tenho a partir do momento em que entrei para a Universidade da Beira Interior, a melhor fase da minha vida, agradeço todos os momentos proporcionados desde os menos bons até aos melhores. Agradeço a todas as pessoas que neste percurso académico fui conhecendo e ganharam um especial lugar no meu coração pelas pessoas que são, pela amizade demonstrada e pelo companheirismo ao longo de todo o tempo. Vocês sabem quem são.

Tenho um especial agradecimento, também, ao Núcleo UBIQuímica que após dois mandatos, sinto-me gratificada por todo o trabalho realizado, pela luta constante dos nossos objetivos e por toda a aprendizagem enquanto equipa. Foi também nesta fase que conheci pessoas espetaculares das quais chamo e considero amigos.

Por fim, e não o menos importante, muito pelo contrário, o meu agradecimento ao meu namorado Tiago Abrantes. És das melhores pessoas que conheci neste percurso. Obrigado pelo apoio incondicional em todas as etapas, derrotas e vitórias pelas quais passei, pelo carinho, afeto, companheirismo e pela capacidade de lidares comigo mesmo quando não estou nos melhores dias. A ti te agradeço pelo namorado, companheiro e amigo que és, por todos os momentos lindos que me proporcionas e pela felicidade que me fazes sentir a cada dia e ocasião. Obrigado.

Um BEM-HAJA muito especial a todos.

“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira como respondemos ao desafio. Somos combatentes idealistas, mas plenamente conscientes. Porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as coisas; só nos obriga a sermos conscientes. Problemas para vencer, liberdade para provar. E enquanto acreditarmos no nosso sonho, nada é por acaso”

- Henfil -

Resumo

Os conhecimentos acerca das plantas medicinais e da sua utilização, têm vindo a desenvolver-se de forma gradual desde a antiguidade até aos nossos dias. Os óleos essenciais são designados como misturas naturais e complexas de substâncias voláteis, responsáveis pela fragância de muitas espécies devido ao odor forte que os caracteriza. Apresentam baixa solubilidade em água e têm uma aparência oleosa à temperatura ambiente. Os óleos essenciais são formados em plantas aromáticas, obtidos nas folhas, flores, frutos, sementes, raízes ou caules das plantas como metabolitos secundários. Na sua constituição podem apresentar maioritariamente monoterpenos e sesquiterpenos. 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 carvona é um exemplo de óleo essencial. É uma cetona pertencente ao grupo dos monoterpenos com propriedades odoríferas, sendo os seus derivados largamente empregues na indústria farmacêutica e alimentar. Estudos com plantas e óleos essenciais contendo este monoterpeno na sua constituição, têm demonstrado efeitos no sistema nervoso central, anticonvulsante, atividade antibacteriana e atividade citotóxica para células cancerígenas. É encontrada na Natureza na forma de dois isómeros: (+)-carvona e a (-)-carvona. A (-)-carvona é extraída da hortelã (*Mentha spicata*), sendo o seu maior constituinte. Já a (+)-carvona é o maior constituinte de *Carum carvi* L. Atualmente, existem diversos métodos de *screening* para definir se o extrato de uma determinada planta possui atividade antimicrobiana. Os dois métodos mais utilizados são os de difusão em agar e de diluição em caldo.

Este trabalho consistiu em realizar reações de oxidação de cetonas com o catalisador HT de MgAl com uma mistura de H₂O₂ (30%)/Benzonitrilo a partir da R-(-)-carvona ou *p-mentha-6,8-dien-2-one(-)-carvone*, para obtenção dos principais produtos de oxidação e epoxidação, 7,8-epoxicarvona e 1,6,7,8-diepoxicarvona, para posterior estudo de atividade antibacteriana. Utilizou-se 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 em bruto e suas diluições tem efeitos antibacterianos fortes sobre bactérias Gram-positivas e mais fracos sobre as bactérias Gram-negativas. Já a R-(-)-carvona e os seus derivados não apresentaram qualquer atividade na concentração de 0,5 mg/mL.

Posteriormente efetuaram-se ainda o método de difusão em agar pela técnica de poço e o método dos vapores para a sulfona 7 e 8 (compostos de síntese orgânica quimioterápicos).

Palavras-chave

Óleo essencial, carvona, atividade antibacteriana, Concentração mínima inibitória, concentração mínima bactericida, sulfona.

Abstract

The knowledge about medicinal plants and their use, have been develop gradually from antiquity to the present day. Essential oils are classified as natural and complex mixtures of volatile substances responsible for the fragrance of many species, because of the strong odor which characterizes them. Have low solubility in water and have an oily appearance at room temperature. Essential oils are composed of aromatic plants, obtained from the leaves, flowers, fruits, seeds, roots or stems of the plant as secondary metabolites. In its present constitution can mostly monoterpenes and sesquiterpenes. May contain about 20 to 60 parts in very different concentrations they are characterized by two or three majority at very high concentrations (20-70%) components. Typically, the major components determine the biological properties of essential oils. This is an example of carvone essential oil. It belongs to a ketone group with odor properties of monoterpenes, and their derivatives widely employed in pharmaceutical and food industry. Studies in plants and this monoterpene containing essential oil in its composition, have demonstrated effects on the central nervous system anticonvulsant, antibacterial activity and cytotoxic activity to cancer cells. It is found in nature in the form of two isomers: (+)-carvone and (-)-carvone. The (-)-carvone is extracted from peppermint (*Mentha spicata*), and its major constituent. Since the (+)-carvone is the major constituent of *Carum carvi L.* Currently, there are several screening methods to determine whether the extract of a particular plant has antimicrobial activity. The two most common methods are the agar diffusion and broth dilution.

This work was to carry out the oxidation of ketones with MgAl HT catalyst with a mixture of H₂O₂ (30%)/Benzonitrile from R-(-)- carvone or *p-mentha-6,8-dien-2-one(-)-carvone*, to obtain the main products of oxidation and epoxidation, 7,8-epoxycarvone and 1,6,7,8-diepoxycarvone for further study of antibacterial activity. We used the method of diffusion in agar with cylindrical cavities (wells) to determine the inhibition zones, the macrodilution method for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (CMB) and the assay plate for determining the effect of steam. The strains studied were: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. According to the results, the bulk crude oil and dilutions thereof has strong antimicrobial effects on Gram-positive bacteria and weaker on the Gram-negative bacteria. Already the R (-)-carvone and its derivatives showed no activity at 0.5 mg/mL.

Subsequently effected even the method by agar diffusion technique well and the method of vapor to the sulfone 7 and 8 (chemotherapeutic compounds organic synthesis).

Keywords

Essential oil, carvone, antibacterial activity, minimum inhibitory concentration, minimal bactericidal concentration, sulfone.

Índice

1. Introdução	2
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. Microbiologia	6
2.1.1. Bacteriologia	8
2.1.2. Célula Procariota	8
2.1.2.1. Diferença entre bactérias Gram-positivo e Gram-negativo	10
2.2. Microrganismos	12
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.2.2. <i>Escherichia coli</i>	15
2.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.3. Agentes Antimicrobianos e os seus efeitos no crescimento	19
2.3.1. Antimicrobiano Quimioterápico	20
2.3.1.1. Sulfona	21
2.4. Óleos Essenciais e o seu uso corrente	24
2.4.1. Composição Química dos Óleos Essenciais	25
2.4.2. Terpenos	26
2.4.2.1. Monoterpenos	27
2.4.2.2. Sesquiterpenos	29
2.4.2.3. Compostos aromáticos	30
2.4.3. Óleo essencial- Carvona	31
2.5. Actividade antibacteriana	36
2.5.1. Modo de ação antibacteriana	37
2.6. Sinergismos e antagonismo entre componentes dos óleos essenciais	38
2.7. Métodos para Avaliação da atividade antibacteriana	39
2.7.1. Métodos de difusão em agar	41
2.7.1.1. Teste de difusão em disco de papel	42
2.7.1.2. Cilindros de aço inoxidável	43
2.7.1.3. Perfuração em agar (poço)	43
2.7.2. Recursos a utilizar para melhorar a leitura do diâmetro dos halos nos métodos de difusão em agar	43
2.7.3. Difusão em caldo	43
2.7.3.1. Macrodiluição	44
2.7.3.2. Microdiluição	45
2.7.4. Método do efeito de Vapor do óleo essencial	45
2.7.5. Teste da Resazurina	46
2.8. Fatores que interferem nos métodos de avaliação antibacteriana	47

2.9. Antibióticos Antibacterianos	50
2.9.1. Aminoglicosídeos	50
2.9.1.1. Antibiótico Gentamicina	51
2.9.2. Antibióticos β -lactâmicos	52
2.9.2.1. Antibiótico Penicilina G	54
2.10. Resistência bacteriana aos antibióticos	55
3. Objetivo	56
4. Materiais e Métodos	58
4.1. Materiais e equipamento	58
4.2. Técnicas Cromatográficas	59
4.3. Reações de síntese de Oxidação e Epoxidação de Cetonas com HT de Mg/Al e uma mistura de H ₂ O ₂ (30%)/Benzonitrilo	60
4.3.1. Reação P1	61
4.3.2. Reação P2	61
4.3.3. Reação P3	62
4.3.4. Reação P5	62
4.3.5. Reação P6	63
4.4. Extração dos produtos de Reação	63
4.5. Separação dos componentes	63
4.6. Caracterização dos produtos	64
4.7. Cálculo do Rendimento da reação	64
4.8. Compostos para Avaliação de Actividade Antimicrobiana	64
4.9. Meios de Cultura	67
4.10. Microrganismos	67
4.11. Preparação das Primeiras culturas	67
4.12. Preparação da Densidade do inóculo	68
4.12.1. Confirmação da Concentração do Inóculo	68
4.13. Avaliação da Actividade Antibacteriana	69
4.13.1. Procedimento do método de difusão em ágar pela técnica de difusão em poço	69
4.13.2. Procedimento do método de Vapores	70
4.13.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória e da Concentração mínima bactericida pela técnica de macrodiluição em caldo	71
4.14. Análise estatística	72
5. Resultados e Discussão	74
5.1. Oxidação de cetonas com HT de Mg/Al e uma mistura de H ₂ O ₂ (30%)/Benzonitrilo:	75
5.1.1. Reações e rendimento dos produtos a partir da R-(-)-carvona	75
5.1.2. Reações e rendimento dos produtos a partir da 7,8-Epoxicarvona	80
5.2. Análise do espectro do óleo essencial de partida, a Carvona	81

5.3. Análise do espectro do produto 7,8-Epoxicarvona	83
5.4. Análise do espectro do produto 1,6,7,8-Diepoxicarvona	86
5.5. Atividade Antibacteriana dos diferentes compostos	88
5.5.1. Halos de inibição pelo método de difusão em agar e pelo método dos Vapores	91
5.6. Halos de inibição pelo método de difusão em agar e Vapor do Controlo negativos e dos Controlos Positivos	92
5.7. Halos de inibição pelo método de difusão em agar e Vapor dos compostos denominados Sulfona 7 e 8	94
5.8. Halos de inibição pelo método de difusão em agar e Vapor dos produtos da reação de síntese de Oxidação e Epoxidação de Cetonas com HT de MG/Al e uma mistura de H ₂ O ₂ (30%)/Benzonitrilo	96
5.9. Halos de inibição pelo método de difusão em agar e Vapor do óleo essencial em bruto, a carvona, e das suas diluições 1:2, 1:4 e 1:8.	96
5.9.1. CMI e CMB do óleo em bruto da carvona frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	98
5.9.2. Comparação entre os halos de inibição, CMI e CMB do óleo essencial em bruto	100
5.10. Modo de Ação bacteriana	100
6. Considerações finais	102
7. Bibliografia	106
8. Apêndices	112

Lista de Figuras

Figura 2.1: Comparação da estrutura de uma bactéria Gram-positiva e Gram-Negativa.

Figura 2.2: Composição da parede celular de uma bactéria Gram-Positiva,

Figura 2.3: Composição de uma bactéria Gram-Negativa.

Figura 2.4: *Staphylococcus aureus*.

Figura 2.5: *Escherichia coli*.

Figura 2.6: *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 2.7: Estruturas químicas de alguns componentes dos óleos essenciais, terpenos e terpenóides.

Figura 2.8: Estruturas químicas de alguns componentes dos óleos essenciais- compostos aromáticos.

Figura 2.9: Estruturas moleculares dos diferentes isômeros da Carvona; R-Carvona e S-Carvona.

Figura 2.10: Produtos que se podem obter da reação da redução da Carvona, com diferentes reagentes.

Figura 2.11: Produtos que se podem obter da reação da oxidação da Carvona, com diferentes reagentes.

Figura 2.12: Exemplo de epoxidação, através da reação de um alceno e um peroxiácido.

Figura 2.13: Mecanismo do peroxiácido com um alceno.

Figura 2.14: Produtos da carvona obtidos através da reação com os oxidantes MCPBA e H₂O₂/OH⁻.

Figura 2.15: Mecanismo do uso do catalisador Hidrotalcita.

Figura 2.16: Mecanismos na célula bacteriana dos sítios de ação 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 protões.

Figura 2.17: Estruturas da Resazurina (forma oxidada) e Resorufina (forma reduzida).

Figura 2.18: Composição química e estrutura da Gentamicina.

Figura 2.19: Estrutura química dos principais grupos beta-lactâmicos.

Figura 2.20: Estrutura química do antibiótico Penicilina G.

Figura 4.1: Cromatografia em camada fina- Câmara de cromatografia e a placa de sílica gel.

Figura 4.2: Aparelho usado no trabalho onde se realiza a cromatografia em coluna.

Figura 4.3: Placa de agitação e aquecimento onde decorreram as reações de síntese.

Figura 4.4: Esquema do procedimento para o método de macrodiluição CMI.

Figura 5.1: Atribuição da numeração da (R)-(-)-Carvona (a.); 7,8-Epoxicarvona (b.) e (1,6),(7,8)-Diepoxicarvona (c.)

Figura 5.2: Estrutura molecular da R-(-)-carvona.

Figura 5.3: Estrutura molecular da 7,8-epoxicarvona.

Figura 5.4: Estrutura molecular da 7,8-epoxicarvona.

Figura 5.5: Estrutura molecular da 1,6,7,8-epoxicarvona.

Figura 5.6: Estrutura molecular da 1,6,7,8-epoxicarvona.

Figura 5.7: Estrutura molecular da 1,6,7,8-epoxicarvona.

Figura 5.8: Espectro de RMN de próton da R-(-)-carvona.

Figura 5.9: Espectro de RMN de Carbono 13 da R-(-)-carvona

Figura 5.10: Estrutura da R-(-)-carvona, a partir dos RMN de ^1H e ^{13}C .

Figura 5.11: Espectro de RMN de próton da 7,8-epoxicarvona.

Figura 5.12: Espectro de RMN de carbono 13 da 7,8-epoxicarvona

Figura 5.13: Estrutura da 7,8-epoxicarvona, a partir dos RMN de ^1H e ^{13}C .

Figura 5.15: Espectro de RMN de carbono 13 da 1,6,7,8-diepoxicarvona

Figura 5.16: Estrutura da 1,6,7,8-Diepoxicarvona, a partir dos RMN de ^1H e ^{13}C .

Figura 5.14: Espectro de RMN de próton da 1,6,7,8-diepoxicarvona.

Figura 5.15: Espectro de RMN de carbono 13 da 1,6,7,8-diepoxicarvona.

Figura 5.16: Estrutura da 1,6,7,8-Diepoxicarvona, a partir dos RMN de ^1H e ^{13}C .

Figura 5.17: Imagens de um microrganismo inibido pelo composto a ser testado, observando-se o halo de inibição em volta do poço, na primeira imagem. NA segunda imagem, apenas se visualiza o poço sem qualquer inibição em volta deste.

Figura 5.18: Imagens de um microrganismo inibido pelo composto a ser testado, observando-se o halo de inibição no meio de cultura, devido aos vapores libertados do composto

Figura 5.19: Realização dos testes de macrodiluição: CMI e CMB.

Lista de Tabelas

Tabela 4.1: Condições iniciais da reação da oxidação da carvona com a informação molecular de cada composto.

Tabela 4.2: Condições iniciais da reação da oxidação da R-(-)-carvona com a informação molecular de cada composto.

Tabela 4.3: Condições iniciais da reação da oxidação da R-(-)-carvona com a informação molecular de cada composto.

Tabela 4.4: Condições iniciais da reação da epoxidação da 7,8-epoxicarvona com a informação molecular de cada composto.

Tabela 4.5: Condições iniciais da reação da epoxidação da 8,9-epoxicarvona com a informação molecular de cada composto.

Tabela 5.1: Sinais de RMN de ^1H da R-(-)-Carvona.

Tabela 5.2: Sinais de RMN de ^{13}C da R-(-)-Carvona

Tabela 5.3: Sinais de RMN de ^1H da 7,8-epoxicarvona.

Tabela 5.4: Sinais de RMN de ^{13}C da 7,8-epoxicarvona

Tabela 5.5: Sinais de RMN de ^1H da 1,6,7,8-diepoxicarvona

Tabela 5.6: Sinais de RMN de ^{13}C da 1,6,7,8-diepoxicarvona

Tabela 5.7: Critérios de classificação dos halos de inibição.

Tabela 5.8: Resultados da média dos halos de inibição em mm, dos controlos negativo e positivo frente às 3 estirpes.

Tabela 5.9: Resultados da média dos halos de inibição em mm, dos controlos negativos e positivos frente às 3 estirpes.

Tabela 5.10: Resultados da média dos halos de inibição em mm, das sulfonas 7 e 8 frente às 3 estirpes.

Tabela 5.11: Resultados da média dos halos de inibição em mm, das sulfonas 7 e 8 frente às 3 estirpes.

Tabela 5.12: Resultados da média dos halos de inibição em mm, das sulfonas 7 e 8 frente às 3 estirpes.

Tabela 5.13: Resultados da média dos halos de inibição em mm, dos produtos de síntese frente às 3 estirpes.

Tabela 5.14: Resultados da média dos halos de inibição em mm, dos produtos de síntese frente às 3 estirpes.

Tabela 5.15: Resultados da média dos halos de inibição em mm, obtidos no método de difusão por poço de cada composto frente às estirpes Gram-positiva e Gram-negativas.

Tabela 5.16: Resultados da média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm) \pm o desvio padrão (Teste de Tukey, a 5% de probabilidade)

Tabela 5.17: Resultados da média dos halos de inibição obtidos no método de vapores de cada composto frente às estirpes Gram-positiva e Gram-negativas.

Tabela 5.18: CMI e CMB observadas e reais, e concentrações de óleo essencial de R-(-)-Carvona.

Tabela 5.19: Média da Contagem de colónias visualizadas nos tubos de CMI testando o procedimento de CMB para se obter uma certeza da realidade.

Tabela 5.20: Comparação dos halos de inibição obtidos pela técnica de perfuração em agar com os resultados de macrodiluição na determinação de CMI e CMB, para as estirpes *E.coli* e *S.aureus*.

Tabela 8.1: Teste de Levene para igualdade de Variâncias para *S.aureus*.

Tabela 8.2: Teste de efeitos entre grupos para *S.aureus*.

Tabela 8.3: Comparação entre os grupos das diluições para *S.aureus*.

Tabela 8.4: Comparação entre os grupos dos extratos para *S.aureus*.

Tabela 8.5: Teste de Levene para igualdade de Variâncias para *E.coli*.

Tabela 8.6: Teste de efeitos entre grupos para *E.coli*.

Tabela 8.7: Comparação entre os grupos das diluições para *E.coli*.

Tabela 8.8: Comparação entre os grupos dos extratos para *E.coli*.

Lista de Acrónimos

ATCC	American Type Culture Collection
C +	Controlo Positivo
C -	-controlo negativo
CCF	Cromatografia em camada fina
CMB	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentração mínima inibitória
DDS	Diaminodifenilsulfona
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	Food and Drug Administration
HT	Hidrotalcita
McF	McFarland
MHA	Müller-Hinton Agar
MH2	Muller-Hinton Agar 2
MHB	Müller-Hinton Broth
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PABA	Ácido para-aminobenzóico
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética e Nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sódio
THF	Tetrahidrofurano
TSA	Trypticase soy agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidade Formadora de colónia

CAPITULO 1

1. Introdução

O uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie Humana. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação dos efeitos medicinais que produzem, apesar de nem sempre terem os seus constituintes químicos conhecidos [Siva, 2010]. Uma planta pode conter muitos metabolitos secundários mas apenas os compostos que se encontram em maior concentração são geralmente isolados e estudados. A análise dos compostos constituintes e ativos é uma tarefa muito longa e complexa [Silva, 2010].

Os óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas são utilizados há muitos milhares de anos. Os povos romanos, por exemplo, utilizavam estes óleos em cosméticos e rituais religiosos. Hipócrates conhecido como o pai da Medicina referenciou o uso dessas plantas para a produção de perfumes e para o tratamento de doenças [Silva, 2010].

Diversas pesquisas e experiências farmacológicas têm vindo a confirmar a utilização empírica das plantas e potenciais novos usos terapêuticos, tendo as plantas medicinais conquistado o reconhecimento científico, resultando daqui o desenvolvimento de novos fármacos através da investigação de produtos naturais [Rodrigues, 2010].

Os óleos essenciais são produtos naturais, líquidos, oleosos e voláteis dotados de aroma forte e quase sempre agradável, proveniente do metabolismo secundário [Ehlert *et al*, 2013]. A variedade de propriedades biológicas, conferidas aos óleos essenciais são muitas vezes atribuídas à presença de monoterpenos, que são os seus principais componentes químicos [Gonçalves *et al*, 2010]. O uso dos óleos essenciais na indústria farmacêutica fundamenta-se nas suas propriedades analgésicas, desinfetantes e antissépticas [Ehlert *et al*, 2013].

Os óleos essenciais apresentam atividade antibacteriana contra uma grande variedade de bactérias, incluindo espécies resistentes a antibióticos [Arruda *et al*, 2006].

A carvona (p-mentha-6,8-dien-2-one) é o óleo essencial de partida de todo o meu trabalho prático. Esta, é um monoterpeneo do grupo das cetonas. É o componente maioritário do óleo essencial de diversas plantas medicinais. Entre os terpenos as formas (+)-carvona e (-)-carvona, são provavelmente as mais versáteis. A (-)-carvona é o componente mais ativo do óleo da *Mentha spicata* e é destilada a partir das suas folhas [Souza *et al*, 2013]. É utilizada nas indústrias farmacêuticas e de aromas, em diversos produtos, antisséptico bucal,

condimentos, bebidas, entre outros. Apresenta ainda atividade antisséptica, bactericida e antifúngica [Ehlert *et al*, 2013].

Também a quimioterapia antibacteriana conferiu enormes benefícios para a saúde humana. A quimioterapia é o tratamento de doenças com substâncias químicas. Estas substâncias são denominadas de agentes quimioterápicos. Alguns destes agentes químicos são produzidos por microrganismos e são denominados de antibióticos. Outros são sintetizados em laboratório [Pelczar *et al*, 1996]. Um destes agentes quimioterápicos sintetizados é a Sulfona.

Uma sulfona é um composto químico que contém na sua estrutura um grupo sulfonilo ligado a dois átomos de carbono. A estrutura desta é análoga à das cetonas. O átomo de enxofre une-se aos dois oxigênios por ligações duplas e por ligações simples aos dois hidrocarbonetos substituintes. Os Sulfuretos são muitas vezes o material de partida para sulfonas por oxidação orgânica, sendo os compostos intermediários os sulfóxidos.

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos é necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes. O estudo de agentes antimicrobianos tem uma enorme abrangência, sendo o ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético [Ostrosky *et al*, 2008].

A volatilidade dos óleos essenciais, a sua insolubilidade em água e complexidade estrutural são algumas das características que têm interferido nos resultados em métodos de investigação *in vitro*. Por isso em testes de suscetibilidade microbiana, deve-se ter em conta a técnica a usar, o meio de cultura, os microrganismos e o composto que se está a testar [Nascimento *et al*, 2007].

Atualmente existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos vegetais e de compostos químicos sintetizados [Ostrosky *et al*, 2008]. Os mais conhecidos incluem o método de difusão em Agar, método de Macrodiluição e microdiluição [Ostrosky *et al*, 2008].

CAPITULO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde há muito tempo que a microbiologia se relaciona com diversas áreas do conhecimento científico, na medida em que lhes vem fornecendo úteis, acessíveis e económicos objetos de estudo, como são os microrganismos, bem como fáceis e reprodutíveis técnicas de pesquisa [Ferreira *et al*, 2010].

Por outro lado, tem também a Microbiologia beneficiado dos avanços registados em outras áreas do saber, as quais lhe têm cedido instrumentos inovadores, aplicáveis ao conhecimento dos microrganismos. Ciências como a Medicina, a Biotecnologia, a Genética, a Ecologia, e indústrias como a farmacêutica e a alimentar, etc., adquiriram muitos dos seus novos conhecimentos e extraordinários avanços por via da Microbiologia, pela utilização que fizeram dos microrganismos como base importante dos seus trabalhos e continuam hoje a fazê-lo, quicá mais ainda que no passado [Ferreira *et al*, 2010].

Outras áreas científicas como a Biologia, a Bioquímica, a Imunologia e a Biologia Molecular contam-se entre as que têm também largamente contribuído com as suas técnicas e úteis “ferramentas” para o estudo dos microrganismos e progresso da Microbiologia [Ferreira *et al*, 2010].

2.1 Microbiologia

A Microbiologia é o estudo dos Organismos microscópicos e das suas atividades. A Microbiologia auxilia a demonstração dos princípios da Biologia, facilitando os estudos de sistemas específicos para a investigação das reações fisiológicas, genéticas e bioquímicas, que são a base da vida [Nogueira, *et al*].

Sendo a Microbiologia uma ciência relativamente recente, dado que apenas foi reconhecida como tal nos meados de século XIX com as importantes experiências de Louis Pasteur e Robert Koch, ela é hoje, no entanto, uma vasta área do saber [Ferreira *et al*, 2010].

O nascimento desta área científica deu-se no momento em que começou a ser possível a observação de seres minúsculos, com o auxílio de instrumentos de ampliação chamados microscópios. Anton Van Leeuwenhoek construiu ao longo da sua vida vários microscópios, a partir dos quais observou, descreveu e desenhou micróbios designando-os animalcules. Verificou também que estes seres quando presentes em infusões, após algum tempo, multiplicavam-se a partir dos pré-existentes [Ferreira *et al*, 2010].

Desde a época de Aristóteles até à Renascentista floresceram teorias que defendiam a geração espontânea, isto é, que os seres vivos mais pequenos nasciam espontaneamente na Natureza ou provinham da matéria orgânica em decomposição [Ferreira *et al*, 2010].

E durante muitos anos, assim foi. Enquanto uns defendiam a teoria acabada de descrever muitos afirmavam que todos os seres vivos tinham progenitores, mesmo até os seres microscópicos existentes nas poeiras [Ferreira *et al*, 2010]. As teorias, as descobertas e o rigor científico de Pasteur na explicação de muitos fenómenos biológicos marcaram o início da moderna Microbiologia. A sua época e as décadas que lhe seguiram, até ao início do século XX, são consideradas a Época de Ouro da Microbiologia, período durante o qual se descobriu a maioria dos agentes microbianos, hoje conhecidos [Ferreira *et al*, 2010]. Também, Robert Koch além de realizar notáveis descobertas no campo da Microbiologia, como a do agente da tuberculose e do carbúnculo, definiu os seus princípios, presentes na transmissão e no isolamento de agentes infecciosos, hoje conhecidos como Postulados de Koch [Ferreira *et al*, 2010].

É verdade que alguns microrganismos provocam grandes e graves malefícios aos seres vivos, mas, sabemos também, desde há muitas décadas que a maioria desempenha um enorme e importante papel na existência e bem-estar da Humanidade, sendo igualmente responsáveis por fenómenos essenciais à vida do nosso planeta [Ferreira *et al*, 2010].

A vastidão do mundo microbiano inclui bactérias, microalgas, fungos e parasitas. Tanto o Homem como todos os outros seres vivos superiores, animais ou plantas, são suscetíveis de serem “colonizados” ou agredidos por estes diminutos microrganismos, adquirindo eles especificidades biológicas próprias, de acordo com os hospedeiros ou com os ecossistemas da sua preferência [Ferreira *et al*, 2010]. Tais especificidades, aliadas aos enormes avanços do conhecimento científico obtidos nas últimas décadas pela Moderna Microbiologia, em quase todos os seus campos, conduziram à criação de vários ramos de especialização e ao desenvolvimento de notáveis e produtivas linhas de pesquisa científica [Ferreira *et al*, 2010].

Assim, hoje em dia, os microrganismos podem ser estudados em diversas áreas científicas, tais como:

- ✓ A **Micologia**, que estuda os numerosos fungos existentes na Natureza e a sua interação com o Homem e com o ambiente;
- ✓ A **Ficologia** ou a **Algologia** que estuda as algas existentes em água doce e águas marinhas;
- ✓ A **Virologia**, que aprofunda conhecimentos sobre os vírus, que podem afetar todos os seres vivos, incluindo bactérias;

- ✓ A **Bacteriologia**, que desenvolve variadas formas do saber respeitantes à vida das bactérias [Ferreira *et al*, 2010].

2.1.1 Bacteriologia

De entre os muitos seres que fazem parte do mundo microbiano, as Bactérias ocupam, sem dúvida, um lugar de destaque, que pelo seu elevado número e diversidade de metabolismo, quer também pela enorme versatilidade da sua interação com o Homem e com os outros Seres Vivos. Uma das características das bactérias é o seu pequeno tamanho, da ordem dos micrómetros (μm). Habitualmente possuem um único cromossoma (DNA) que se dispõe em círculo e enrolado, formando um nucleóide de modo a caber no interior da membrana celular [Ferreira *et al*, 2010].

Para um microbiologista, o estudo da história dos procariotas tem sido desde sempre um desafio, muito interessante uma vez que não há registos fósseis, com algumas exceções representadas pelos estromatólitos [Ferreira *et al*, 2010].

Atualmente, a classificação dos procariotas é a mais recente e a mais dinâmica entre as diferentes classificações dos organismos vivos, sendo possível explorar novos habitats e identificar espécies nunca antes cultivadas [Ferreira *et al*, 2010].

A Taxonomia Microbiana foi durante muito tempo considerada como uma área desinteressante da Microbiologia. Hoje em dia, pelo contrário, é uma ciência integrativa que tem despertado cada vez mais interesse devido à necessidade de organizar o conhecimento em expansão do mundo bacteriano e que está intimamente ligada com a evolução das metodologias usadas em Microbiologia, Biologia Molecular e análise de dados [Ferreira *et al*, 2010].

Inicialmente os seres vivos eram divididos em dois reinos: Plantas e Animais. Como muitos seres simples não cabiam nesta divisão, Ernst Heinrich Haeckel propôs, em 1866, a categoria Protista, incluindo algas, fungos, protozoários e bactérias [Nogueira, *et al*].

Posteriormente, em 1959, a classificação mais aceite passou a ser a de Robert H. Whittaker, composta por cinco reinos: Protista (protozoários e algumas algas), Monera (bactérias procariontes e cianobactérias ou algas azuis), Fungi, Plantae e Animalia [Nogueira, *et al*]. Em 1987, a análise filogenética molecular levou o microbiologista Carl Richard a mudar o rumo da taxonomia de procariontes e a propor em 1990 o domínio Archaea para arqueobactérias (consideradas representantes das formas mais primitivas de vida na terra) e mais dois domínios: as outras bactérias (Bactéria) e os eucariontes (Eucarya) - fungos, protozoários, plantas e animais [Nogueira, *et al*].

A Taxonomia, é geralmente considerada como sinónimo de sistemática, ou seja, é a ciência da classificação, nomenclatura e identificação, incluindo os seus princípios, procedimentos e objetivos [Ferreira *et al*, 2010].

Ainda que separadas, estas três áreas estão fortemente inter-relacionadas:

- **Classificação:** é o arranjo dos organismos em grupos taxonómicos com base nas semelhanças ou relações, não confinado às relações por ancestralidade [Ferreira *et al*, 2010]. Divide os microrganismos em grupos, de acordo com as suas **características naturais**, baseadas nas relações filogenéticas moleculares das bactérias, através de comparações na sequência de várias macromoléculas ou genes; ou **características artificiais**, baseadas nas características fenotípicas, principalmente morfológicas e fisiológicas [Nogueira, *et al*].

Vários são os níveis usados para classificação taxonómica: **domínio, filo, classe, ordem, família, género e espécie**. Este níveis constituem grupos sucessivamente mais pequenos e não sobreponíveis, a cujos nomes é dado um reconhecimento formal [Ferreira *et al*, 2010].

As bactérias possuem diversas morfologias. Estas podem-se apresentar nos seguintes tipo morfológicos:

- Bastonetes ou Bacilos:

Bastonetes longos ou curtos com extremidade reta, ou de ponta arredondada ou ainda curvos, em forma de vírgula [Nogueira, *et al*].

Não se dispõem em tantos arranjos como os cocos, sendo que na sua grande maioria, se apresentam de forma isolada. Porém, ocasionalmente podem ocorrer aos pares (diplobacilos) ou em cadeias (estreptobacilos) [Nogueira, *et al*].

- Espirilos:

Forma de hélice, sacarrolha ou espiralar. Estes ocorrem, predominantemente, como células isoladas [Nogueira, *et al*].

- Cocos:

Podem ser esféricos, elípticos, em forma de ponta de lança, riniformes, etc. Os cocos podem formar diferentes arranjos, de acordo com a sua divisão celular (diplococos, estreptococos, tétrades, sárcinas, estafilococos) [Nogueira, *et al*].

- **Nomenclatura:** é a atribuição dos nomes aos grupos taxonómicos de acordo com as regras internacionais, reguladas por edições sucessivas do Código

internacional de Nomenclatura Bacteriana [Ferreira *et al*, 2010]. As regras do código internacional baseiam-se no sistema binominal desenvolvido por Linnaeus que consiste no seguinte: o nome de uma espécie bacteriana é proveniente da combinação em latim, formado por duas partes, o nome do género seguido pelo nome da espécie bacteriana [Nogueira, *et al*]. Pela regra apenas a primeira letra do nome do género é escrita em maiúscula, e o nome completo deverá ficar em itálico ou sublinhado [Nogueira, *et al*].

- **Identificação:** é o ato e o resultado de determinar que um novo isolado pertence a um *taxon* já estabelecido [Ferreira *et al*, 2010]. É um processo que determina as características do microrganismo, a sua relação com microrganismos semelhantes ou diferentes, e, posteriormente com base nessa informação atribuir-lhes um nome [Nogueira, *et al*]. Normalmente o nome da espécie determina a característica morfológica ou bioquímica. Pode ainda ser em homenagem a uma pessoa ou lugar [Nogueira, *et al*]. Para denominar uma espécie que não tenha sido identificada, mas que se conhece o género faz-se uso da abreviatura “sp” que significa “espécie” [Nogueira, *et al*]. Caso seja necessário fazer referência a várias espécies do género, usa-se a abreviatura “spp” que significa “espécies” [Nogueira, *et al*]. Deve-se ter em atenção que segundo o código, os termos “sp” ou “spp” não são escritos em itálico ou sublinhados. [Nogueira, *et al*].

2.1.2 Célula Procariota

A microscopia eletrónica revelou nos seres vivos dois tipos de organização celular. Os microrganismos sem membrana nuclear denominada por célula procariota, e com membrana nuclear designada por célula eucariota [Ferreira *et al*, 2010].

As bactérias são microrganismos procariotas maioritariamente unicelulares. As eubactérias (verdadeiras bactérias) incluem as bactérias patogénicas para o Homem e *Archaea* inclui as bactérias que não têm patogenicidade para o Homem e as bactérias primitivas que vivem em condições fisiológicas extremas ou seja, em alto teor de NaCl, elevadas temperaturas e em meios fortemente ácidos [Ferreira *et al*, 2010].

Os microrganismos procariotas (*Bacteria* e *Archaea*) têm, como já referido, uma organização celular muito simples. As bactérias, exceto *Mycoplasma*, formas *L* e halófilos possuem parede celular [Ferreira *et al*, 2010].

A parede celular das bactérias tem uma grande importância devido ao facto de ser uma estrutura essencial para a viabilidade das bactérias, sendo um dos constituintes mais

importantes para o ataque de antibióticos. Esta consegue prever a distinção e variação imunológica entre as cepas de bactérias [Toodar, K., 2005].

De um modo geral, as bactérias desenvolvem-se em ambientes hipotônicos e, dada a fragilidade da membrana citoplasmática, caso não existisse uma parede celular rígida ocorreria lise celular. Esta estrutura constitui uma proteção mecânica eficaz contra a ruptura osmótica da célula bacteriana em ambientes hipotônicos. O componente parietal responsável por essa rigidez é o peptidoglicano, estando este presente em todas as bactérias com parede celular, exceto em *Archaea* [Ferreira *et al*, 2010].

O peptidoglicano, é um polímero de dissacarídeos reticulado por cadeias peptídicas curtas de aminoácidos. Existem muitos tipos de peptidoglicano. Todos os peptidoglicanos bacterianos contêm ácido N-acetilmurâmico, que é o componente definitivo da mureína. As paredes celulares de *Archaea* pode ser composta por proteínas, polissacáridos, moléculas ou peptidoglicano semelhante. Esta característica distingue as bactérias dos *Archaea* [Toodar, K., 2005].

A parede celular, estruturada sobre controlo genético, também é responsável pela morfologia bacteriana e pelo duplo comportamento das bactérias em relação à coloração de Gram. A Coloração tem um grande significado taxonómico, pois permite dividir as bactérias em dois grupos [Ferreira *et al*, 2010]:

- **Gram-Positivo**, que tomam uma coloração arroxeadada, devido à ação do corante primário cristal violeta;
- **Gram-negativo**, que coram de vermelho devido à fucsina básica.

A parede celular é quimicamente diferente nas bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, justificando-se assim o diferente comportamento das bactérias em relação à coloração de Gram [Ferreira *et al*, 2010].

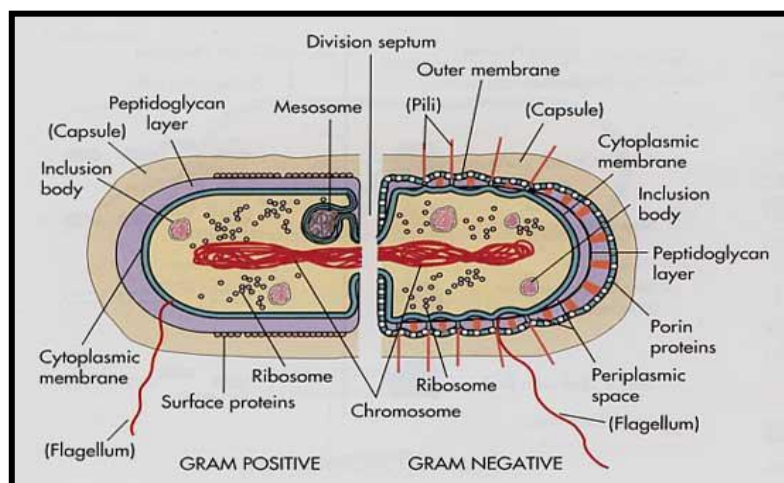


Figura 2.1: Comparação da estrutura de uma bactéria Gram-positiva e Gram-Negativa.

[consultado em <http://xopatogenicos.wordpress.com/2012/08/26/resumo-bacterias-gram-positivas-e-gram-negativas/>, a 22 de Abril de 2014]

2.1.2.1 Diferença entre Bactérias Gram-positivo e Gram-negativo

I. Bactérias Gram-positivo:

Este tipo de bactérias, como já referido anteriormente, retém o corante violeta de cristal roxo quando submetidos ao procedimento da coloração de Gram [Toodar, K., 2005].

A parede celular, destas, é relativamente espessa. É constituída por várias camadas de peptidoglicano, intercaladas perpendicularmente, com um grupo de moléculas chamadas ácidos teicóicos que apenas constituem a parede das células Gram-positivas [Toodar, K., 2005].

A Pressão Osmótica destas células é muito elevada (20 atmosferas) e qualquer agente que perturbe a estrutura da parede bacteriana provoca a lise celular. As bactérias habitam em meios hipotónicos no corpo Humano e nos meios de cultura, sem que ocorra a lise celular, graças à rigidez do mucopéptido da parede celular. O mucopéptido ou peptidoglicano é uma macromolécula típica das procariotas que constitui cerca de 50%-70% do peso seco da parede celular [Ferreira *et al*, 2010].

A parede celular das bactérias Gram-Positivo apresenta-se como uma monocamada justaposta à membrana citoplasmática, estando a célula praticamente sem periplasma. Na maioria dos casos, a parede celular é permeável macromoléculas e não oferece resistência à difusão dos antibióticos para exercerem as suas propriedades de antibiose, por interação com os seus alvos presentes na célula bacteriana [Ferreira *et al*, 2010].

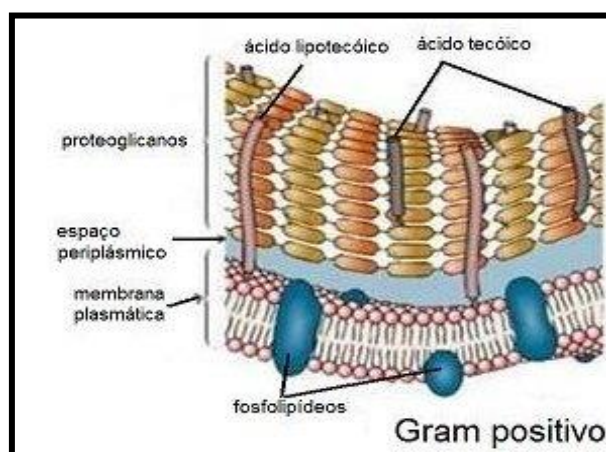


Figura 2.2: Composição da parede celular de uma bactéria Gram-Positiva. [consultado em <http://curiousguys2.blogspot.pt/2012/06/bacterias-gram-positivas-exemplos.html> a 27 de Abril de 2014]

No caso das β -lactamases e das enzimas hidrolíticas dos β -lactâmicos, estas são elaboradas no citoplasma e excretadas para o meio ambiente sem a resistência da parede celular devido ao seu elevado peso molecular [Ferreira *et al*, 2010].

Os ácidos teicóicos e teicurónicos existem na parede celular destas bactérias, e estão fortemente associados ao peptidoglicano, embora não participem na rigidez da parede celular [Ferreira *et al*, 2010].

II. Bactérias Gram-negativo

A Parede Celular das bactérias Gram-negativo é muito mais complexa quanto à composição química e quanto à ultra-estrutura, comparativamente com a parede celular das bactérias Gram-positivo [Ferreira *et al*, 2010].

A pressão Osmótica interna (1-10 atmosferas) destas, é mais baixa que nas bactérias Gram-positivo, por isso não necessitam de elevados teores de peptidoglicano. Contêm cerca de 10% de peptidoglicano do peso total da parede seca [Ferreira *et al*, 2010]. O peptidoglicano dos bacilos Gram-negativo, que se encontra disposto em monocamada, funciona como estrutura de suporte, impedindo a lise osmótica [Ferreira *et al*, 2010]. Porém existem duas proteínas que contribuem também, para a resistência mecânica do invólucro das bactérias Gram-negativos sendo elas as lipoproteínas e as porinas [Ferreira *et al*, 2010].

O peptidoglicano das bactérias Gram-negativo apresenta uma estrutura semelhante ao das bactérias Gram-positivo. Esta macromolécula apresenta nas bactérias Gram-negativo, um baixo teor em pontes interpeptídicas [Ferreira *et al*, 2010].

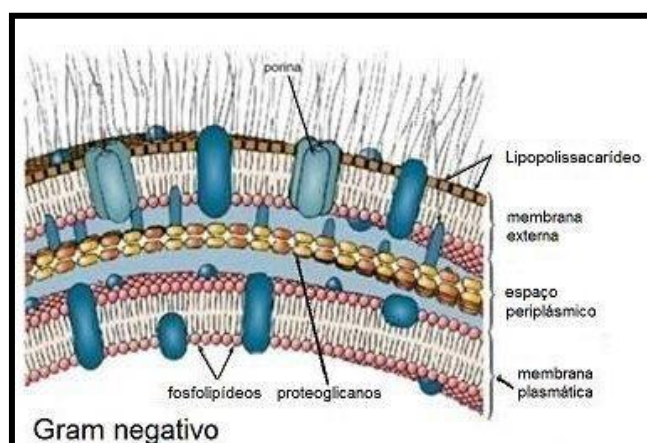


Figura 2.3: Composição de uma bactéria Gram-Negativa. [consultado em <http://curiousguys2.blogspot.pt/2012/06/bacterias-gram-negativas-exemplos.html> a 27 de Abril de 2014]

A parede celular das bactérias Gram-positivo é permeável a macromoléculas já a das bactérias Gram-negativo constitui uma barreira à penetração de compostos hidrófilos e hidrofóbicos [Ferreira *et al*, 2010].

A membrana externa é muito importante na fisiologia das bactérias Gram-negativo, tornando-as resistentes à ação de substâncias que participam na defesa do hospedeiro [Ferreira *et al*, 2010].

2.2 Microrganismos

A vida de todos os microrganismos está intimamente ligada à dos microrganismos existentes na Terra [Ferreira *et al*, 2010].

Os Microrganismos são uma forma de vida que não pode ser visualizada sem auxílio de um microscópio. Estes seres diminutos podem ser encontrados no ar, no solo, e, inclusive, no homem [<http://www.todabiologia.com/microbiologia/microorganismos.htm>].

Existem incontáveis microrganismos no ambiente. Dentro desse ambiente o Homem tem contacto com a maioria destes, pois, vivem na verdade dentro e sobre o corpo Humano. Estima-se que o corpo Humano adulto é o hospedeiro de pelo menos 100 trilhões de células microbianas, em qualquer época [Pelczar Jr. *et al*, 1996].

Estes microrganismos, a maioria dos quais, são bactérias, são denominados de **flora normal** do corpo humano, habitando a pele e algumas superfícies internas do corpo (boca, nasofaringe, ouvido, trato intestinal e trato urogenital) [Pelczar Jr. *et al*, 1996].

As espécies e o número de flora normal dependem do sítio particular, da idade e sexo do hospedeiro. A maioria dos membros da flora normal está altamente adaptada à sobrevivência e ao crescimento nessas áreas que podem apresentar condições físicas e químicas desfavoráveis a outros tipos de microrganismos [Pelczar Jr. *et al*, 1996].

Os membros da flora normal também podem ser considerados como **flora residente**, cujos microrganismos são encontrados em um dado sítio de forma regular, em determinada idade do hospedeiro. Existem outros micróbios que apenas estão presentes num curto período de tempo no corpo Humano. Esses microrganismos são provavelmente do ambiente, instalando-se temporariamente no hospedeiro. Podem, no entanto, estar presentes várias horas, dias ou semanas e posteriormente desaparecerem constituindo a **flora transitória**. Esta tem pouco significado desde que a flora residente permaneça intacta. Caso os membros da flora residente diminuam, os micróbios transitórios podem colonizar-se, reproduzirem-se e por fim causar doenças [Pelczar Jr. *et al*, 1996].

2.2.1 *Staphylococcus aureus*



Figura 2.4: *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica, pertencente ao grupo dos cocos Gram-positivos. Apresenta dimensões entre os 0,5 e 1,5 μm de diâmetro, são imóveis, não-esporulados, geralmente não-encapsulados, catalase-positiva, oxidase-negativa e é uma bactéria anaeróbia facultativa que cresce por respiração aeróbia ou fermentação produzindo principalmente ácido láctico [França,2009]. Quase todas as cadeias de *S.aureus* produzem a enzima coagulase [Todar,2005].

Esta bactéria pode apresentar-se de diversas formas (isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente obtendo um especto semelhante ao de um cacho de uva), devido à sua divisão celular [Santos *et al*].

Em 1884, Rosenbach descreveu os dois tipos de colónias pigmentadas e propôs a nomenclatura apropriada: *Staphylococcus aureus* (colónias amarelas) e *Staphylococcus albus* (colónias brancas). *Staphylococcus aureus* é considerada a espécie com maior interesse médico devido às suas interações com o Ser Humano, sendo agente de uma grande variedade de infeções [Todar,2005].

As cepas de *Staphylococcus aureus* crescem em meios comuns como é o caso de caldo ou Ágar simples, a um pH de 7 e a uma temperatura ótima de 37°C. As colónias formadas em placa após 18-24 horas de incubação, apresentam-se de forma arredondada, lisas e brilhantes [Santos, et al]. Forma grandes colónias amarelas em meio de cultura rico, em que a pigmentação aumenta com a prolongação do tempo de incubação [Todar,2005]. Em placas de Ágar Sangue, forma-se um halo de hemólise em torno das colónias [Santos *et al*]. Outro meio importante para a identificação desta bactéria é o ágar manitol-sal, selectivo para esta espécie, uma vez que a bactéria consegue fermentar o manitol, produzindo ácido láctico [Santos *et al*].

A distribuição de *S.aureus* é muito ampla, pois é uma bactéria que é capaz de resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira. Este microrganismo pode ser encontrado no ambiente de circulação do Ser Humano, sendo o próprio Homem o seu principal reservatório, além de estar presente em diversas

partes do corpo, como fossas nasais, garganta, trato intestinal e pele. De todos os sítios anatómicos descritos anteriormente, as narinas possuem o maior índice de colonização, cuja prevalência é de cerca de 40% na população adulta, podendo esta ser maior no interior de hospitais [Santos, et al]. 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 seleção de cadeias resistentes, e obtenção de genes de resistência [Todar,2005].

As infeções nosocomiais têm sido a principal causa de morbidade e mortalidade. Estas, são frequentemente, agudas e piogénicas. Caso, não sejam devidamente tratadas, podem causar bacteremia envolvendo vários órgãos. As infeções mais comuns incluem furúnculos, celulite, impetigo e sítios de ferida cirúrgica. Alguns dos quadros mais graves incluem bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite aguda, miocardite, meningite, artrite séptica, abscesso em músculos, infeções no trato geniturinário, sistema nervoso central e vários órgãos intra-abdominais [França,2009].

Esta bactéria é também capaz de produzir intoxicações alimentares devido à produção de exotoxinas durante o crescimento em alimentos contaminados [Santos, et al], e ainda síndrome de choque tóxico através de libertação de superantígenos para a corrente sanguínea [Todar,2005].

2.2.2 *Escherichia coli*

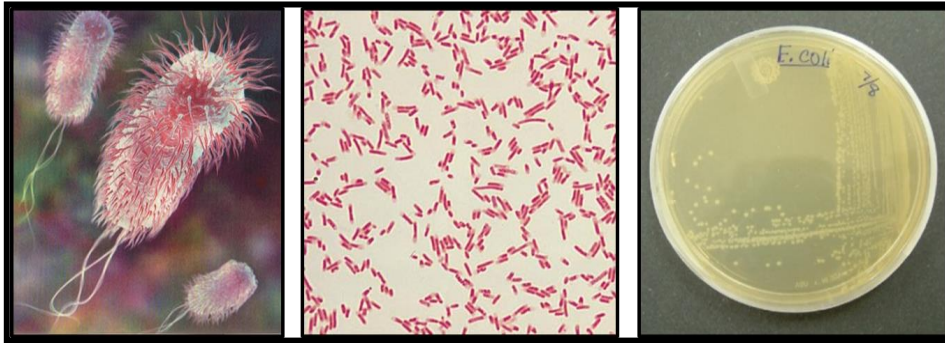


Figura 2.5: *Escherichia coli*.

Theodor Escherich foi o primeiro a descrever a *E.coli* em 1885, como *Bacterium coli commune*, a qual isolou de fezes de recém-nascidos. Foi mais tarde designada como *Escherichia coli*, e por muitos anos, foi simplesmente considerada como um organismo parasita do intestino grosso [Todar, 2002].

Foi apenas no ano de 1935 que se demonstrou que uma cepa de *E.coli* era a causa de um surto de infecções gastrointestinais em crianças [Todar, 2002].

O trato gastrointestinal dos doentes é colonizado por *E.coli* algumas horas ou dias após o nascimento. A bactéria é ingerida em comida, água ou obtida diretamente de outros indivíduos que lidam com a criança. Pode persistir durante meses ou anos, depois de se ter estabelecido na mucosa do intestino grosso [Todar, 2002].

A *E.coli*, pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo a mais importante desta. É uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-negativa, não esporulada e na sua maioria móvel devido aos flagelos peritríqueos. Pertence à microbiota entérica de mamíferos e aves [Almeida, 2013].

Esta bactéria cresce a temperaturas entre 18 a 44°C sendo 37°C a temperatura ideal de crescimento [Almeida, 2013].

Em meios de nutrientes sólidos as unidades formadoras de colônias (UFC) apresentam cerca de 1 a 3mm de diâmetro. Apresentam um aspeto rugoso ou liso, mas podem existir colônias intermediárias e mucoides [Almeida, 2013].

As Colônias rugosas têm aspeto grosseiro e contornos irregulares, já as colônias lisas são convexas, brilhantes e com bordos regulares [Almeida, 2013].

Fisiologicamente a *E.coli* é versátil e bem adaptada ao seu habitat característico. Pode crescer em meios com glucose, como único constituinte orgânico. 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 O₂, 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 NO₃, NO₂ ou fumarato como aceitador de elétrons para os processos respiratórios e transporte de elétrons. Desta maneira, a *E.coli* adapta-se ao seu meio anaeróbio no intestino e também a habitats exteriores [Todar, 2002].

A *Escherichia coli* pode responder a sinais ambientais como químicos, pH, temperaturas, 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 no eu ambiente em vez de sintetizar as enzimas que os metabolizam [Todar, 2002].

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

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

- Infeção no trato urinário;
- Meningite neonatal;
- Doenças intestinais (gastroenterites) [Todar, 2002].

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

2.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*



Figura 2.6: *Pseudomonas aeruginosa*.

A *Pseudomonas aeruginosa* é um membro da classe *Gamma Proteobacteria* do Dominio *Bacteria* [Todar, 2004].

Constitui a família denominada *Pseudomonadaceae*. Os membros desta família caracterizam-se como bacilos Gram-negativos retos ou ligeiramente curvos. São bactérias aeróbias estritas e a maioria das cepas apresenta motilidade por meio de um ou mais flagelos polares [Todar, 2004].

É uma bactéria independente, encontrada normalmente na água e no solo. Aparece também regularmente nas superfícies de plantas e ocasionalmente em superfícies de animais [Todar, 2004].

Membros deste gênero são bem conhecidos em estudos microbiológicos, pois este é um dos poucos grupos de bactérias que são patogênicos para as plantas. Tem sido cada vez mais reconhecido, devido ao facto de ser um dos principais agentes de infecções nosocomiais [Todar, 2004]. A importância clínica de infecções causadas por *P.aeruginosa* caracteriza-se pela expressão de múltipla resistência a antibacterianos associada a uma difícil erradicação da doença, consequentemente com elevados índices de morbidade e mortalidade [http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/revista_virtual/microbiologia/micro07.pdf].

A bactéria tem um metabolismo que é respiratório mas nunca fermentativo, mas cresce na ausência de O_2 , se houver NO_2 disponível como recetor de elétrons respiratórios [Todar, 2004].

É uma das bactérias mais fortes e que mais rapidamente se desloca, exigindo uma nutrição simples. No laboratório, o meio de cultura mais simples, constituído por acetato como fonte de carbono e sulfato de amónio como fonte de azoto, é capaz de fazer crescer esta bactéria.

A temperatura ótima para o seu crescimento é 37°C, mas tem capacidade de crescer a temperaturas mais elevadas atingindo os 42°C [Todar, 2004].

É resistente a altas concentrações de sal e corante, anti-sépticos fracos e muitos antibióticos frequentemente utilizados [Todar, 2004].

A *Pseudomonas aeruginosa* produz dois tipos de pigmentos solúveis, o pigmento fluorescente pioverdina e o pigmento azul piocianina. O último é característico em infeções supurativas causadas por esta bactéria [Todar, 2004].

É notória pela sua resistência a antibióticos sendo por isso um patogénico especificamente perigoso. É uma bactéria patogénica oportunista o que significa que aproveita alguma falha nas defesas do hospedeiro para iniciar uma infeção. Quase nunca infecta tecidos com a defesa intacta [Todar, 2004].

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, como é o caso da Gentamicina, mas não contra todas as cepas [Todar, 2004].

Pode causar doenças como infeções no trato urinário, sistema respiratório, tecidos moles, osso, articulações, sistema gastrointestinal, também causa dermatites e uma variedade de infeções sistémicas, particularmente em doentes com queimaduras graves, cancro e SIDA (sem sistema imunológico) [http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/revista_virtual/microbiologia/micro07.pdf]. A infeção 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, 2004].

2.3 Agentes antimicrobianos e os seus efeitos no crescimento

Agentes antimicrobianos são fármacos ativos no tratamento de infeções em função da sua toxicidade seletiva, destruindo o microrganismo invasor sem afetar as células do hospedeiro. Em muitos casos a toxicidade seletiva não é absoluta. Exige que a concentração do antimicrobiano seja controlada cuidadosamente de modo a afetar o microrganismo em níveis toleráveis para o hospedeiro. A terapia seletiva com antimicrobianos tem como vantagem as diferenças bioquímicas existentes entre os microrganismos e os seres humanos [Nogueira *et al*].

Um agente microbiano corresponde a um produto químico natural ou sintético que mata ou inibe o crescimento de microrganismos. Agentes que matam organismos são frequentemente denominados agentes "cidas", sendo o termo associado a um prefixo que indica o tipo do organismo. E, assim, conhecem-se agentes bactericidas, fungicidas e virais [Madigan *et al*, 2004].

Por outro lado, existem agentes que não matam, apenas inibem o crescimento de microrganismos. Estes são chamados de "státicos", podendo-nos referir a bacteriostáticos, fungistáticos e viristáticos [Madigan *et al*, 2004].

Três efeitos distintos podem ser observados quando um agente antimicrobiano é adicionado a uma cultura bacteriana em crescimento exponencial: bacteriostático, bactericida ou bacteriolítico. [Madigan *et al*, 2004]. Um efeito bacteriostático é observado quando o crescimento é inibido sem que haja a morte de células. [Madigan *et al*, 2004]. Agentes bactericidas matam as células sem que haja a lise ou rutura celular. Estes correspondem a uma classe de agentes químicos que em geral se ligam fortemente a seus alvos celulares, não sendo removidos por diluição. [Madigan *et al*, 2004]. E, por fim, agentes bacteriolíticos induzem à morte pela lise celular, à rutura da célula observada como uma diminuição do número de células ou da turbidez após a adição do agente. Estes incluem antibióticos que inibem a síntese da parede celular, como a penicilina e também agentes químicos que danificam a membrana citoplasmática [Madigan *et al*, 2004].

Agentes antimicrobianos variam quanto à toxicidade seletiva, como já referido. Alguns atuam de forma relativamente não seletiva, provocando efeitos similares em todos os tipos de células. Já outros, são muito mais seletivos e tóxicos aos microrganismos que aos tecidos animais. Agentes antimicrobianos que possuem toxicidade seletiva são especialmente úteis no tratamento de doenças infecciosas, uma vez que podem ser utilizados para matar os microrganismos causadores de doenças *in vivo*, sem causar danos ao hospedeiro [Madigan *et al*, 2004].

Para se seleccionar o agente antimicrobiano mais apropriado deve ter-se o devido conhecimento da identidade do microrganismo e da sua sensibilidade aos agentes em particular, o sitio de infeção, os fatores ligados ao paciente e o custo de terapia [Nogueira *et al*].

2.3.1 Antimicrobiano quimioterápico

A um composto obtido inteiramente por síntese química, que desenvolve atividade antibacteriana, dá-se o nome de quimioterápico [Paredes *et al*, 2004].

A quimioterapia antimicrobiana conferiu enormes benefícios para a saúde humana, e no século XX foram notáveis grandes avanços. Os antimicrobianos não só causaram uma dramática mudança no tratamento de doenças infecciosas como também na humanidade. Se um agente antimicrobiano é inadequadamente escolhido para o tratamento de certa infeção com antibióticos resistentes a certos microrganismos, este pode causar danos a nível da terapia. A utilização de agentes antimicrobianos resultou na seleção de resistência a diversas bactérias [Saga, 2009].

Os medicamentos quimioterápicos, atuam combatendo as células doentes, destruindo e/ou controlando seu desenvolvimento, pois interferem na capacidade de multiplicação das células do próprio organismo [Foguel *et al*, 2010].

Os quimioterápicos não atuam exclusivamente sobre as células tumorais. As estruturas normais que se renovam constantemente, como a medula óssea, os pêlos e a mucosa do tubo digestivo, são também atingidas pela ação dos quimioterápicos. São utilizados também contra vírus, bactérias, fungos, protozoários, entre outros, combatendo: micoses, amebíases, tuberculose, hanseníase, entre muitas outras patologias [Foguel *et al*, 2010].

Hoje em dia, o estudo dos quimioterápicos encontra-se em grande progresso, surgindo constantemente novos compostos. Atualmente, existem quimioterápicos disponíveis para o tratamento da maioria das infeções bacterianas, helmintíases, muitas protozooses e micoses [Foguel *et al*, 2010].

A maior falha da quimioterapia é devido à resistência aos produtos antimicrobianos. Esta resistência ocorre ou porque as populações celulares desenvolvem nova codificação genética (mutação) ou porque são estimuladas a desenvolver tipos celulares resistentes ao serem expostas às drogas, o que lhes permite seguir por vias metabólicas alternativas, através da síntese de novas enzimas [Foguel *et al*, 2010].

Para um composto químico ser um agente quimioterápico ideal para utilização no tratamento de infecções microbianas, deve apresentar as seguintes qualidades [Pelczar *et al*, 1996]:

- Ser capaz de inibir ou destruir muitas espécies de microrganismos patogênicos. Quanto maior o número de diferentes espécies microbianas afetadas, melhor será o agente. Os antibióticos mais amplamente utilizados são os ***antibióticos de largo espectro***, sendo estes efetivos contra muitas espécies diferentes;
- Inibir os microrganismos de tal maneira que se evite o desenvolvimento de formas resistentes de microrganismos produtores de doenças;
- Não produzir efeitos colaterais indesejáveis no paciente;
- Não eliminar os microrganismos que normalmente habitam o trato intestinal ou outras áreas do organismo (*flora normal*), pois desempenham um papel importante, impedindo o crescimento de microrganismos patogênicos e conseqüentemente não permitem o estabelecimento da infecção;
- Ser altamente solúvel nos fluidos corporais;
- Ser capaz de alcançar concentrações suficientes nos tecidos ou no sangue dos pacientes para matar ou inibir os microrganismos que estão a causar a doença [Pelczar *et al*, 1996].

Um exemplo de agente quimioterápico é a Sulfona e os seus derivados, contendo uma porção heterocíclica. São conhecidos pelas suas interessantes e importantes bioatividades antibacterianas e antifúngicas. Têm atraído uma considerável atenção em pesticidas e na área farmacêutica [Mahajan *et al*, 2009].

2.3.1.1 Sulfona

A Sulfona foi sintetizada em 1908 por Fromm e Whittmann e a sua atividade antibacteriana foi confirmada em 1937 [Flores, 1979].

Este composto químico contém um grupo funcional sulfonilo ligado a dois átomos de carbono. O átomo de enxofre está duplamente ligado a cada um dos dois oxigénios e unido com uma ligação simples a cada um dos dois átomos de carbono, que geralmente são dois substituintes de hidrocarbonetos separados. A sua fórmula estrutural é $RS(=O)_2-R'$, onde R e R' são grupos

orgânicos. Sulfuretos são muitas vezes os precursores para as sulfonas por oxidação biológica através da formação intermediária de sulfóxidos [<http://en.wikipedia.org/wiki/Sulfone>].

A síntese de sulfonas tem tido um uso extensivo na área da química orgânica. São conhecidos diversos derivados de sulfonas com conhecimento das suas atividades biológicas, tanto antimicrobiana, como anti-inflamatória e inibitória. O produto 4:4 diaminodifenilsulfona - N,N - didextrosa de sulfonato de sódio foi dos primeiros derivados usados no homem, porque mostrou um efeito protetor para cobaias infetadas com o bacilo tuberculose humano [Flores, 1979].

Pensa-se que o mecanismo é semelhante ao das sulfonamidas, pois quimicamente são idênticas. A sua ação é antagonizada pelo PABA, agindo através da inibição da síntese bacteriana de folato. A resistência ao fármaco está a aumentar e o tratamento com uma combinação de fármacos é agora recomendado [Rang et al].

As sulfonamidas são dos compostos mais importantes e há mais tempo utilizados enquanto produtos com o grupo sulfona. São compostos de síntese química com uma ação bacteriostática. São conhecidos como antimetabolitos, dado que inibem a cadeia metabólica fundamental para a viabilidade da célula bacteriana [Ferreira *et al*, 2010].

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, muitas vezes incapacitante, endêmica em 80 países, atingindo aproximadamente 12 milhões de indivíduos em todo mundo. A doença é causada pelo *Mycobacterium hansenii*. O tratamento é longo, e para evitar o problema do surgimento de resistência, apoia-se na poliquimioterapia. Os medicamentos básicos na terapêutica são as **sulfonas**, a rifampicina e clofazimina [Foguel, *et al*, 2010].

Pode causar problemas digestivos, como por exemplo a anemia hemolítica, sendo esta a mais frequente de aparecer. Na maior parte das vezes pode não ser muito grave, excepto quando o individuo apresenta deficiência da glicose-6-fosfato de desidrogenase. Pode ainda provocar hepatites tóxicas, reações cutâneas por fotossensibilidade, psicoses e uma síndrome que ficou conhecida como a “Síndrome da Sulfona” [Opromolla, 1997].

Este composto químico é um antimicrobiano antimetabólito inibidor da síntese do ácido fólico [Mayer, 2011]. São muitos os estudos realizados sobre a síntese e actividade biológica nos últimos 3 anos. Algumas sulfonas difenilicas são conhecidas pela sua actividade moderada antifúngica e antimicrobiana. Demonstram efeito inibitório contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Trabalhos já realizados indicam que heterocíclicos que contêm sulfonas, encontram boas aplicações como agentes antibacterianos. A juntar a tudo isto, a utilização de sulfonas em síntese orgânica tornou-se uma estratégia clássica na obtenção de moléculas complexas, estabilizando radicais e aniões, atuando ainda como sintões catiónicos. Entre diferentes protocolos, o método mais frequente e simples para preparar sulfonas é a partir da oxidação de sulfuretos [Mahajan et al, 2009].

A sulfona, para além de ser um agente quimioterápico, apresenta um efeito bacteriostático [Mayer, 2011], inibindo o crescimento bacteriano. Mas, o organismo permanece viável de modo que, quando se interrompe o tratamento, o organismo pode recuperar mas volta a ocorrer multiplicação bacteriana. [Mahajan et al, 2009]

Um agente bacteriostático, e neste caso a sulfona, depende do seu modo de ação, estrutura e outros fatores como tipo de germe, tamanho do inóculo, tempo para atuar e fase de crescimento das bactérias [Mahajan et al, 2009].

Após alguma pesquisa bibliográfica é maioritariamente notável a atividade antibacteriana contra Gram-positivas do que em Gram-negativas, precisamente contra *Staphylococcus aureus* [Curti et al, 2007].

2.4 Os Óleos Essenciais e o seu uso corrente

Ao longo do tempo os óleos essenciais têm tido um enorme reconhecimento devido aos efeitos benéficos que apresentam para a saúde do Ser Humano [Laciar, *et al*; 2009]. São considerados como agentes antimicrobianos importantes presentes em plantas. Também podem ter atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antissépticas (bactericida, fungicida e virucida), analgésicas, sedativas e espasmolíticas [Bakkali, *et al*; 2008].

Os óleos essenciais são produtos oleosos naturais e aromáticos com uma mistura complexa de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados, tais como álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis, entre outros [Chung, *et al*;2007]. Estes são caracterizados por apresentarem um forte odor, sendo obtidos a partir de plantas com metabolitos secundários [Bakkali, *et al*; 2008] e também a partir de outras matérias vegetais como folhas, cascas ou frutas [Laciar, *et al*; 2009].

De uma forma geral, os óleos essenciais, são misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, capazes de agir na superfície celular bacteriana causando, principalmente, comprometimento da parede celular e membrana citoplasmática. Estes, podem ser considerados como uma alternativa factível aos aditivos e sanificantes sintéticos, em que seriam usados como métodos adicionais no controle de microrganismos patogénicos e deterioradores [Sousa; *et al*].

Geralmente, a composição do óleo é um equilíbrio de vários compostos, embora em muitas espécies, um constituinte pode prevalecer sobre todos os outros. Produtos vegetais antimicrobianos ganharam um interesse especial devido à resistência que apresentam frente a antibióticos que alguns microrganismos adquiriram [Chung, *et al*;2007].

Os óleos essenciais de especiarias, plantas medicinais e ervas têm demonstrado atividade antimicrobiana, conseguindo servir como uma fonte de agentes antimicrobianos contra algumas bactérias patogénicas. Óleos essenciais e os seus componentes são conhecidos por serem ativos contra uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram-negativas, e as bactérias gram-positivas [Chung, *et al*;2007]. Normalmente, as bactérias Gram-negativas apresentam, maior resistência do que as bactérias Gram-positivas para os efeitos antagónicos de óleos essenciais, devido à camada de lipopolissacarídeos presente na membrana externa [Chung, *et al*;2007].

Os óleos essenciais são ligeiramente mais ativos contra as bactérias Gram-positivas dos que as bactérias Gram-negativas. É talvez de esperar que os organismos Gram-negativos sejam menos suscetíveis às ações 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 suscetibilidade das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [Burt, 2004].

São usados na União Europeia, principalmente na comida, como aromas, em perfumes e nos produtos farmacêuticos pelas suas propriedades funcionais [Burt; 2004].

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

2.4.1 Composição Química dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são misturas naturais muito complexas. Podem conter cerca de 20-60 componentes em concentrações bastante diferentes. Eles são caracterizados por dois ou três componentes principais em concentrações elevadas regularmente (20-70%) comparado com os outros componentes presentes em quantidades vestigiais. Geralmente, estes componentes principais determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais [Bakkali *et al*, 2008].

Os componentes dos óleos essenciais incluem dois grupos de origem sintética distinta. O grupo principal é composto de terpenos e terpenóides e o outro é o grupo dos compostos aromáticos e constituintes alifáticos, todos caracterizados por um baixo peso molecular [Bakkali *et al*, 2008].

2.4.2 Terpenos

Os terpenos, também designados como terpenóides ou isoprenóides são provavelmente o grupo mais numeroso de produtos naturais derivados das plantas, nas quais se encontram descritas à volta de vinte mil estruturas [Martini, 2011].

Estes compostos são constituídos a partir da combinação de unidades de cinco átomos de carbono, denominadas de isopreno, e incluem também o subgrupo dos esteróides, estudados como um grupo separado [Banthorpe, *et al*; 1994].

Os terpenos subdividem-se em hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}). Os principais são os monoterpenos (C_{10}) e os sesquiterpenos (C_{15}). Um terpeno que na sua estrutura contenha o grupo oxigénio é denominado de terpenóide [Bakkali *et al*, 2008].

A biossíntese dos terpenos nas plantas consiste na síntese do precursor direto difosfato de isopentenilo (IPP) [Bakkali *et al*, 2008] a partir de duas vias: a via do ácido mevalónico e a via do fosfato do metileritritol (MEP) [Cowan, 1999].

A adição repetitiva de IPP forma os diferentes precursores, difosfato de prenilo, produz as várias classes de terpenos, a modificação do difosfato de prenilo pelas sintetases específicas dos terpenos, forma o esqueleto de terpeno e finalmente, a modificação enzimática secundária (reações redox) do esqueleto, atribui propriedades funcionais aos diferentes terpenos [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 ativos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários [Cowan, 1999]. Estes como são agentes lipofílicos consequentemente perturbam a integridade e permeabilidade da membrana. A perda de iões K^+ é usualmente indício de dano e é muitas vezes seguida pelo efluxo dos constituintes citoplasmáticos [Korock *et al*, 2007].

Os terpenos podem ser encontrados em todas as partes das plantas superiores: sementes, flores, frutos, folhas, raízes e madeira. Estes, também se podem encontrar em limos, algas, líquenes, insetos e microrganismos. Os compostos deste tipo, na forma de óleos ou nos extratos, são desde a antiguidade como constituintes de aromas, conservantes, perfumes, remédios, sabões e pigmentos [Banthorpe, *et al*; 1994].

Os terpenos apresentam várias bioatividades, sendo ativos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. O seu mecanismo de ação contra os mesmos ainda não está totalmente compreendido, mas pensa-se que está envolvido com a rutura da membrana pelos componentes lipofílicos [Cowan, 1999].

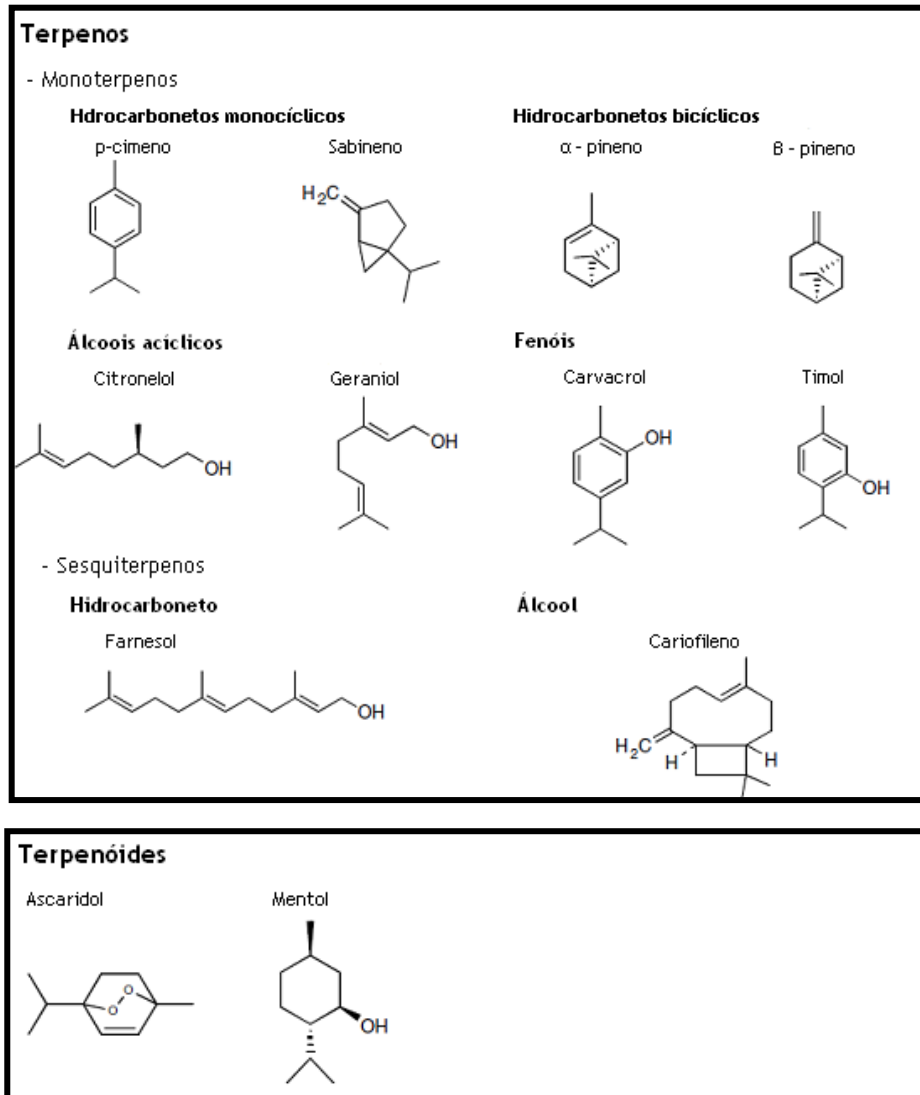


Figura 2.7: Estruturas químicas de alguns componentes dos óleos essenciais, terpenos e terpenóides.

[Adaptado de Bakkali *et al*, 2008]

2.4.2.1 Monoterpenos

Os monoterpenos são formados pelo acoplamento de duas unidades isoprénicas, o que permite uma grande variedade estrutural. Representam 90% dos constituintes dos óleos essenciais [Bakkali *et al*, 2008].

Estes derivados podem apresentar diferentes grupos funcionais [Bakkali *et al*, 2008]:

- **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.

A biossíntese dos monoterpenos ocorre através do acoplamento de unidades de PPDMA e PPI, catalisada pela enzima prenil-transferase, formando a unidade básica denominada de

pirofosfato de geranial (PPG) que envolve a ionização de PPDMA, com a formação de um cátion alílico e com adição à ligação dupla à molécula de PPI [Martini, 2011].

Estes, são considerados a maior classe de metabólitos especiais de considerável valor económico. Ocorrem principalmente, a partir das plantas, e podem, também, ser encontrados em alguns animais e microrganismos [Martini, 2011].

A função destes nas plantas são realizar um efeito de atração dos polinizadores para as flores, proteger os tecidos verdes do ataque de herbívoros e das infeções microbianas. Muitos dos óleos monoterpénicos apresentam propriedades bacteriostáticas e frequentemente bactericidas [Banthorpe, *et al*; 1994].

Quando usados em pequenas concentrações, os monoterpénos, apresentam um sabor e aroma agradáveis. Desde a antiguidade, que são extraídos de várias plantas e usados como aditivos para alimentos, por exemplo [Martini, 2011].

Os monoterpénos são moléculas lipofílicas, e portanto, atravessam facilmente as membranas celulares, sendo fáceis de absorver pela pele e pulmões. Têm sido usados ao longo da história em pomadas e bálsamos medicinais, aditivos para banho e para aliviar constipações da cabeça e do peito, bem como para dores musculares [Martini, 2011].

2.4.2.2 Sesquiterpenos

Os sesquiterpenos são formados a partir da união de três unidades de isoprenos (C₁₅) [Bakkali *et al*, 2008], que se originam através da condensação do PPI com PPG para produzir o PPF (pirofosfato de farnesila) [Martini, 2011]. A extensão da cadeia aumenta o número de ciclizações possíveis o que permite uma maior variedade de estruturas [Bakkali *et al*, 2008].

A estrutura e função dos sesquiterpenos são similares à dos monoterpénos [Bakkali *et al*, 2008]:

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

Os sesquiterpenos formam a maior classe dos terpenóides encontrados em plantas, musgos, fungos e algas. Possuem propriedades biológicas de repelência a insetos, polinização e regulação do crescimento em plantas [Martini, 2011].

2.4.2.3 Componentes aromáticos

São formados a partir do fenilpropano, e ocorrem com menos frequência que os terpenos não aromáticos. A via de biossíntese relativa aos terpenos e derivados fenilpropanicos geralmente são separados nas plantas, mas pode coexistir em algumas [Bakkali et al, 2008].

Os componentes aromáticos compreendem:

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

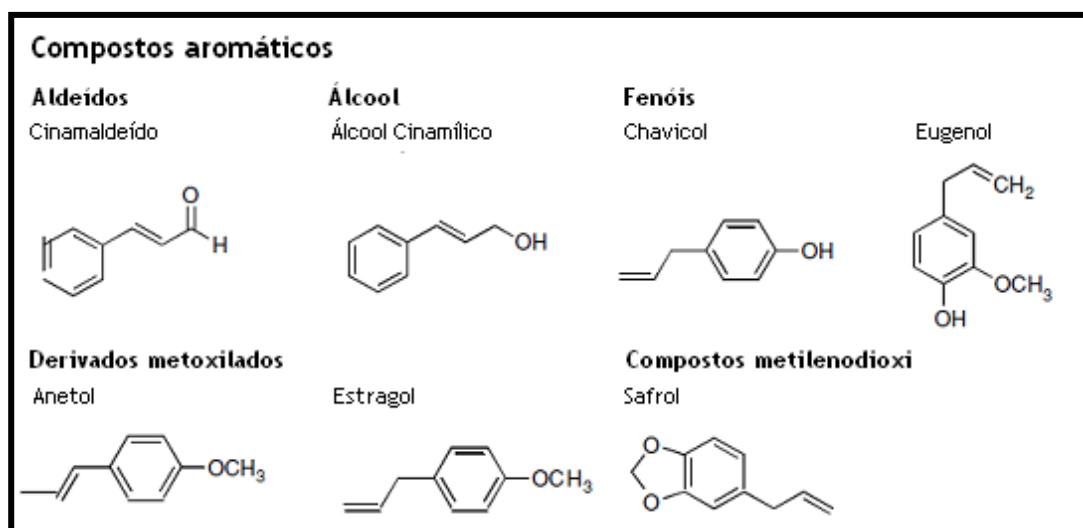


Figura 2.8: Estruturas químicas de alguns componentes dos óleos essenciais- compostos aromáticos. [Adaptado de Bakkali et al, 2008]

2.4.3 Óleo essencial - Carvona

A carvona pertence à classe dos monoterpenos que agrupa os terpenos formados a partir de 2 unidades isopropénicas (C₅) através das vias do mevalonato ou da 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (via triose-piruvato). Trata-se de uma substância com propriedades odoríferas sendo os seus derivados empregues em indústrias farmacêuticas e de alimentos. Estudos com este monoterpeno têm demonstrado que este causa efeitos no sistema nervoso central, apresenta atividade antibacteriana, anticonvulsionante, citotoxicidade em células cancerígenas e atividade antifúngica [Gondo, 2012].

A carvona é uma cetona monoterpénica, obtida por destilação e é encontrada como o principal componente ativo de vários óleos essenciais, tais como hortelã, endro, alcaravia e erva-cidreira. Possui um carbono assimétrico, carbono 4 do anel ligado o isopropenil [Neves, 2012]. Existe na forma de dois enantiómeros: S-(+)-carvona e R-(-)-carvona [Gonçalves, *et al*, 2010].

O isómero dextrogiro S-(+)-carvona é o componente essencial da alcaravia e o isómero levogiro R-(-)-carvona é o componente principal da hortelã [Sell, 2003]. O termo carvona deriva do nome científico da alcaravia, cujo principal constituinte (cerca de 85% do óleo) é a (+)-(4S)-carvona. A (-)-(4R)-carvona é o principal constituinte do óleo essencial *Mentha spicata* (nome científico da hortelã) do qual cerca de 75% do óleo é carvona [Oliveira, 2009].

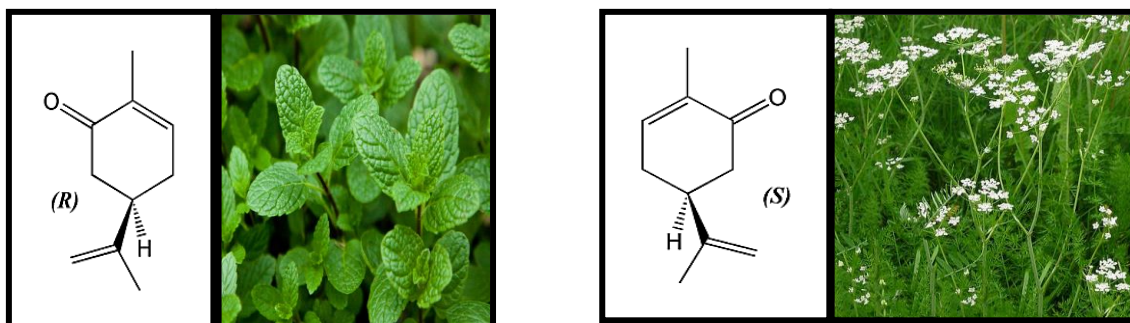


Figura 2.9: Estruturas moleculares dos diferentes isómeros da Carvona; R-Carvona e S-Carvona.

[Adaptada de <http://bmc.jtamames.eu/l2/Composicao/Lipidos/Terpenos/terpenos.htm>]

Estes aromatizantes são de grande importância comercial e a síntese da carvona tem recebido uma considerável atenção [Oliveira, 2009].

A forma Dextro S-(+)-carvona é obtida praticamente pura por destilação fracionada do óleo de alcaravia. A forma Levo da carvona obtido a partir de óleos que a contêm, geralmente, requer um tratamento adicional para produzir produtos de alta pureza de R-(-)-carvona. Pode ser conseguido através da formação de um composto de adição com sulfeto de hidrogénio, a partir de carvona, que podem ser regenerados por meio de tratamento com hidróxido de

potássio em etanol e, em seguida, destilar o produto numa corrente de vapor. A Carvona pode ainda, ser preparada sinteticamente por meio de limoneno [http://en.wikipedia.org/wiki/Carvone, consultado a 29-09-2014].

A p-mentha-6,8-dien-2-one(-)-carvona é monoterpene representante do grupo químico das cetonas cíclicas. Este monoterpene é o componente maioritário do óleo essencial da hortelã (*Mentha spicata*) que pode ser obtido através das folhas desta planta [Costa, *et al*,2012].

A carvona apresenta propriedades estomáquicas e carminativas, sendo a esta também atribuída ação galactagoga e emenagoga. Na indústria farmacêutica de cosméticos e alimentícia pode ser utilizada como flavorizante e saporificante [Costa, *et al*,2012].

Este composto possui duas ligações C=C, estando uma localizada no grupo isopropenil da cadeia lateral, e a outra constitui a cetona α,β -insaturada da ciclohexenona. A primeira ligação C=C é rica em elétrons enquanto a segunda é deficiente em elétrons. Ambos os grupos alceno podem sofrer reações de epoxidação originando epóxidos, podendo necessitar de diferentes condições e reagentes [Neves, 2012].

→ Redução da carvona:

Existem três ligações duplas na carvona capazes de se reduzir originando novos compostos. O produto da redução depende das condições e reagentes utilizados. A hidrogenação catalítica da carvona pode dar carvomentol ou carvomentona. O zinco e o ácido acético reduzem a carvona originando a dihidrocarvona. A redução MPV usa propan-2-ol e isopropóxido de alumínio reduzindo apenas o grupo carbonilo, dando origem ao carveol. A hidrazina e o hidróxido de potássio originam o Limoneno através de redução de Wolff-Kishner [http://en.wikipedia.org/wiki/Carvone, acessado a 29-06-2014].

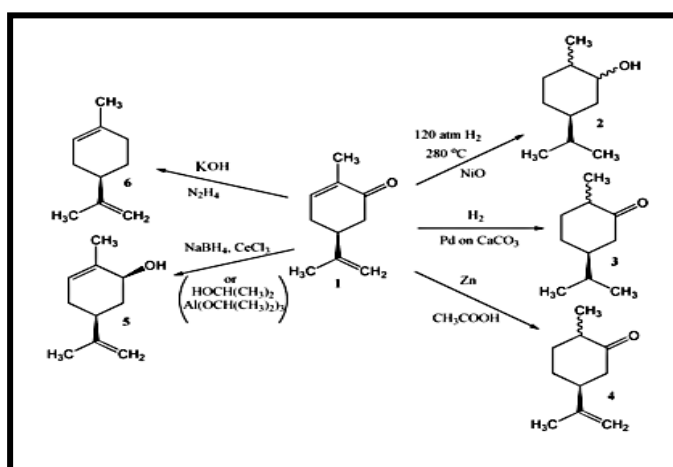


Figura 2.10: Produtos que se podem obter da reação da redução da Carvona, com diferentes reagentes. [Consultado em <http://en.wikipedia.org/wiki/Carvone>, consultado a 29-06-2014]

→ **Oxidação da carvona:**

A oxidação da carvona também pode levar a uma variedade de produtos. Na presença de uma base, tal como Ba(OH)₂, a carvona é oxidada pelo oxigénio originando a dicetona. O epóxido é formado com H₂O₂. A carvona pode sofrer clivagem utilizando ozono seguido por vapor, dando a dilactona, enquanto o KMnO₄ dá o produto [http://en.wikipedia.org/wiki/Carvone, consultado a 29-06-2014].

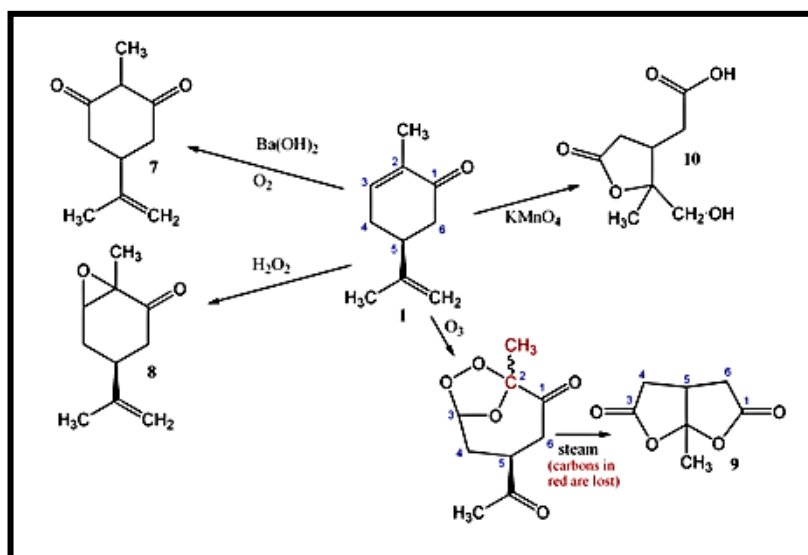


Figura 2.11: Produtos que se podem obter da reação da oxidação da Carvona, com diferentes reagentes. [Consultado em http://en.wikipedia.org/wiki/Carvone, consultado a 29-06-2014]

→ **Epoxidação da carvona:**

Os epóxidos são éteres cíclicos com anéis de três membros, que de acordo com a nomenclatura IUPAC são denominados de oxiranos. São compostos químicos muito reativos devido à alta reatividade do anel oxirano torcido. Apresentam interesse em sínteses orgânicas, pois são importantes intermediários [Neves, 2012]. O método mais largamente utilizado para a síntese de epóxidos é a reação de um alceno com um peroxiácido, podendo ser, também, preparados através da oxidação catalítica do etileno ou tratamento básico de halohidrinás. No seguinte esquema observa-se um exemplo de epoxidação, através da reação de um alceno e um peroxiácido, originando um epóxido e um ácido carboxílico [Neves, 2012].

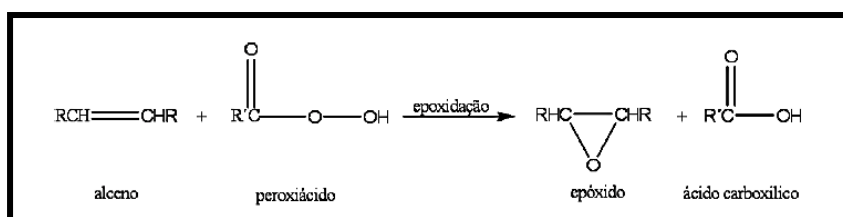


Figura 2.12: Exemplo de epoxidação, através da reação de um alceno e um peroxiácido. [Adaptado de Neves,2012.]

Nesta reação, o peroxiácido transfere um átomo de oxigênio para o alceno num mecanismo cíclico de etapa única, formando um complexo de transição bicíclico. A velocidade da reação aumenta para alcenos substituídos com grupos doadores de elétrons, tais como grupos alquilo, diminuindo significativamente para grupos recetores de elétrons. O mecanismo proposto está representado no seguinte esquema [Neves, 2012].

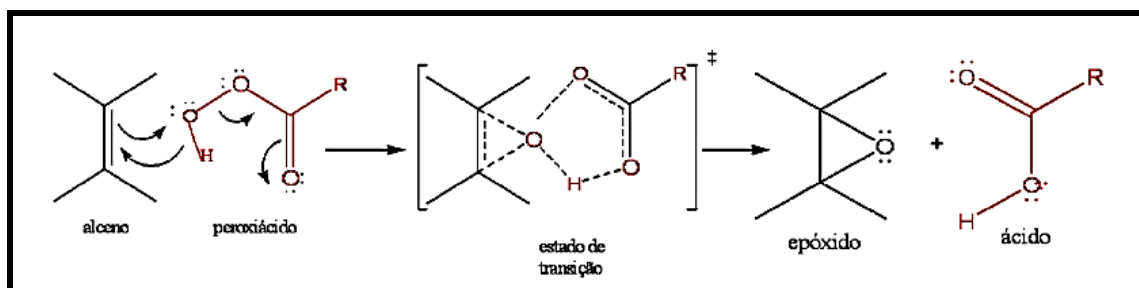


Figura 2.13: Mecanismo do peroxiácido com um alceno.
[Adaptado de Neves, 2012]

A conversão de alcenos deficientes em elétrons, tais como cetonas α,β -insaturadas, em epóxidos (α,β -epóxicetonas) é extremamente útil nas sínteses orgânicas, devido à transformação dos grupos funcionais e à utilidade sintética dos intermediários resultantes de transformações posteriores de cetonas. A epoxidação destes compostos é geralmente realizada com H_2O_2 sob condições altamente alcalinas, usando bases ou sais, como o NaOH e o KOH ou Na_2CO_3 e K_2CO_3 . O uso dessas bases é indesejável por serem perigosas, levando à produção de uma vasta quantidade de resíduos [Gonzaga, 2008].

A seletividade da reação de epoxidação pode ser facilmente controlada através da escolha adequada de reagentes. Os peroxiácidos e o H_2O_2 alcalino são dois reagentes geralmente utilizados nas reações de epoxidação, sendo que os peroxiácidos atuam melhor com alcenos ricos em elétrons, enquanto o H_2O_2 alcalino reage preferencialmente com o elétron deficiente de cetonas α,β -insaturadas e de aldeídos [Gonzaga, 2008].

A epoxidação de alcenos com ácido *m*-cloroperbenzóico (AMCPB) e H_2O_2 alcalino tem sido aplicada ao longo dos anos. A seletividade dos respectivos peroxiácidos e H_2O_2 alcalino, na epoxidação de alcenos ricos em elétrons e compostos carbonílicos α,β -insaturados, pode ser demonstrada através da escolha de um substrato orgânico que contenha ambas as funcionalidades. Um substrato ideal para o ensaio é a (R)-(-)-carvona. As reações da (R)-(-)-carvona com AMCPB e H_2O_2 alcalino foram estabelecidas de modo a serem regiospecíficas com bons rendimentos de reação podendo originar a 8,9-epoxicarvona, a 1,6-epoxicarvona e a (1,6),(8,9)-diepoxicarvona [Gonzaga, 2008].

As posições dos anéis oxirano recém formados podem ser facilmente identificadas por espectroscopia de RMN de próton [Gonzaga, 2008].

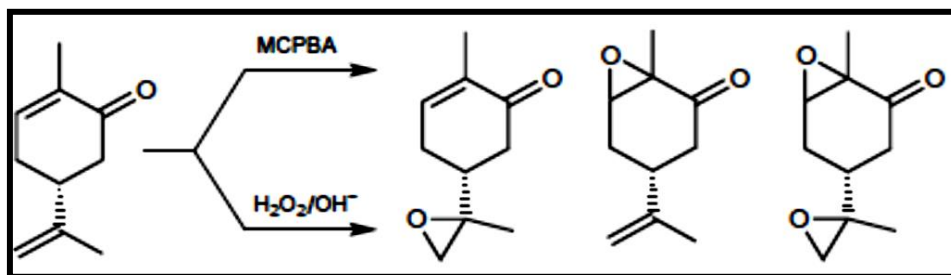


Figura 2.14: Produtos da carvona obtidos através da reação com os oxidantes MCPBA e H_2O_2/OH^- .

Com a crescente preocupação ambiental, o desenvolvimento de um "protocolo verde" usando um "oxidante verde", como o H_2O_2 , numa combinação com catalisadores sólidos reutilizáveis, tem apresentado elevado interesse. No entanto, a substituição de bases líquidas por catalisadores básicos sólidos tem como vantagem a diminuição de problemas relacionados com a corrosão e o meio ambiente, permitindo a fácil separação e recuperação do catalisador [Gonzaga, 2008].

Vários catalisadores heterogêneos básicos têm sido propostos para a epoxidação de cetonas α,β -insaturadas, tais como, suportes heteropoliácidos, materiais que contêm íons de titânio e hidrotalcitas, sendo a hidrotalcita a mais estudada [Neves, 2012].

A hidrotalcita, $Mg_{10}Al_2(OH)_{24}CO_3$, na presença de um oxidante, constituído por H_2O_2 e nitrilo, tem uma alta atividade catalítica na epoxidação de alcenos não funcionalizados.

Nesta epoxidação, o H_2O_2 reage com o grupo hidroxilo na superfície da hidrotalcita formando uma espécie aniônica, o perhidroxilo (HOO^-) que, por sua vez, ataca o nitrilo nucleofilicamente, originando um ácido peroxicarboxílico como oxidante intermediário ativo [Neves, 2012].

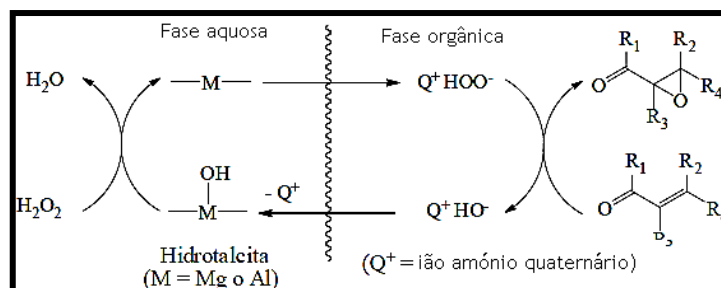


Figura 2.15: Mecanismo do uso do catalisador Hidrotalcita. [Adaptado de Neves, 2012]

2.5 Atividade antibacteriana

Nos últimos anos, tem vindo a crescer o interesse pelos componentes biologicamente ativos, isolados a partir de espécies de plantas para a eliminação de microrganismos patogénicos, devido à resistência que estes apresentam relativamente a antibióticos e também porque alguns são compostos ecologicamente mais seguros [Rodrigues; 2009/2010].

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

Uma grande variedade de óleos essenciais são conhecidos por possuir propriedades antimicrobianas e em muitos casos, essa atividade é devido à presença de constituintes ativos, principalmente atribuídos aos terpenos tais como os monoterpenos, sesquiterpenos e álcoois relacionados e outros hidrocarbonetos e fenóis [Rodrigues; 2009/2010].

O carácter lipofílico do seu esqueleto hidrocarbonado e o carácter hidrofílico dos seus grupos funcionais são os fatores de maior importância na ação antimicrobiana dos componentes dos óleos essenciais. A categoria proposta para comparar atividades tem sido a seguinte: fenóis > aldeídos > cetonas > álcoois > ésteres > hidrocarbonetos [Rodrigues; 2009/2010].

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste [Ostrsky; *et al*;2008].

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos é cada vez mais necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infeções oportunistas fatais, associadas a AIDS, quimioterapia, antineoplásica e transplantes. O estudo de agentes antimicrobianos tem uma vasta abrangência, sendo estes o ponto crucial em vários setores do campo Farmacêutico e cosmético [Ostrsky; *et al*;2008].

A atividade antibacteriana de um agente anti-infeccioso é definida pelo seu espectro antibacteriano, ou seja pelo conjunto de agentes patogénicos que são afetados pelas concentrações de composto, sem causar toxicidade. Portanto compostos antibacterianos são todos os que ocorrem de forma natural, biosintética ou obtidos totalmente em laboratório. Um agente antibacteriana deve atender a pelo menos três condições: possuir atividade antibacteriana; desenvolver-se a baixas concentrações e ser tolerado pelo hospedeiro [Paredes,*et al*; 2004].

2.5.1 Modo de ação antibacteriana

Apesar das propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais e dos seus componentes terem sido revistos no passado, o seu mecanismo de ação não foi estudado em grande detalhe [Burt, 2004]. Considerando um grande número de diferentes grupos de componentes químicos presentes nos óleos essenciais, é muito mais provável que a sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um só mecanismo específico mas que existem vários alvos na célula. As localizações ou os mecanismos de ação que os componentes dos óleos essenciais podem ter na célula bacteriana são indicados na seguinte figura [Burt, 2004]:

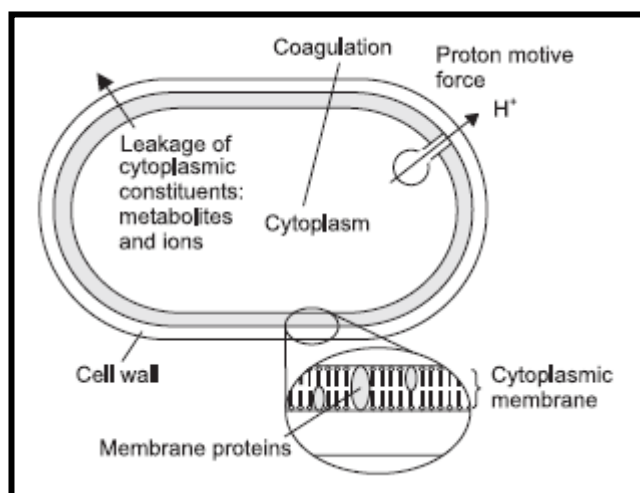


Figura 2.16: Mecanismos na célula bacteriana dos sítios de ação dos componentes dos óleos essenciais: degradação da parede celular; dano da membrana citoplasmática; dano das proteínas membranares; fuga dos componentes da célula; coagulação do citoplasma e diminuição da força motriz dos prótons. [Adaptado de Burt, 2004]

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

Os componentes dos óleos essenciais também parecem agir nas proteínas da célula embebidas na membrana citoplasmática. As enzimas tais como as ATPases são conhecidas por estarem localizadas na membrana citoplasmática e por estarem delimitados por moléculas de lípidos. Dois possíveis mecanismos têm sido sugeridos pelo qual os hidrocarbonos cíclicos poderiam atuar sobre estes. Hidrocarbonetos lipofílicos podem-se acumular na bicamada lipídica e distorcer a interação lípidoproteína. Alternativamente, a interação direta dos componentes lipofílicos com partes hidrofóbicas da proteína é possível [Burt, 2004].

2.6 Sinergismo e Antagonismo entre os componentes dos Óleos Essenciais

A atividade intrínseca de um óleo pode-se visualizar quando se relaciona a configuração química dos componentes, as proporções em que estão presentes e as interações que existem entre eles. Um efeito aditivo é observado quando o efeito combinado é igual à soma dos efeitos individuais. O antagonismo é observado quando o efeito de um ou ambos os componentes é menor quando são aplicadas em conjunto do que quando aplicadas individualmente. O sinergismo é observado quando o efeito das substâncias combinadas é maior do que a soma dos efeitos individuais [Burt, 2004].

Quanto às suas propriedades biológicas, os óleos essenciais são misturas complexas de numerosas moléculas, e pode-se por em questão se os seus efeitos biológicos são o resultado de um sinergismo de todas as moléculas ou se reflete somente as das principais moléculas presentes nos níveis mais altos. Geralmente, os principais componentes refletem as características biofísicas e biológicas dos óleos essenciais das quais foram isoladas, a amplitude dos seus efeitos são apenas dependentes da sua concentração, quando testados sozinhos ou incluídos nos óleos essenciais. Deste modo, as funções sinérgicas de várias moléculas contidas num óleo essencial, em comparação à ação de um ou dois componentes principais do óleo, parecem ser questionáveis. Contudo, é possível que a atividade dos componentes principais seja modulada por outras moléculas principais. Além disso, é provável que diversos componentes dos óleos essenciais desempenhem um papel na definição da fragrância, da densidade, da textura, da cor e acima de tudo, na penetração das células, atracão lipofílica ou hidrofílicas e a fixação nas paredes e membranas das células, e distribuição celular. A distribuição do óleo nas células é muito importante, pois determina diferentes tipos de reações radicais produzidas, dependendo da sua compartimentação da célula. Neste sentido, para fins biológicos, é mais instrutivo o estudo de um óleo integral do que algum dos seus componentes, porque o efeito do sinergismo parece ser mais significativo [Bakkali et al, 2008].

2.7 Métodos para avaliação da atividade antibacteriana

O reconhecimento do padrão de sensibilidade à terapêutica antimicrobiana é fundamental, na medida em que se assiste ao aparecimento de estirpes microbianas resistentes a alguns antibióticos que, devido a este facto deixam de ser eficazes no tratamento de infecções. Contudo, o antibiograma não deverá ser efetuado em espécies bacterianas de padrões de suscetibilidade e resistência conhecidas. Um exemplo é o *Streptococcus B-hemolítico*, visto que todas as estirpes são sensíveis à penicilina. Estirpes resistentes a *B-lactamase* têm sido isoladas com grande frequência, devendo ser identificadas antes do início da terapêutica antibiótica [Ferreira *et al*, 2010].

Segundo a NCCLS, os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo que contribua a um processo infeccioso que justifique terapêutica antimicrobiana, sempre que a sua sensibilidade não possa ser predita de maneira confiável a partir do conhecimento da identidade do organismo. Os testes de sensibilidade são indicados, com maior frequência, quando se acredita que o organismo causativo pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos geralmente usados.

Existem várias técnicas para determinar a sensibilidade à terapêutica antibiótica, mas, na essência, baseiam-se na determinação da capacidade que um microrganismo tem de se multiplicar *in vitro*, na presença de diferentes fármacos [Ferreira *et al*, 2010].

Em bacteriologia, o teste de sensibilidade aos antibióticos ou antibiograma é habitualmente executado numa placa de Petri, com meio de cultura sólido (meio *Müller-Hinton Agar*). Na placa semeada por inundação ou espalhamento (suspensão de bactérias semeada sobre toda a superfície do meio de cultura), verifica-se que os discos de papel com antibiótico ou o poço com antibiótico nele inserido, causam, se a bactéria lhes é sensível, um halo de inibição de crescimento bacteriano, enquanto que se a bactéria lhes é resistente não forma halo de inibição suficiente ou aparece crescimento bacteriano à volta do disco ou poço [Ferreira *et al*, 2010].

Existem vários métodos descritos na literatura propostos para mensurar a atividade antimicrobiana. Estes diferem largamente e existem fatores importantes que influenciam os resultados, tais como o tempo de exposição do microrganismo testado, a utilização de controlos positivos e negativos, a composição do quimioterápico entre outros [Nascimento *et al*, 2006].

É possível, através de diversas técnicas de *screening* definir, se o extrato de uma determinada planta ou qualquer outro composto, possui atividade 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 extrato a ser testado, mesmo no que se refere às técnicas mais simples [Alves, *et al*, 2008].

Os dois métodos mais comumente usados para o *screening* de extratos com potencial antibacteriano são o de difusão em ágar e diluição em caldo [Alves, *et al*, 2008].

Os resultados obtidos por cada um desses métodos podem diferir devido a fatores como variações entre os testes, a exemplo do crescimento microbiano, exposição de microrganismos ao óleo, a solubilidade do óleo ou dos seus componentes e o uso e quantidade de emulsificador. Os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pela NCCLS e desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos. Nos testes de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, a metodologia proposta pelo NCCLS não pode ser seguida à risca, devido às propriedades químicas que estes apresentam [Nascimento, *et al*, 2007].

Na maioria dos estudos, as zonas de inibição formadas pelos óleos são comparadas com as obtidas pelos antibióticos, no entanto, é importante destacar que esses resultados não devem ser simplesmente comparados, pois as particularidades apresentadas pelos óleos, bem como, outras variáveis (técnica usada, o meio de crescimento, o microrganismo teste) devem ser tidas em consideração [Nascimento, *et al*, 2007].

As substâncias normalmente testadas pelos métodos propostos pelo NCCLS têm natureza hidrófila e os testes são padronizados para esta condição. Nos ensaios com óleos essenciais, deve-se ter em consideração que estes 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 suscetibilidade antimicrobiana um dos empecilhos encontrados para a realização desse tipo de estudo [Nascimento, *et al*, 2007].

Outro problema observado é quando se utiliza a técnica de difusão em ágar, pois a difusão irregular dos componentes lipófilos dos óleos resulta em concentrações desiguais do óleo no ágar causando a formação de regiões com atividade 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 expressem a realidade, sendo, por isso, incapazes de comparar diretamente a verdadeira atividade dos óleos. Com o intuito de melhorar a qualidade dos procedimentos com óleos essenciais, tornou-se comum a utilização de solventes, detergentes, ou agentes emulsificadores, como são exemplo o Tween 20, Tween 80, DMSO e etanol, para facilitar a dispersão dos mesmos através do meio de cultura [Nascimento, *et al*, 2007].

As propriedades físicas e químicas desses agentes são importantes para auxiliar na visualização da atividade antimicrobiana dos óleos, no entanto, deve-se ter em conta que ao introduzir um agente emulsificador, este está sujeito a possíveis interações com a substância em teste, bem como, possuir atividade antimicrobiana. Esses efeitos podem ser acentuados ou minimizados dependendo do modo de preparo da solução óleo-agente emulsificador. Por

isso, recomenda-se uma relação adequada entre o óleo e o emulsificador [Nascimento, *et al*, 2007].

A interferência do agente emulsificador na suscetibilidade 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 emulsificadores podem agir antagónica ou sinergicamente com componentes ativos do óleo [Nascimento, *et al*, 2007].

Outros fatores podem interferir nos valores da CIM obtidos através de métodos de difusão e diluição: condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa oxigênio), meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados na emulsão óleo-água [Nascimento, *et al*, 2007].

Existe um interesse em aumentar o conhecimento sobre as concentrações inibitórias dos óleos essenciais, em busca do equilíbrio entre a aceitabilidade e a eficácia da ação antimicrobiana. A CIM pode ser definida em estudos *in vitro* e *in vivo*. Os métodos disponíveis podem ser divididos em grupos: difusão, diluição, impedância e densidade ótica. Dentre os métodos descritos, a diluição demonstrou ser a que melhor disponibiliza dados quantitativos, enquanto a difusão em placa de Petri consiste num método qualitativo, portanto estes métodos (diluição e difusão) não são necessariamente comparáveis. Os resultados obtidos por cada um deles podem diferir devido a fatores intrínsecos aos testes [Nascimento, *et al*, 2007].

Na técnica de difusão em disco e em ágar 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 ágar [Nascimento, *et al*, 2007].

2.7.1 Métodos de difusão em Agar

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa [Ostrosky et al, 2008] em meio de cultura sólido em placa de Petri, a inocular com uma dada suspensão bacteriana por espalhamento à superfície do meio [Ferreira et al, 2010]. Relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada [Ostrosky et al, 2008].

A aplicação do método de difusão limita-se a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação comparativa frente a um padrão biológico de referência (controlo positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos [Ostrosky et al, 2008].

O método de difusão em ágar pode ser realizado através das técnicas do disco, do poço ou *template* [Alves, *et al*, 2008].

Quando se utiliza o método de difusão vários são os fatores que se podem tornar fontes de erros, como por exemplo a composição do meio de cultura, a preparação incorreta do meio de cultura, a espessura do meio de cultura, a densidade incorreta do inóculo, o uso de swab com excesso de caldo para inoculação das placas, a temperatura e tempo de incubação inadequados, interações entre o antimicrobiano e o meio de cultura, utilização errada da atmosfera de CO₂ quando esta é necessária, leitura prematura, erro na medida das zonas de inibição ou uso de culturas mistas ou contaminadas [Alves, *et al*, 2008].

De acordo com a dimensão do halo, os microrganismos podem ser classificados como:

- Sensíveis: quando o diâmetro da zona de inibição é maior ou não mais do que 3mm que o controlo positivo;
- Moderadamente sensíveis: apresentam um halo de inibição maior que 2 mm, mas menor que o controlo positivo de mais de 3 mm;
- Resistentes: com um diâmetro igual ou menor que 2 mm [Ostrosky *et al*, 2008].

Como controlo positivo, utiliza-se e emprega-se um quimioterápico padrão, e como controlo negativo, o solvente utilizado para a dissolução [Ostrosky *et al*, 2008] do composto químico.

As condições de incubação recomendadas são temperatura de 35-37°C para bactérias durante 24 a 48 horas. 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 ágar [Ostrosky *et al*, 2008].

2.7.1.1 Teste de difusão em disco de papel:

O teste de difusão em disco é aceite pelo FDA e estabelecido como padrão pelo NCCLS [Ostrosky *et al*, 2008].

O teste de difusão em disco consiste na aplicação de 10 µL da solução de agente antimicrobiano em discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro, nas diferentes concentrações a serem testadas variando de 31,25 a 500µg/mL [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 cargas microbianas, 10⁸ UFC/mL para bactérias, 10⁶ UFC/mL para leveduras e 10⁴ para esporos/mL. A disposição dos discos deve ser tal que a

sua distância até à lateral da placa deve ser 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 profundidade recomendada é de aproximadamente 4 mm. [Ostrosky *et al*, 2008]

2.7.1.2 Cilindros de aço inoxidável:

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

2.7.1.3 Perfuração em agar (poços):

Nesta técnica, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 5-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicar as substâncias que se pretendem analisar [Ostrosky *et al*, 2008].

2.7.2 Recursos a utilizar para melhorar a leitura do diâmetro dos halos nos métodos de difusão em Agar

A espessura e a uniformidade do ágar são essenciais para a boa resolução dos resultados. Deve controlar-se rigorosamente o volume de ágar transferido para a placa de Petri, e o meio de cultura a 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 à diminuição da espessura do meio da placa. A pré-incubação é utilizada quando se pretende diminuir a dimensão do halo e a pré-difusão para aumentar a zona de inibição [Ostrosky *et al*, 2008].

2.7.3 Métodos de difusão em Caldo

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

O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. A sua desvantagem é a dificuldade na deteção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos. Como controlo positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada de microrganismos em teste, e como controlo negativo o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana [Ostrosky *et al*, 2008].

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

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

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

Duas metodologias podem ser empregadas: macro e microdiluição [Ostrosky *et al*, 2008].

2.7.3.1 Macrodiluição:

A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando entre 1 e 10 mL. Por ser trabalhoso, ocupar muito tempo, requerer muito espaço em laboratório e gerar grande quantidade de resíduos, é usado um pequeno número de réplicas [Ostrosky *et al*, 2008].

Apresenta como vantagem a determinação da CIM, e como desvantagens a quantidade de reagentes utilizados, o espaço necessário para armazenar todos os tubos e a possibilidade da ocorrência de erros durante a preparação das concentrações antimicrobianas [Nogueira et al,].

Normalmente, usa-se uma temperatura de 36°C ± 1°C, durante 18-24 h para os microrganismos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Após incubação examinam-se os tubos de ensaio e determinam-se a CMI e a CMB. A CMI e a CMB podem ser detetadas a “olho nu” ou através de aparelhos baseados em leitura ótica [Ferraro, *et al*, 2003]. Por ser trabalhoso, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gerar grande quantidade de resíduos é usado um pequeno número de réplicas [Alves et al,2008]

2.7.3.2 Microdiluição:

Esta técnica corresponde à miniaturização da técnica de macrodiluição em tubos [Nogueira *et al*].

A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, e envolve o uso de pequenos volumes de caldo (entre 0,1 e 0,2 mL de meio de cultura) em placas estéreis, próprias para a microdiluição, que possuem poços de fundo redondo ou cónico [Ostrosky *et al*, 2008]. Na placa de microdiluição, pode ser colocado um número variado de até 12 antimicrobianos, em diferentes concentrações. As placas podem conter o antimicrobiano liofilizado ou congelado [Nogueira *et al*].

Um investigador, utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais e observou inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto outras permaneciam em suspensão [Ostrosky *et al*, 2008].

Tem como vantagens o facto de ser económico a nível de espaço e reagentes; a possibilidade de preparar uma grande quantidade de placas a partir da mesma série de diluições antimicrobianas; a obtenção de um resultado quantitativo (CIM), entre muitas outras [Nogueira *et al*].

2.7.4 Método do efeito do Vapor do óleo essencial

Esta técnica consiste em verificar se o vapor do óleo essencial tem efeito antimicrobiano contra um determinado microrganismo. O teste é feito em placas com meio agar inoculado com o microrganismo a testar. 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 \approx 1 cm [Lisin *et al*, 1999].

2.7.5 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 direta 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 Dehidroresorufina (incolor) [Pombo, 2011].

É preparada em NaCl e esterilizada (filtrada); pode ser guardada a 4°C durante 1 semana [Pombo, 2011].

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

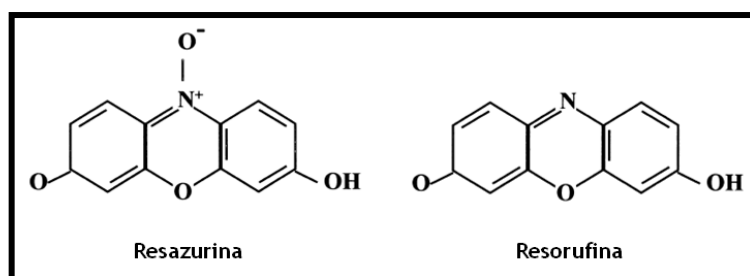


Figura 2.17: Estruturas da Resazurina (forma oxidada) e Resorufina (forma reduzida).
[Adaptada de Pombo, 2011].

2.8 Fatores que interferem nos métodos de Avaliação Antibacteriana

Tem-se desenvolvido métodos de investigação *in vitro* que produzam resultados confiáveis e possam ser reproduzidos e validados. Contudo, tem sido uma tarefa difícil, devido às peculiaridades que os óleos apresentam, tais como: volatilidade, insolubilidade em água e sua complexidade química, características que interferem significativamente nos resultados. Estas dificuldades tornam os resultados disponíveis na literatura difíceis de comparar. Por outro lado, os métodos usados diferem largamente e fatores importantes que influenciam os resultados são frequentemente negligenciados [Nascimento et al, 2008].

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

▪ Meios de cultura:

Os meios de cultura utilizados em microbiologia correspondem a soluções “carregadas” de nutrientes utilizados para promover o crescimento dos microrganismos em laboratório [Madigan *et al*, 2004].

Os meios de cultura devem proporcionar um crescimento adequado dos organismos ao serem testados e não conter substâncias que afetem a atividade antimicrobiana em estudo. Deve controlar-se rigorosamente o volume de agar transferido para a placa de Petri, e o meio de cultura deve ser distribuído de modo a evitar formação de estrias superficiais e bolhas. No método de difusão, a espessura e concentração do agar podem influenciar os resultados dos ensaios [Ostrosky *et al*, 2008].

Entre outros meios de cultura utilizados para o teste de suscetibilidade de bactérias, o Müller-Hinton agar é o mais citado [Ostrosky et al, 2008]. Considera-se que este é o melhor meio para testes de sensibilidade a antibióticos contra bactérias porque, apresenta uma boa reprodutibilidade, possui baixos teores de inibidores de sulfonamida, trimetoprim e tetraciclina e produz crescimento satisfatório da maioria dos patógenos. Além disso, existe um grande conjunto de dados e experiências relativos a testes de sensibilidade antimicrobiana realizados com este meio [Ferraro et al, 2003].

Há substâncias no meio de cultura que influenciam a suscetibilidade do teste. A timidina antagoniza a atividade de sulfonamidas e trimetoprimas, conduzindo a um resultado falso de resistência a tais agentes [Ostrosky et al, 2008].

- **pH:**

Afeta de forma muito marcada o crescimento microbiano. Cada espécie tem um intervalo de pH e um valor de pH que lhe permite obter uma taxa de crescimento ótimo. Assim, existem os acidófilos (pH entre 0-1 e 5), os neutrófilos (pH entre 5,5 e 8,0), os alcalófilos (pH entre 8,5 e 11,5) e ainda os alcalófilos extremos (pH com valores de 10,0 ou acima). Variações drásticas no pH citoplasmático causam perturbações no metabolismo celular, inibindo a actividade enzimática, e proteínas transportadoras membranares, podendo conduzir à perda da viabilidade celular [Ferreira *et al*, 2010].

Portanto, o pH do meio 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 antibacteriana de substâncias ácidas como a penicilina. Atmosferas com concentrações elevadas de CO₂ devem ser evitadas, já que alteram significativamente o pH da superfície, sendo capaz de alterar e afetar a actividade antibacteriana de alguns agentes [Ostrosky *et al*, 2008].

- **Disponibilidade de oxigénio:**

Os microrganismos diferem bastante quanto às suas necessidades ou tolerância ao oxigénio. Podem dividir-se em vários grupos, com base nos seus comportamentos em relação ao O₂. Podem ser aeróbios estritos, anaeróbios aerotolerantes, anaeróbios estrito [Ferreira *et al*, 2010]. Conforme o metabolismo do microrganismo testado, aeróbicos, anaeróbicos ou facultativos, as condições de disponibilidade desse gás pode influenciar na sua multiplicação [Ostrosky *et al*, 2008].

- **Inóculo:**

A suscetibilidade dos agentes antimicrobianos é dependente da quantidade do inóculo. A quantidade inoculada deverá ser estabelecida para cada método desenvolvido. No teste de suscetibilidade de metilicina contra *Staphylococcus* por exemplo, esse padrão deve ser de 10⁶ UFC/mL. Para os testes de diluição em caldo, o padrão é de 10⁵ UFC/mL no início do período de incubação [Ostrosky *et al*, 2008].

A preparação do inóculo nos métodos de diluição e difusão deve ser feita a partir de 4 ou 5 colónias da cultura pura do microrganismo a testar. O padrão de leitura 0,5 na escala MacFarland corresponde à densidade de aproximadamente 10⁸ UFC/ml. Alternativamente, o inóculo pode ser ajustado fotometricamente ou por diluição padronizada do caldo nutriente, se a densidade de tais culturas for razoavelmente constante [Ostrosky *et al*, 2008].

As placas devem ser inoculadas em até 30 minutos após a padronização do inóculo, para que a densidade celular não esteja alterada [Ostrosky *et al*, 2008].

▪ **Condições de incubação:**

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

2.9 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 infetado. Os antibióticos antibacterianos são produzidos por actinomicetes, fungos e bactérias [Sousa,2006].

Os antibióticos naturais são produtos do metabolismo secundário dos microrganismos e distinguem-se dos antibióticos sintéticos ou semissintéticos, obtidos a partir do 6-APA como é o caso da ampicilina [Sousa,2006].

Desde a descoberta da penicilina através de Fleming, muitos antibióticos têm sido estudados pelo facto de poderem danificar patógenos de várias maneiras [Willey *et al*, 2011}. Os antibióticos podem ser classificados com base na sua estrutura química- por exemplo β -Lactâmico, macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, polienos ou polipeptídeo [Willey *et al*, 2011}.

2.9.1 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são um grupo de antibióticos com estrutura química complexa, parecendo-se entre si na sua atividade antibacteriana, nas atividades farmacocinéticas e na toxicidade. Os principais agentes são a gentamicina, a estreptomicina, a amicacina, a tobramicina, a netilmicina e a neomicina. [Rang *et al*, 2007].

- Mecanismo de ação

Os aminoglicosídeos são considerados habitualmente antibióticos inibidores da síntese proteica. A sua penetração através da membrana celular da bactéria depende parcialmente do transporte ativo dependente de oxigénio por um sistema transportador de poliaminas. Apresentam uma ação mínima contra microrganismos anaeróbios. O cloranfenicol bloqueia este sistema de transporte. O efeito dos aminoglicosídeos é bactericida e é reforçado por agentes que interferem com a síntese da parede celular [Rang *et al*, 2007].

- Resistência

A resistência aos aminoglicosídeos está a tornar-se num problema. Ocorre através de vários mecanismos diferentes, sendo o mais importante a inativação por enzimas microbianas, das quais nove ou mais são conhecidas. A amicacina foi desenvolvida de propósito, como substrato inadequado para estas enzimas, porém alguns microrganismos desenvolveram enzimas que inativam também este agente. A resistência, como resultado da deficiência na

penetração, pode ser largamente superada pelo uso concomitante de penicilina e/ou vancomicona [Rang *et al*, 2007].

- Espectro antimicrobiano

Os aminoglicosídeos são efetivos contra muitos microrganismos Gram-negativos e contra alguns Gram-positivos. Como já referido anteriormente são utilizados maioritariamente contra microrganismos entéricos Gram-negativos e na sepse. A gentamicina é o aminoglicosídeo mais comumente usado [Rang *et al*, 2007].

- Aspetos farmacocinéticos

Os aminoglicosídeos são poliacetatos, e portanto, altamente polarizados. Estes não são absorvidos no trato gastrointestinal e são administrados usualmente por via intramuscular ou intravenosa. Cruzam a placenta, mas não penetram no humor vítreo do olho. A meia vida plasmática é de 2-3 horas. A eliminação destes do organismo é inteiramente realizada por filtração glomerular dos rins. Se a função renal estiver comprometida, a acumulação ocorre rapidamente resultando num aumento de efeitos tóxicos como consequência [Rang *et al*, 2007].

- Efeitos adversos

Podem ocorrer efeitos tóxicos graves relacionados com a dose de aminoglicosídeos, sendo os principais riscos a ototoxicidade e a nefrotoxicidade [Rang *et al*, 2007].

A ototoxicidade envolve lesões progressivas e eventualmente destruição das células sensitivas da cóclea e do grão vestibular na orelha. A estreptomicina e gentamicina têm maior probabilidade de interferir com a função vestibular [Rang *et al*, 2007].

A nefrotoxicidade consiste na lesão dos túbulos renais e pode ser revertida se o uso do fármaco for interrompido [Rang *et al*, 2007].

2.9.1.1 Antibiótico Gentamicina

Este antibiótico pertence ao grupo dos aminoglicosídeos. É sintetizada pela bactéria *Micromonospora purpúrea* e existe em três formas semelhantes, identificadas como Gentamicina C1, C2 e C1a [Sousa, 2006].

A gentamicina apresenta incompatibilidade química, *in vitro*, com β -lactamas. Provoca a abertura nucleofílica do anel β -lactâmico, inativando-o e por sua vez este reage com o grupo metilamino da gentamicina, originando uma amina farmacologicamente inativa. Esta interação é lenta e só é significativa, do ponto de vista clínico, quando a gentamicina e o β -lactâmico são misturados em líquido de perfusão parenteral de administração lenta. O teor de

inativação *in vitro* depende da temperatura, tempo de contacto, composição do meio e da concentração do β -lactâmico [Sousa, 2006].

A sua atividade antibacteriana abrange uma ampla variedade de agentes patogénicos Gram-negativos e Gram-positivos, incluindo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*, *Enterobacterias*, *Proteus*, *Escherichia coli*, entre outros. Por exemplo, bactérias causadoras de infeções do segmento anterior ao olho, como *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus*, podem ser eficientemente erradicadas através dum tratamento local com gentamicina [Sousa, 2006].

Esta é um aminoglicosídeo utilizado em infeções hospitalares graves causadas por bacilos Gram-negativos e *Enterococcus Sp.* Por exemplo, em pessoas alérgicas a cefalosporinas, recomenda-se como antibioticoprofilaxia cirúrgica (essencial para evitar complicações pós cirúrgicas e maiores danos à saúde), a associação entre clindamicina com outro fármaco - a gentamicina [Souza et al].

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

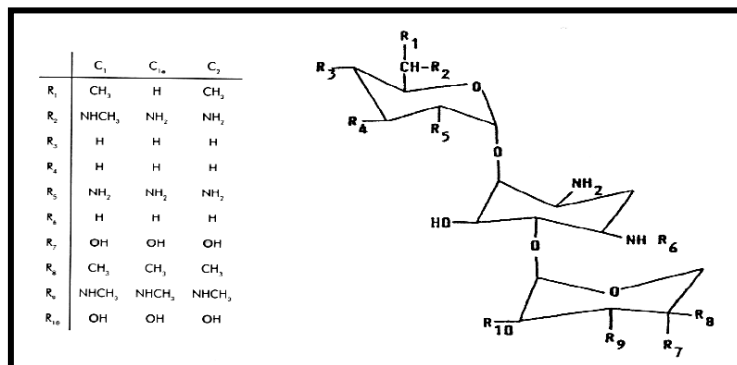


Figura 2.18: Composição química e estrutura da Gentamicina.
[Adaptado de Pombo, 2011].

2.9.2 Antibióticos β -lactâmicos

Este tipo de antibióticos constituem o grupo de antibióticos mais importante, dada a sua eficácia terapêutica e a sua baixa toxicidade para os animais, incluindo o Homem [Sousa, 2006].

Os antibióticos β -lactâmicos impedem a biossíntese do peptidoglicano, molécula tipicamente procariótica, e dada a ausência desta macromolécula nas células eucarióticas, possuem uma baixa toxicidade seletiva antibacteriana [Sousa, 2006].

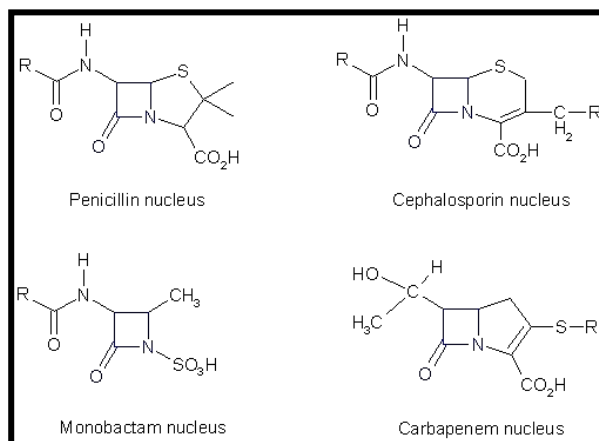


Figura 2.19: Estrutura química dos principais grupos beta-lactâmicos. [Adaptada de Rang, 2007]

Possuem a característica comum de exibir um anel β -lactâmico, constituído por três átomos de carbono e um de azoto com radicais substituintes [Sousa, 2006], farmacologicamente ativo, impedindo a biossíntese do peptidoglicano, na sua fase parietal [Ferreira *et al*, 2010]. Atuam na fase final da biossíntese do peptidoglicano. A biossíntese do peptidoglicano na fase parietal requer a quebra de ligações covalentes no peptidoglicano por ação das autolisinas bacterianas, para permitir a inserção dos novos “tijolos” de peptidoglicano recém sintetizados no citoplasma e transportados através da membrana celular bacteriana. As enzimas D-D-carboxipeptidases-transpeptidases, localizadas no folheto externo da membrana celular, promovem o estabelecimento de pontes interpeptídicas (“cross-linking”) entre as cadeias peptídicas vizinhas do peptidoglicano em crescimento [Sousa, 2006]. Os β -lactâmicos, apenas são ativos em bactérias em crescimento [Sousa, 2006].

2.9.2.1 Antibiótico Penicilina G

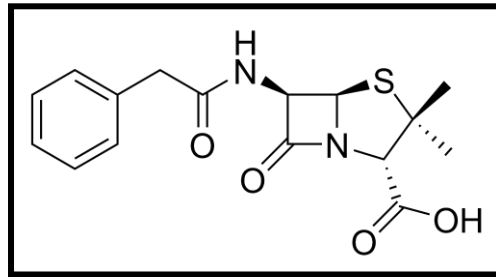


Figura 2.20: Estrutura química do antibiótico Penicilina G.
[Adaptada de <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Penicillin-G.png>]

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

Estes antibióticos são facilmente destruídos quando são colocados em soro fisiológico, glucose ou em água [Sousa,2006].

Segundo o seu espectro antibacteriano, a penicilina G não apresenta, praticamente, atividade contra bactérias Gram-negativas. É ativa contra *Staphylococcus spp.* *B-lactamase* (-), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, outros *Streptococcus spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp.*, *reponema pallidum*, *Neisseria spp.*, e *Haemophilus influenzae B-lactamase* (-). Este antibiótico atua inibindo a síntese do peptidoglicano [Sousa, 2006].

2.10 Resistência Bacteriana aos Antibióticos

A resistência bacteriana pode ser natural ou adquirida. A resistência natural observa-se em todos os membros da mesma espécie ou género, independentemente do seu local de isolamento [Ferreira *et al*, 2010]. A resistência adquirida ocorre numa proporção variável ao longo do tempo, e resulta na aquisição de um ou mais mecanismos de resistência [Ferreira *et al*, 2010].

Existem diversas razões para que os microrganismos possam apresentar uma resistência inerente a um antibiótico. Entre muitas delas, podem destacar-se as seguintes [Madigan *et al*, 2004]:

- O organismo pode ser desprovido da estrutura inibida por um antibiótico;
- O organismo pode ser impermeável ao antibiótico;
- O organismo pode ser capaz de modificar o antibiótico, que passa a apresentar uma forma inactiva. Por exemplo, muitos estafilococos produzem β - lactamases que clivam o anel β -lactâmico da maioria das penicilinas;
- O organismo pode modificar o alvo do antibiótico;
- Pode ocorrer por transferência genética uma alteração na via metabólica anteriormente bloqueada pelo agente antimicrobiano [Madigan *et al*, 2004].

Portanto, nem todos os antibióticos atuam contra todos os microrganismos. Alguns microrganismos são naturalmente resistentes a alguns antibióticos [Madigan *et al*, 2004].

CAPITULO 3

3. Objetivo

O principal objetivo deste trabalho foi estudar e avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial comercial, R-(-)-Carvona como extrato bruto, e dos seus derivados 7,8-Epoxicarvona e 1,6,7,8-Diepoxicarvona, obtidos em reações de oxidação epoxidada. Para este estudo, usaram-se como microrganismos, uma estirpe Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* (microrganismo representante da flora superficial do ser Humano) e duas estirpes Gram-negativas, *Escherichia coli* (representante do intestino do Ser Humano) e *Pseudomonas aeruginosa* (microrganismo representante do meio ambiente). Foram utilizados os seguintes métodos: difusão em agar em cavidades cilíndricas (poço) 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.

Utilizou-se como controle positivo os Antibióticos Antibacterianos Gentamicina e Penicilina. Como controle negativo para alguns compostos usou-se o solvente DMSO e para outros a emulsão 0,15% Agar + DMSO 5%, de modo a tornar as misturas mais homogêneas com o objetivo de melhor difusão no meio de cultura.

Posteriormente, verificou-se ainda a atividade antibacteriana de dois compostos já estudados, a sulfona 7 e 8, com a finalidade de verificar a boa atividade antimicrobiana obtida anteriormente e assim prosseguir para as técnicas na altura não efetuadas, método de Vapores, CMI e CMB

“Estudo da Actividade Antibacteriana da Carvona e seus derivados”.

CAPITULO 4

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais e equipamento

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram previamente purificados.

Para a realização das reações químicas foi usado H₂O₂ (30% p/v) da Panreac. Os solventes, a carvona (p-mentha-6,8-dien-2-one(-)-carvone), o etanol, o SDS foram adquiridos da Aldrich. O Benzonitrilo foi adquirido da Acros Organics. A Hidrotalcita (HT) foi preparada no laboratório do Departamento Químico Inorgânica da Faculdade de Ciências Químicas da Universidade de Salamanca, sendo a sua fórmula química Mg₄AlOH_nCO₃.

As reações foram realizadas numa placa de aquecimento com agitação magnética e controlo de temperatura, da marca AGIMATIC-N.

As separações por cromatografia em coluna (CC), a pressão moderada, foram realizadas usando uma bomba Büchi Pump Controller C-610, e as frações foram recolhidas por um coletor automático Büchi Fraction Collector C-660.

O solvente das amostras foi evaporado num evaporador Büchi RE111 Rotavapor, a pressão adequada para cada tipo de solvente.

A análise dos compostos foi realizada a partir de espectroscopia de carbono e protão através de espectros de RMN de ¹H e ¹³C. Os espectros foram realizados num espectrofotómetro de massa Bruker Avant 400, a 400 MHz para -rmn de protão e 100 MHz para RMN de carbono, respetivamente. Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). O solvente usado foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃), sendo que o pico residual do solvente deuterado para o ¹H é a 7,26 ppm e para o ¹³C é a 77,2 ppm.

4.2 Técnicas Cromatográficas

I. Cromatografia em camada fina

A cromatografia em camada fina (CCF) foi realizada em placas de sílica gel de 0,2 mm. Os cromatogramas foram revelados através da imersão das placas numa solução de ácido fosfomolibdico 5% (p/v) em etanol, sendo posteriormente colocadas numa estufa a aproximadamente 120°C durante alguns minutos, com a finalidade de se revelarem os produtos.

É um método importante para o isolamento, purificação e confirmação de produtos naturais. A técnica de cromatografia de camada fina usa como fase estacionária um adsorvente, que neste caso é a sílica gel. Esta forma uma camada sobre a placa de alumínio e o desenvolvimento do cromatograma é feito à medida que a fase móvel ascende através da fase estacionária [Wen *et al*, 2004].

Comparando com outros métodos cromatográficos, a Cromatografia em camada fina (TLC) é muitas vezes considerada como deficiente em reprodutibilidade e exatidão, mas alguns atributos distintivos desta ferramenta devem ser considerados como o baixo custo em análises, alto rendimento no screening de amostras, é mais rápida, permite a utilização de eluentes corrosivos e uma maior nitidez de separação. Nos últimos anos, A TLC tem servido como base na utilização de compostos antibacterianos em plantas medicinais. Para o isolamento experimental e preparação de extratos de plantas medicinais desconhecidas e amostras complexas, a TLC tem as suas vantagens específicas, pois, é livre de restrições de tempo de identificação ou de contaminação [Wen *et al*, 2004].

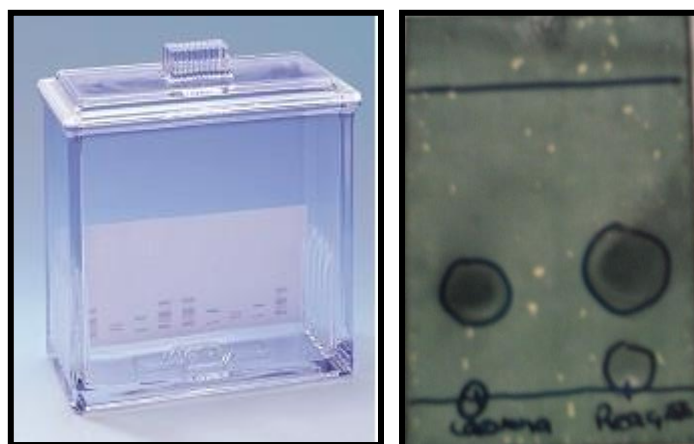


Figura 4.1: Cromatografia em camada fina- Câmara de cromatografia e a placa de sílica gel.

II. Cromatografia em Coluna

A Cromatografia em coluna (CC) efetuou-se com a utilização de sílica gel flash de espessura de 0,04-0,06 mm, como sólido absorvente. Como fase móvel usaram-se misturas de solventes de n-hexano e acetato de etilo em proporções de polaridades crescentes. No final usou-se uma mistura de 90:10 (Acetato de etilo:Metanol) para a lavagem e remoção de qualquer composto que tenha ficado retido na coluna.



Figura 4.2: Aparelho usado no trabalho onde se realiza a cromatografia em coluna.

4.3 Reações de síntese de Oxidação e Epoxidação de Cetonas com HT de MG/Al e uma mistura de H₂O₂ (30%)/Benzonitrilo

Nesta investigação, estudaram-se dois tipos de reação que ocorrem na síntese de cetonas com o catalisador HT de MG/Al e com uma mistura de H₂O₂ (30%)/Benzonitrilo, a partir do óleo essencial comercial, a carvona. Um dos objetivos ao realizar estas reações era obter os produtos e conseqüentemente realizar a Oxidação de Bayer-Villager. Este objetivo não foi alcançado devido a alguns fatores. Contudo, conseguiu-se obter os principais produtos das Reações de Oxidação e Epoxidação da R-(-)-Carvona. Numa reação de oxidação pode ocorrer apenas a formação de 7,8-epoxicarvona, mas também, pode ocorrer a epoxidação da 7,8-carvona e originar a 1,6,7,8-diepoxicarvona. Este facto pode dever-se ao facto da quantidade de catalisador e peróxido de hidrogénio que se adiciona em excesso.



Figura 4.3: Placa de agitação e aquecimento onde decorreram as reações de síntese.

4.3.1 Reação P1

Nesta reação adicionou-se, num balão de fundo redondo, 500 mg (3,30 mmol) de carvona, 0,75 mL (7,30 mmol) de Benzonitrilo, 1,2 mL (21,0 mmol) de etanol, 40 mg (0,066 mmol) de Hidrotalcita, 30 mg (0,10 mmol) de dodecilbenzenesulfonato de sódio e 0,5 mL (16,0 mmol) de H₂O₂ (30%). A mistura foi mantida em agitação durante 96-192 horas e aquecimento por banho de óleo, com uma temperatura que variou entre os 40-65°C. Após 24 horas, do início da reação, adicionou-se um excesso de 1 mL peróxido de hidrogénio e 3 mL de etanol.

Tabela 4.1: Condições iniciais da reação da oxidação da carvona com a informação molecular de cada composto.

Dados:					Quantidade de substância	
	Massa Molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Massa (g)	Volume (mL)	mol	mmol
Carvona	150,22	0,959	0,5	0,52	0,00333	3,3
Benzonitrilo	103,12	1,01	0,825	0,75	0,0073	7,3
Etanol	46,07	0,81	3,402	1,2	0,021	21
HT	603,8	-----	0,04	-----	6,62*10 ⁻⁵	0,0662
SDS	288,38	-----	0,03	-----	1,04*10 ⁻⁴	0,1
H ₂ O ₂ (30%)	34,01	1,11	1,665	1,5	0,016	16

4.3.2 Reação P2

Colocou-se, num balão de fundo redondo, 352,2 mg (2,34 mmol) de carvona, 0,5 mL (4,89 mmol) de Benzonitrilo, 4,0 mL (70,32 mmol) de etanol, 40 mg (0,066 mmol) de Hidrotalcita, 30 mg (0,10 mmol) de dodecilbenzenesulfonato de sódio e 0,5 mL (16,0 mmol) de H₂O₂ (30%). A mistura foi mantida em agitação durante 96-192 horas e aquecimento por banho de óleo, com uma temperatura de 40°C.

Tabela 4.2: Condições iniciais da reação da oxidação da R-(-)-carvona com a informação molecular de cada composto.

Dados:					Quantidade de substância	
	Massa Molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Massa (g)	Volume (mL)	mol	mmol
Carvona	150,22	0,959	0,3522	0,36725	0,00234	2,34
Benzonitrilo	103,12	1,01	0,505	0,5	0,0048	4,89
Etanol	46,07	0,81	3,24	4	0,07032	70,32
HT	603,8	-----	0,04	-----	6,6*10 ⁻⁵	0,066
SDS	288,38	-----	0,03	-----	0,00010	0,10
H ₂ O ₂ (30%)	34,01	1,11	0,555	0,5	0,016	16

4.3.3 Reação P3

Adicionou-se, num balão de fundo redondo, 600 mg (3,9 mmol) de carvona, 0,75 mL (7,3 mmol) de Benzonitrilo, 1,5 ml (26,3 mmol) de etanol, 40 mg (0,066 mmol) de Hidrotalcita, 30 mg (0,10 mmol) de dodecilbenzenesulfonato de sódio e 3 mL (97,91 mmol) de H₂O₂ (30%). A mistura foi mantida em agitação durante 96-192 horas e aquecimento por banho de óleo, com uma temperatura de 40°C.

Tabela 4.3: Condições iniciais da reação da oxidação da R-(-)-carvona com a informação molecular de cada composto.

Dados:					Quantidade de substância	
	Massa Molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Massa (g)	Volume (mL)	mol	mmol
Carvona	150,22	0,959	0,6	0,6256	0,0039	3,9
Benzonitrilo	103,12	1,01	0,7575	0,75	0,0073	7,3
Etanol	46,07	0,81	1,215	1,5	0,0263	26,3
HT	603,8	-----	0,04	-----	6,62*10 ⁻⁵	0,0662
SDS	288,38	-----	0,03	-----	0,0001	0,1
H ₂ O ₂ (30%)	34,01	1,11	3,33	3	0,0979	97,91

4.3.4 (Reação P5)

Num balão de fundo redondo, foram adicionadas 363,6 mg (2,42 mmol) de 7,8-epoxicarvona, 0,4mL (3,91 mmol) de Benzonitrilo, 1,5 ml (26,3 mmol) de etanol, 30 mg (0,049 mmol) de Hidrotalcita, 20 mg (0,069 mmol) de dodecilbenzenesulfonato de sódio e 1 mL (32,6 mmol) de H₂O₂ (30%). A mistura foi mantida em agitação durante 24-48 horas e aquecimento por banho de óleo, com uma temperatura que variou entre os 40°C.

Tabela 4.4: Condições iniciais da reação da epoxidação da 7,8-epoxicarvona com a informação molecular de cada composto.

Dados:					Quantidade de substância	
	Massa Molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Massa (g)	Volume (mL)	mol	mmol
7,8-Epoxicarvona	150,22	0,959	0,3636	0,37	0,00242	2,42
Benzonitrilo	103,12	1,01	0,404	0,4	0,00391	3,91
Etanol	46,07	0,81	1,215	1,5	0,0263	26,3
HT	603,8	-----	0,03	-----	4,9*10 ⁻⁵	0,049
SDS	288,38	-----	0,02	-----	6,9*10 ⁻⁵	0,069
H ₂ O ₂ (30%)	34,01	1,11	1,11	1	0,0326	32,6

4.3.5 Reação P6

Num balão de fundo redondo, adicionou-se 363,6 mg (2,42 mmol) de carvona, 0,4mL (3,91 mmol) de Benzonitrilo, 1,5 ml (26,3 mmol) de etanol, 30 mg (0,049 mmol) de Hidrotalcita, 20 mg (0,069 mmol) de dodecilbenzenesulfonato de sódio e 2 mL (65,27 mmol) de H₂O₂ (30%). A mistura foi mantida em agitação durante 24-48 horas e aquecimento por banho de óleo, com uma temperatura que variou entre os 40°C.

Tabela 4.5: Condições iniciais da reação da oxidação da carvona com a informação molecular de cada composto.

Dados:					Quantidade de substância	
	Massa Molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Massa (g)	Volume (mL)	mol	mmol
Carvona	150,22	0,959	0,3636	0,37	0,00242	2,42
Benzonitrilo	103,12	1,01	0,404	0,4	0,00391	3,91
Etanol	46,07	0,81	1,215	1,5	0,0263	26,3
HT	603,8	-----	0,03	-----	4,9*10 ⁻⁵	0,049
SDS	288,38	-----	0,02	-----	6,9*10 ⁻⁵	0,069
H ₂ O ₂ (30%)	34,01	1,11	2,22	2	0,06527	65,27

4.4 Extração dos produtos de Reação

A extração dos produtos da reação realizou-se numa ampola de decantação. Efetuou-se a lavagem da fase aquosa com diclorometano (CH₂CL₂).

Quando se finalizou a extração, adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, durante algumas horas, para esta secar e assim eliminar quaisquer resíduos de água que existissem.

Por fim, evaporou-se o solvente num evaporador rotativo de baixa pressão, a cerca de 220 mbar, à temperatura de aproximadamente 40°C.

4.5 Separação dos componentes

Realizou-se uma cromatografia em coluna, conforme o descrito no ponto 3.2 (II) para a separação dos compostos de oxidação. Para avaliar o grau de separação dos componentes realizaram-se cromatografias de camada fina, cujo eluente foi uma solução de n-hexano e acetato de etilo com diferentes polaridades.

4.6 Caracterização dos produtos

Os diversos compostos existentes nos produtos foram caracterizados pela técnica de espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C .

4.7 Cálculo do Rendimento da reação

1 mol de carvona corresponde a 1 mol de 7,8-epoxicarvona, tal como uma mol de 7,8-epoxicarvona corresponde a uma mole de 1,6,7,8-diepoxicarvona, como também 1 mol de carvona corresponde a 1 mol de 1,6,7,8-diepoxicarvona.

Portanto através dos pesos moleculares de cada composto e quantidade inicial do composto de partida conseguimos obter um valor teórico de massa que esperamos obter no final da reação, de produto maioritário, caso a reação se desse a 100%.

Após este cálculo, obtêm-se o rendimento da reação através do seguinte cálculo:

$$\eta = \frac{\text{Peso real de produto obtido após reação}}{\text{Peso teórico que se espera obter}} \times 100$$

4.8 Compostos para Avaliação de Actividade Antimicrobiana

As sulfonas 7 e 8, que já tinham sido testadas no ano 2011/2012 e apresentadas na minha Dissertação de licenciatura. Foram novamente e posteriormente testadas, devido aos bons resultados apresentados na altura, especialmente frente à bactéria *Staphylococcus aureus*.

Voltei a testá-las com o intuito de que se estas me apresentassem os bons resultados que obtive anteriormente, sendo objetivo prosseguir para os testes de screening que na altura não consegui realizar, nomeadamente CMI e CMB.

É de ter em atenção que já passaram dois anos, após a preparação destas e diluição com DMSO. As sulfonas dissolvidas em DMSO foram guardadas durante todo este tempo no frio. Assumiu-se a sua concentração inicial. Como já passou algum tempo o composto pode se ter modificado, ou parte dele ter evaporado, se bem que o DMSO é um solvente com um ponto de ebulição alto pelo que é muito difícil de evaporar. O mais correto a fazer quando se usou o composto novamente, seria evaporar o DMSO que este continha e ver a quantidade real que ainda existia de composto. Mas, tal procedimento não é aconselhável, porque visto que o DMSO tem um ponto de ebulição muito alto, num evaporador rotativo, poderia arrastar o produto consigo.

A sulfona 7 e 8 foram cedidas pelo Professor Catedrático de Química Orgânica David Díez, da Universidade de Salamanca. O Procedimento pelo qual estas foram obtidas apresenta-se descrito no artigo científico de 2012 intitulado “Solvent free L-proline-catalysed domino Knoevenagel/6p-electrocyclization for the synthesis of highly functionalised 2H-pyrans”, publicado no jornal RSC Advances cujos autores são Javier Peña, Rosalina F. Moro, P. Basabe, Isidro S. Marcos e David Díez.

Os restantes compostos, são os produtos maioritários das reações de oxidação e epoxidação que realizei a partir do óleo comercial, a carvona (p-mentha-6,8-dien-2-one(-)-carvone). Testaram-se todos os compostos para uma concentração final de 0,5mg/mL, devido à pequena quantidade existente de cada para a realização de todos os métodos previstos e de modo a uniformizar um termo de comparação com as mesmas condições de trabalho.

Testou-se ainda o óleo da carvona em bruto, uma vez que é um óleo comercializado tinha quantidade suficiente no laboratório para prosseguir com os testes. Realizei, também, os testes para as diluições 1:2, 1:4 e 1:8 do óleo em bruto da carvona, emulsionadas com a solução 0,15% Agar+DMSO 5%, para um volume final de 5 mL.

De seguida, apresento nas tabelas os dados de cada composto para a avaliação da atividade antibacteriana (tabelas 4,6; 4,7 e 4,8).

Tabela 4.6: Dados da Sulfona 7 e Sulfona 8, para os testes de atividade antibacteriana.

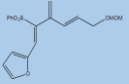
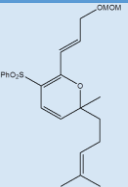
	Estrutura molecular	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	Massa inicial (mg)	Volume adicionado de DMSO (mL)	Concentração inicial (mg/mL)	Concentração final para testar atividade antibacteriana
Sulfona 7		C ₁₉ H ₂₀ O ₅ S	360,42	9,1	5	1,82	0,5
Sulfona 8		C ₂₃ H ₃₀ O ₅ S	418,55	14,2	5	2,84	0,5

Tabela 4.7: Dados dos produtos resultantes das reações de oxidação e epoxidação efetuadas, para testar a atividade antibacteriana.

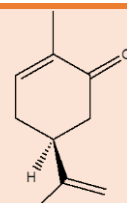
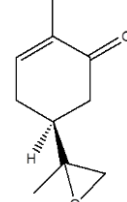
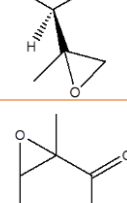
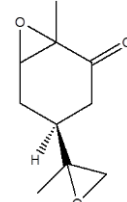
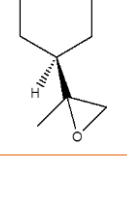
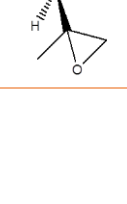
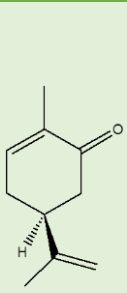
	Estrutura molecular	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	Massa produto obtido (mg)	Volume adicionado de 0,15% Agar+ DMSO 5% (mL)	Concentração inicial (mg/mL)	Concentração final para testar atividade antibacteriana
R-(-)-Carvona (Óleo comercial)		C ₁₀ H ₁₄ O	150,22	89,5	1	89,5	0,5
Epoxicarvona (P1-8)		C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166,22	165,7	1	165,7	0,5
Epoxicarvona (P2-7)				26,1	1	26,1	0,5
(1,6),(7,8)-Diepoxicarvona (P3-6)		C ₁₀ H ₁₄ O ₃	182,22	160,1	3	53,4	0,5
(1,6),(7,8)-Diepoxicarvona (P5-9+10)				81,7	1	81,7	0,5
(1,6),(7,8)-Diepoxicarvona (P6-10)				436,8	1	436,8	0,5

Tabela 4.8: Dados do óleo essencial (R-(-)-carvona) em bruto e das suas diluições, para testar a atividade antibacteriana de cada.

	Estrutura molecular	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	Volume de óleo essencial da carvona (mL)	Volume adicionado de 0,15% Agar+ DMSO 5% (mL)	Concentração (mg/mL)
R-(-)-Carvona (Óleo em bruto)		C ₁₀ H ₁₄ O	150,22	5	0	960
Diluição 1:2 do óleo bruto				2,5	2,5	480
Diluição 1:4 do óleo bruto				1,25	3,75	240
Diluição 1:8 do óleo bruto				0,625	4,375	120

4.9 Meios de Cultura

Para testar a atividade antibacteriana de cada composto quimioterápico, os meios de cultura utilizados foram o MH2 (Ref.43 301, MH2- BioMérieux SA) e o caldo Müller-Hinton Broth (MHB). O meio MH2 é um meio que já se encontra previamente preparado e comercializado em placas com uma espessura de 4 mm (pois quanto maior a altura do meio menor será o halo de inibição, logo, 4mm de altura é ideal para este género de estudo). É um meio indicado para o estudo da suscetibilidade antibacteriana, apresentando uma composição que permite a cultura de bactérias não-fastidiosas encontradas em patologias humanas, como é o caso das *Enterobacteriaceae*, bacilos Gram-negativos, *Staphylococci* e *Enterococci*. O MH2 também garante interferência mínima dos seus constituintes nos resultados dos testes.

4.10 Microrganismos

Os microrganismos estudados foram o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) provenientes da American Type Culture Collection (ATCC) a partir de Culti-loops® (OXOID LDA.) liofilizados e armazenadas a 2-8°C, o que permite que as culturas padronizadas possam ser testadas com segurança.

Como Gram-positivos testou-se *Staphylococcus aureus*. A nível de Gram-negativas, foram estudadas e analisadas a ação bacteriana contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (oxidase positiva).

As culturas puras de cada microrganismo foram mantidas em placas no meio Müller-Hinton Agar, preparados no laboratório.

4.11 Preparação das Primeiras culturas

Utilizaram-se Culti-loops de microrganismos, para a preparação das primeiras estirpes. O procedimento recomendado é:

1. Aquecer a placa do 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 10 a 15 segundos, para permitir a absorção do liofilizado;
3. Utilizar o método de estrias;
4. Incubar as placas à temperatura ótima para o crescimento do microrganismo.

Após a realização das estrias na placa com as zaragatoas “Culti-loops”, introduz-se o “Culti-loop” em caldo MHB (6 mL) e vai para a estufa à temperatura ótima de crescimento do microrganismo, durante 24H para verificar se ocorre crescimento bacteriano. Posteriormente, guardam-se os tubos no frigorífico.

4.12 Preparação da Densidade do inóculo

A densidade do inóculo influencia o resultado dos ensaios. Por isso, padronizou-se a quantidade de inóculo a ser utilizada, a fim de assegurar o efeito do método.

Inocularam-se três placas de MH2 (cada uma com um microrganismo), pelo método de estrias, após a recuperação das estirpes liofilizadas de ATCC, seguindo as instruções do fabricante. Estas incubaram-se na respetiva estufa a $36\pm 1^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 24 horas, com a finalidade de se obter um inóculo com uma concentração bacteriana de 1×10^8 UFC/mL na escala 0,5 de MacFarland. Para tal se obter, o procedimento a ter foi o seguinte:

1. Retiraram-se algumas colónias do microrganismo a testar com uma ança estéril descartável para uma ampola de 3 mL de NaCl 0,85 % estéril (ampola BioMérieux), de modo a obter uma turvação correspondente ao padrão de MacFarland de 0,5 ($\lambda=550$ nm, $A=0,125$). Para a padronização do inóculo foi utilizado o aparelho DENSIMAT- Densitómetro de faixa entre 0,5 e 7,5 na escala de McF. O aparelho é instantaneamente activado quando a ampola de NaCl (0,85%) com o microrganismo inoculado é colocada no compartimento de leitura.

2. A densidade bacteriana é medida no momento, sendo diretamente proporcional à densidade da suspensão expressa em unidades de MacFarland (0,5 o que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL).

3. De seguida, diluiu-se a suspensão de 10^8 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 10^6 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.

4.12.1 Confirmação da Concentração do Inóculo

A concentração do inóculo foi realizada a partir de diluições sucessivas em soro fisiológico estéril. Para isso, retirou-se 0,1 mL do inóculo (10^6 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 10^4

UFC/mL. Deste último retirou-se 1 mL e diluiu-se em 9 mL de soro fisiológico (10^3 UFC/mL), homogeneizando bem. Inoculou-se 0,1 mL desta última diluição por espalhamento no meio MH2. Incubou-se cada placa a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 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.

4.13 Avaliação da Actividade Antibacteriana

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

Como controlos positivos, utilizaram-se os antibióticos penicilina G na concentração de 0,05 mg/ml (ação contra Gram-positivos), da Sigma-Aldrich, e gentamicina na concentração de 10 mg/ml (ação de largo espectro), da Sigma-Aldrich. Como controlo negativo foi utilizada a solução 0,15% Agar + DMSO 5% (Fisher Scientific).

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, respetiva difusão no agar e posterior medição do halo de inibição.

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

4.13.1 Procedimento do método de difusão em agar pela técnica de difusão em 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 em triplicado do seguinte modo:

1. Colocou-se 100 µL de inóculo 10^6 UFC/mL na placa estéril com o meio de cultura MH2. De seguida espalhou-se uniformemente sobre a placa de agar MH2, de maneira a cobrir toda a superfície do agar com o inóculo, com a ajuda de uma alça de Drigalski.

2. Deixou-se em repouso durante 15 a 20 minutos de modo a que o meio de cultura absorvesse o inóculo. 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 respetivos controlos.

4. Após um período de repouso de aproximadamente 15 minutos à temperatura ambiente, permitindo a difusão dos compostos pelo meio, incubaram-se as placas (sem inverter) na estufa a uma temperatura de 37°C durante 18-24H.

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 todos os compostos, assim como para as estirpes utilizadas. Todo este processo foi realizado em condições de esterilidade.

4.13.2 Procedimento do método de Vapores

Esse procedimento realizou-se em duplicado em condições estéreis, da seguinte forma:

1. Colocou-se 100 µL de inóculo 10^6 UFC/mL na placa estéril com o meio de cultura MH2. De seguida espalhou-se uniformemente sobre a placa de agar MH2, de maneira a cobrir toda a superfície do agar com o inóculo, com a ajuda de uma alça de Drigalski.

2. Deixou-se repousar durante 15 minutos de modo a que o meio de cultura absorvesse 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.

4.13.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória e da Concentração mínima bactericida pela técnica de 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.

Nos MIC's, foram realizados ensaios preliminares com o composto óleo essencial em bruto. Devido a fatores de tempo não se conseguiu fazer o teste da Resazurina e apenas foi testado o óleo essencial da carvona em bruto frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, em duplicado, sendo o procedimento o seguinte:

- I. 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.
- II. Prepararam-se 6 tubos estéreis. Nos primeiros 4 tubos colocou-se 1 mL de caldo MHB (concentração dupla). De seguida, ao 1º tubo adicionou-se 1 mL 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 exceção do controlo negativo.
- III. Num 5º tubo preparou-se o Controlo positivo / crescimento adicionando 1 mL de caldo MHB (concentração dupla) mais 1 mL do inoculo.
- IV. Num 6º tubo preparou-se o controlo negativo/ esterilidade adicionando 1 mL de caldo MHB (concentração dupla) mais 1 mL de óleo bruto.

Todos os tubos de ensaio (1 a 6), foram bem homogeneizados e incubados com agitação numa incubadora orbital (125 rpm) durante 18-24 h à temperatura de aproximadamente 37 °C. Após o tempo de incubação, os tubos foram examinados visualmente.

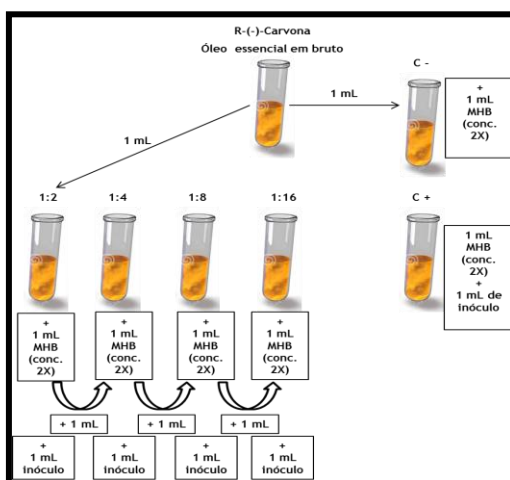


Figura 4.4: Esquema do procedimento para o método de macrodiluição CMI.

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 duplicado.

4.14 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa SPSS statistics 20.0.

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 é, no presentes trabalho em todos os casos, a medida dos halos de inibição. Para complementar, foi feito um estudo de comparação à posteriori (*post-hoc*) que foi o Teste de Tukey.

O teste Tukey permite 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 $p < 0,05$.

“Estudo da Actividade Antibacteriana da Carvona e seus derivados”.

CAPITULO 5

5. Resultados e discussão

Foram realizadas duas reações a partir do óleo essencial comercial, a R-(-)-carvona. Uma primeira etapa consistiu na oxidação da carvona de modo a obter a 7,8-epoxicarvona, e de seguida uma reação de epoxidação para obter como produto a (1,6),(7,8)-Diepoxicarvona. Este último produto pode ser, também, obtido em reações das quais se parte da R-(-)-Carvona.

A carvona e a 7,8-epoxicarvona são cetonas cíclicas insaturadas. A carvona apresenta duas ligações duplas de C=C, estando uma localizada no grupo isopropenil da cadeia lateral, e a 7,8-epoxicarvona constitui a cetona α,β -insaturada da ciclohexenona. Ambos os grupos alcenos podem sofrer reações de epoxidação originando epóxidos. A 7,8-epoxicarvona apresenta uma ligação dupla situada na ciclohexenona e um epóxido na cadeia lateral. A ligação dupla existente nesta molécula pode sofrer epoxidação e assim vir a forma a (1,6),(7,8)-Diepoxicarvona.

Nesta secção será apresentada a caracterização de cada produto através da técnica espectroscópica de RMN de ^{13}C e ^1H .

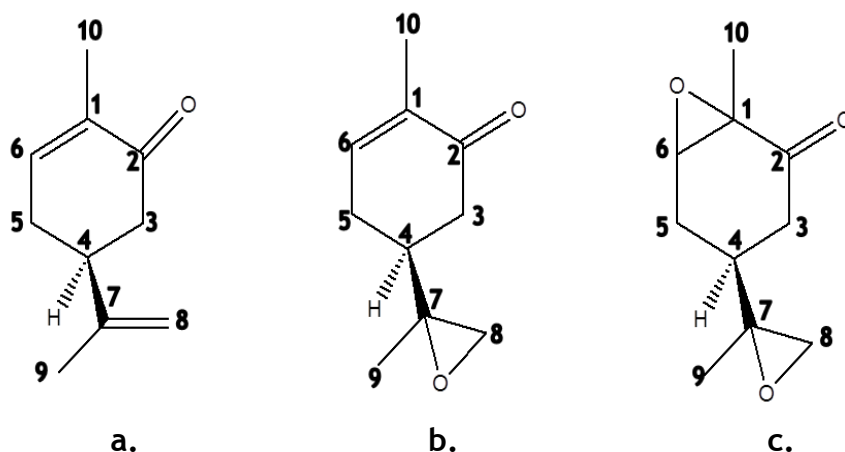


Figura 5.1: Atribuição da numeração da (R)-(-)-Carvona (a.); 7,8-Epoxicarvona (b.) e (1,6),(7,8)-Diepoxicarvona (c.).

5.1 Oxidação de cetonas com HT de Mg/Al e uma mistura de H₂O₂ (30%)/Benzonitrilo:

Este método de oxidação foi selecionado por ser um processo catalítico eficiente. Neste sistema é usada a hidrotalcita de Mg/Al devido ao facto de ser um catalisador heterogéneo eficiente, podendo ser reciclada.

Utiliza-se, uma mistura de H₂O₂/Benzonitrilo como oxidante. O peróxido de hidrogénio gera água, como subproduto, e fornece à reação grande quantidade de oxigénio activo. Por sua vez o Benzonitrilo atua como agente de transferência de oxigénio.

Nestas reações, costuma haver formação de um subproduto sólido e branco, a benzamida, podendo ser reciclado num processo apropriado.

5.1.1 Reações e rendimento dos produtos a partir da R-(-)-carvona

Após ter sido realizada a Cromatografia em coluna, foram realizadas as análises espectroscópicas às frações com o peso mais significativo, observando-se os produtos principais da reação, 7,8-epoxicarvona e 1,6,7,8-diepoxicarvona. Verificou-se em alguns casos, carvona sem reagir, misturas de compostos e benzamida. Dentre todos as frações as mais importantes são a 7,8-epoxicarvona e 1,6,7,8-diepoxicarvona.

A obtenção do composto 7,8-epoxicarvona, sugere competição entre a reação de epoxidação e de Baeyer-Villager, prevalecendo a reação de epoxidação.

A existência de carvona enquanto subproduto de reação para além de ser detetada através da espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C, é também notado através do odor característico a menta.

I. Reação P1

- Nesta reação obtiveram-se 152,2 mg de carvona sem reagir, usada posteriormente para a reação P2, à qual foram adicionadas mais 200 mg de óleo comercial.

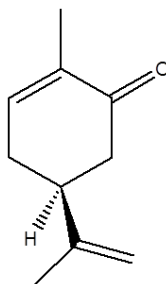


Figura 5.2: Estrutura molecular da R-(-)-carvona.

- O produto maioritário e principal desta reação foi a 7,8-Epoxicarvona, posteriormente usada em testes de atividade antibacteriana. A sua estrutura é a seguinte:

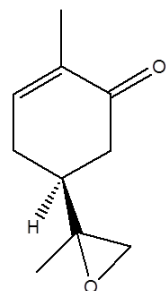


Figura 5.3: Estrutura molecular da 7,8-epoxicarvona.

Obteve-se uma fração de 165,7 mg do composto (P1-8), após a realização da separação de produtos por cromatografia em coluna. O rendimento desta reação é de seguida calculado.

- Se, 1 mol de carvona corresponde a 1 mol de 7,8-Epoxicarvona, então:

$$\begin{array}{l} 150,22 \text{ g de carvona} \text{ ----- } 166,22 \text{ g de 7,8-Epoxicarvona} \\ 0,5 \text{ g de carvona} \text{ ----- } X \text{ (gramas de 7,8-Epoxicarvona)} \end{array}$$

$$\Leftrightarrow X = 0,553 \text{ g de 7,8-Epoxicarvona} \rightarrow \underline{\text{massa teórica de produto}}$$

- Então, o rendimento da 7,8-Epoxicarvona na reação P1 é de:

$$\eta = \frac{\text{Massa de Produto real}}{\text{Massa de Produto teórica}} = \frac{0,1657}{0,553} \times 100 = 29,96\%$$

II. Reação P2

- Na reação P2, também se obteve carvona sem reagir. O produto maioritário e principal desta reação foi a 7,8-Epoxicarvona, posteriormente usada para testes de atividade antibacteriana. A sua estrutura é a seguinte:

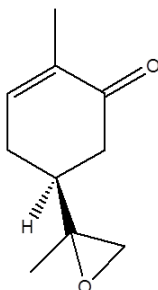


Figura 5.4: Estrutura molecular da 7,8-epoxicarvona.

Obteve-se uma fração de 26,1 mg do composto (P2-7) após a realização da separação de produtos por cromatografia em coluna. O rendimento desta reação é de seguida calculado.

- Se, 1 mol de carvona corresponde a 1 mol de 7,8-Epoxicarvona, então:

$$\begin{array}{l} 150,22 \text{ g de carvona} \text{ ----- } 166,22 \text{ g de 7,8-Epoxicarvona} \\ 0,3522 \text{ g de carvona} \text{ ----- } X \text{ (gramas de 7,8-Epoxicarvona)} \end{array}$$

$$\Leftrightarrow X = 0,3897 \text{ g de 7,8-Epoxicarvona} \rightarrow \text{massa teórica de produto}$$

- Então, o rendimento da 7,8-Epoxicarvona na reação P2 é de:

$$\eta = \frac{\text{Massa de Produto real}}{\text{Massa de Produto teórica}} = \frac{0,0261}{0,3897} \times 100 = 6,69\%$$

III. Reação P3

- Nesta reação, uma das frações obtidas foi 363,6 mg de 7,8-Epoxicarvona usadas na reação de epoxidação P5.
- O produto principal desta reação foi a 1,6,7,8-Diepoxicarvona, posteriormente usada em testes de atividade antibacteriana. A sua estrutura é a seguinte:

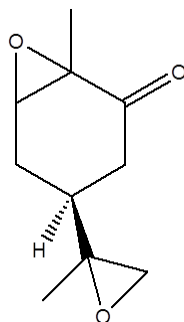


Figura 5.5: Estrutura molecular da 1,6,7,8-epoxicarvona.

Obteve-se uma fração de 160,1mg do composto (P3-6) após a realização da separação de produtos por cromatografia em coluna. O rendimento desta reação é de seguida calculado.

- Se, 1 mol de carvona corresponde a 1 mol de 1,6,7,8-Diepoxicarvona, então:

$$\begin{array}{l} 150,22 \text{ g de carvona} \text{ ----- } 182,22 \text{ g de 1,6,7,8-Diepoxicarvona} \\ 0,6 \text{ g de carvona} \text{ ----- } X \text{ (gramas de 1,6,7,8-Diepoxicarvona)} \end{array}$$

$$\Leftrightarrow X = 0,7278 \text{ g de 1,6,7,8-Epoxicarvona} \rightarrow \underline{\text{massa teórica de produto}}$$

- Então, o rendimento da 1,6,7,8-Diepoxicarvona na reação P3 é de:

$$\eta = \frac{\text{Massa de Produto real}}{\text{Massa de Produto teórica}} = \frac{0,1601}{0,7278} \times 100 = 21,99\%$$

IV. Reação P6

- Desta reação resultaram como subprodutos uma mistura de 7,8-epoxicarvona com 1,6,7,8-diepoxicarvona, benzamida e metilcetonas.
- O produto principal desta reação foi a 1,6,7,8-Diepoxicarvona, posteriormente usada para testes de atividade antibacteriana. A sua estrutura é a seguinte:

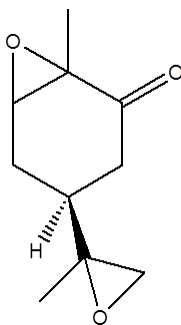


Figura 5.6: Estrutura molecular da 1,6,7,8-epoxicarvona.

Obteve-se uma fração de 436,8mg do composto (P6-10) após a realização da separação de produtos por cromatografia em coluna. O rendimento desta reação é de seguida calculado.

- Se, 1 mol de carvona corresponde a 1 mol de 1,6,7,8-Diepoxicarvona, então:

$$\begin{array}{l} 150,22 \text{ g de carvona} \text{ ----- } 182,22 \text{ g de 1,6,7,8-Diepoxicarvona} \\ 0,6 \text{ g de carvona} \text{ ----- } X \text{ (gramas de 1,6,7,8-Diepoxicarvona)} \end{array}$$

$$\Leftrightarrow X = 0,7278 \text{ g de 1,6,7,8-Epoxicarvona} \rightarrow \text{massa teórica de produto}$$

- Então, o rendimento da 1,6,7,8-Diepoxicarvona na reação P6 é de:

$$\eta = \frac{\text{Massa de Produto real}}{\text{Massa de Produto teórica}} = \frac{0,4368}{0,7278} \times 100 = 60\%$$

5.1.2 Reações e rendimento dos produtos a partir da 7,8-Epoxicarvona

V. Reação P5

- O produto principal desta reação foi a 1,6,7,8-Diepoxicarvona, posteriormente usada para testes de atividade antibacteriana. A sua estrutura é a seguinte:

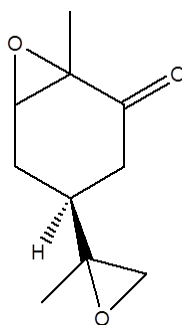


Figura 5.7: Estrutura molecular da 1,6,7,8-epoxicarvona.

Obteve-se uma fração de 81,7 mg do composto (P5-9+10) após a realização da separação de produtos por cromatografia em coluna. O rendimento desta reação é de seguida calculado.

- Se, 1 mol de carvona corresponde a 1 mol de 1,6,7,8-Diepoxicarvona, então:

$$\begin{array}{l} 166,22 \text{ g de carvona} \text{ ----- } 182,22 \text{ g de 1,6,7,8-Diepoxicarvona} \\ 0,3636 \text{ g de carvona} \text{ ----- } X \text{ (gramas de 1,6,7,8-Diepoxicarvona)} \end{array}$$

$$\Leftrightarrow X = 0,3986 \text{ g de 1,6,7,8-Epoxicarvona} \rightarrow \text{massa teórica de produto}$$

- Então, o rendimento da 1,6,7,8-Diepoxicarvona na reação P5 é de:

$$\eta = \frac{\text{Massa de Produto real}}{\text{Massa de Produto teórica}} = \frac{0,0817}{0,3986} \times 100 = 20,49\%$$

5.2 Análise do espectro do óleo essencial de partida, a Carvona

O espectro de ^1H da R-(-)-Carvona é o seguinte:

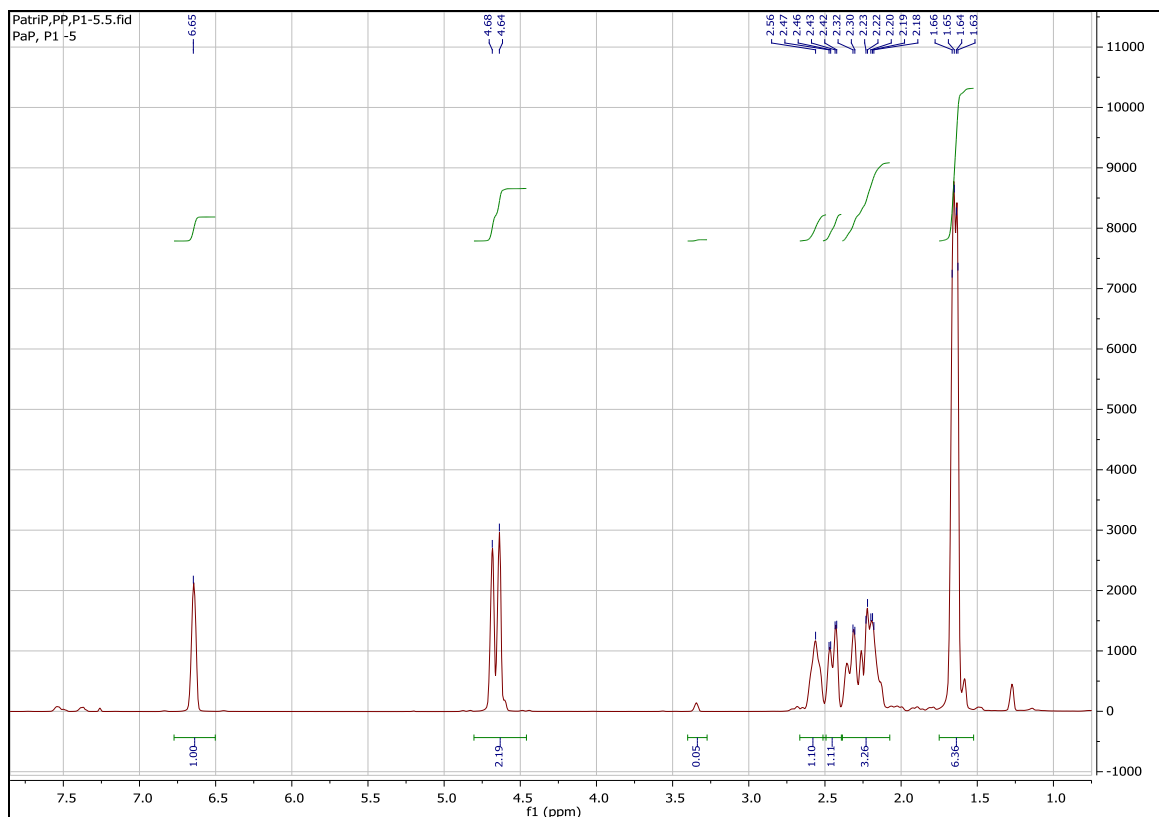


Figura 5.8: Espectro de RMN de protão da R-(-)-carvona.

Na seguinte tabela encontra-se a caracterização com todos os dados recolhidos do RMN ^1H do produto de reação, R-(-)-Carvona:

Tabela 5.1: Sinais de RMN de ^1H da R-(-)-Carvona.

Posição do Hidrogénio	δ (ppm)	Multiplicidade: J(Hz)
H-3	2,46	Multipleteo
H-4	2,42	Multipleteo
H-5	2,22	Multipleteo
H-6	6,65	Singleteo largo
H-8	4,68 e 464	Singleteos
Me-9	1,63	Singleteo
Me-10	1,66	Singleteo

O espectro de ^{13}C da R-(-)-Carvona é o seguinte:

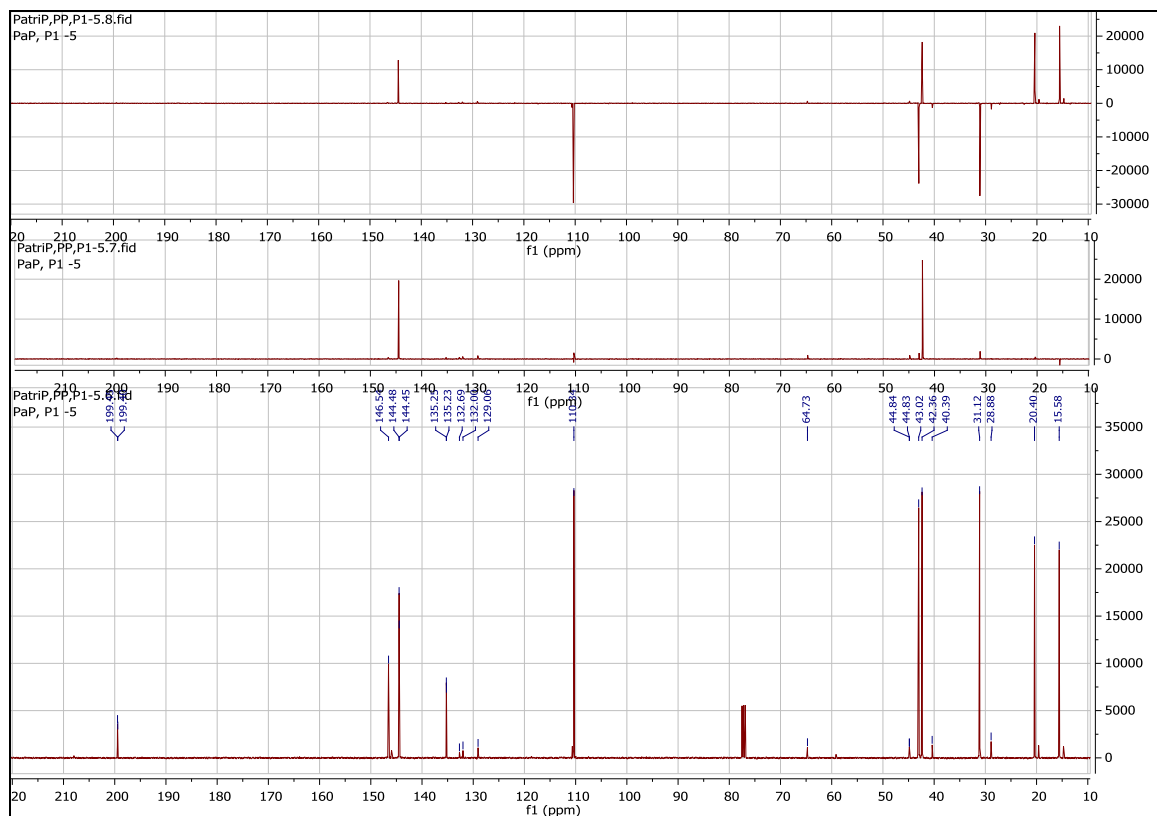


Figura 5.9: Espectro de RMN de Carbono 13 da R-(-)-carvona.

Na seguinte tabela encontra-se a caracterização com todos os dados recolhidos do RMN ^{13}C do produto de reação, R-(-)-Carvona:

Tabela 5.2: Sinais de RMN de ^{13}C da R-(-)-Carvona

Posição dos Carbonos	δ (ppm)	Tipo de Carbono
1	135,2	C
2	199,4	C
3	42,4	CH_2
4	43,0	CH
5	31,1	CH_2
6	132,7	CH
7	146,5	C
8	110,3	CH_2
9	20,4	CH_3
10	15,6	CH_3

Pela análise espectroscópica de ambos os RMN, chegou-se a uma proposta de estrutura para este composto, designado de R-(-)-Carvona, representada e numerada na figura seguinte:

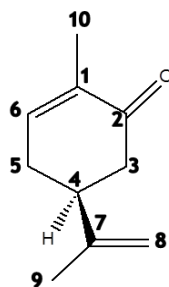


Figura 5.10: Estrutura da R-(-)-carvona, a partir dos RMN de ^1H e ^{13}C .

5.3 Análise do espectro do produto 7,8-Epoxicarvona

Como os produtos P1-8 e P2-7 são iguais, apenas é caracterizado o produto P2-7, visto se apresentar puro.

O espectro de ^1H da 7,8-Epoxicarvona é o seguinte:

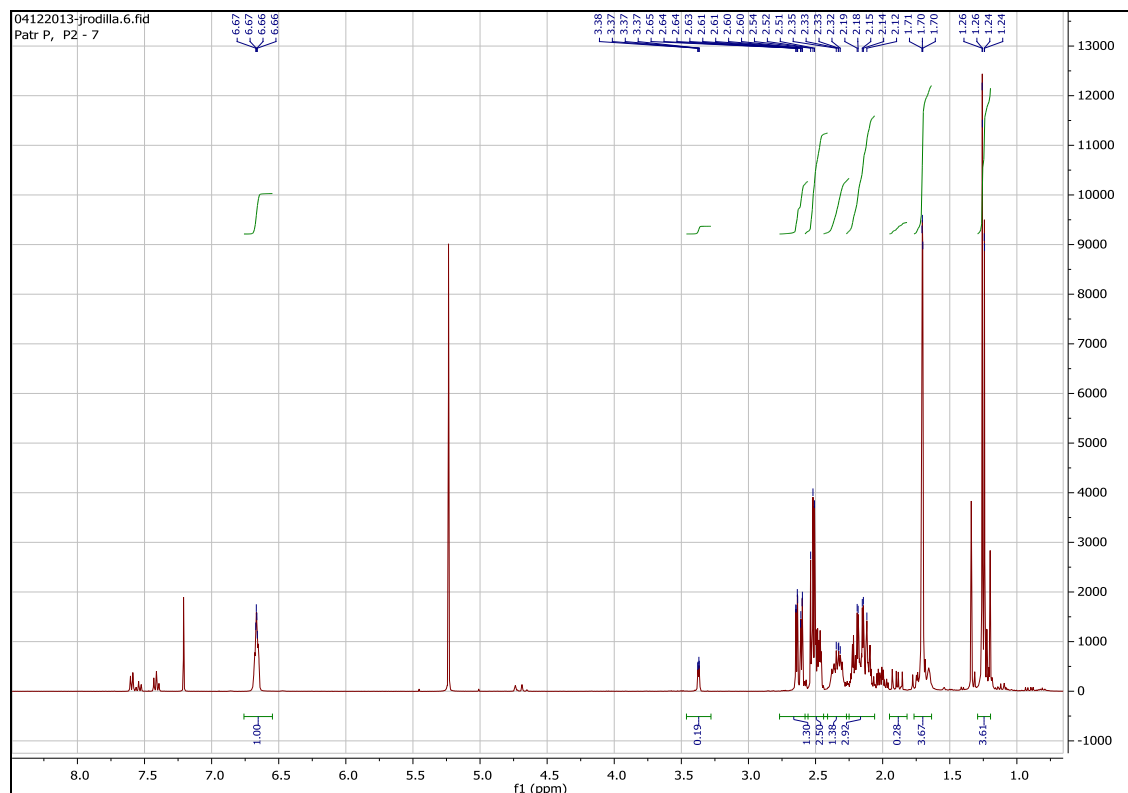


Figura 5.11: Espectro de RMN de protão da 7,8-epoxicarvona.

Na seguinte tabela encontra-se a caracterização com todos os dados recolhidos do RMN ^1H do produto de reação, 7,8-Epoxicarvona:

Tabela 5.3: Sinais de RMN de ^1H da 7,8-Epoxicarvona

Posição do Hidrogénio	δ (ppm)	Multiplicidade: J(Hz)
H-3	2,35	Multipleteo
H-4	2,19	Multipleteo
H-5	2,14	Multipleteo
H-6	6,67	Multipleteo
H-8	2,61	Multipleteo
Me-9	1,26	Singleto
Me-10	1,70	Singleto

O espectro de ^{13}C da 7,8-Epoxicarvona é o seguinte:

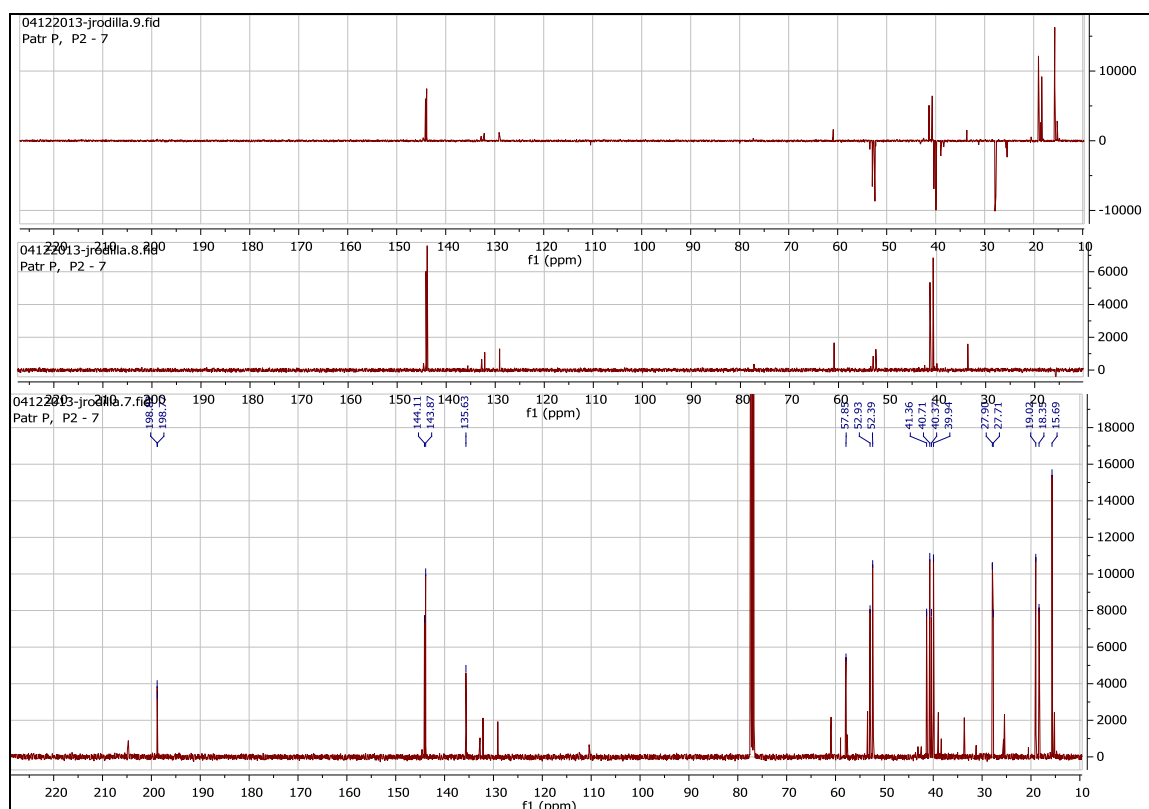


Figura 5.12: Espectro de RMN de carbono 13 da 7,8-epoxicarvona

Na seguinte tabela encontra-se a caracterização com todos os dados recolhidos do RMN ^{13}C do produto de reação, 7,8-Epoxicarvona:

Tabela 5.4: Sinais de RMN de ^{13}C da 7,8-Epoxicarvona

Posição dos Carbonos	δ (ppm)	Tipo de Carbono
1	135,6	C
2	198,8	C
3	40,4	CH_2
4	40,7	CH
5	27,7	CH_2
6	143,9	CH
7	57,8	C
8	52,4	CH_2
9	15,7	CH_3
10	18,3	CH_3

Pela análise espectroscópica de ambos os RMN, chegou-se a uma proposta de estrutura para este composto, designado de 7,8-Epoxicarvona, representada e numerada na figura seguinte:

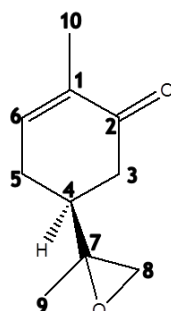


Figura 5.13: Estrutura da 7,8-Epoxicarvona, a partir dos RMN de ^1H e ^{13}C .

5.4 Análise do espectro do produto 1,6,7,8-Diepoxicarvona

Como os produtos P3-6, P5-9+10 e P6-10 são iguais, apenas é caracterizado o produto P5-9+10, visto se apresentar puro. O espectro de ^1H da 1,6,7,8-Diepoxicarvona é o seguinte:

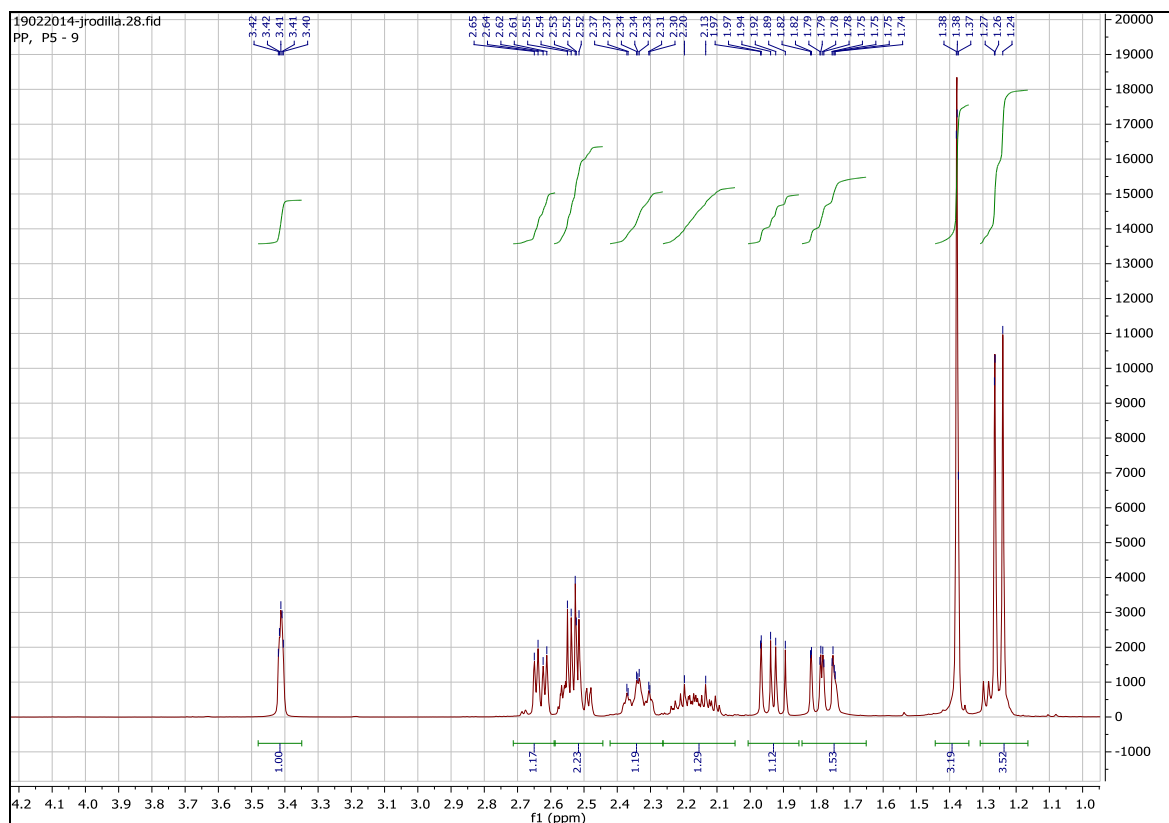


Figura 5.14: Espectro de RMN de próton da 1,6,7,8-diepoxicarvona.

Na seguinte tabela encontra-se a caracterização com todos os dados recolhidos do RMN ^1H do produto de reação, 1,6,7,8-Diepoxicarvona:

Tabela 5.5: Sinais de RMN de ^1H da 1,6,7,8-Diepoxicarvona

Posição do Hidrogénio	δ (ppm)	Multiplicidade: J(Hz)
H-3	2,33	Multipleteo
H-4	2,13	Multipleteo
H-5	1,82	Multipleteo
H-6	3,41	Multipleteo
H-8	2,52	Dubleto
Me-9	1,26	Singleteo
Me-10	1,38	Singleteo

O espectro de ^{13}C da 1,6,7,8-Diepoxicarvona é o seguinte:

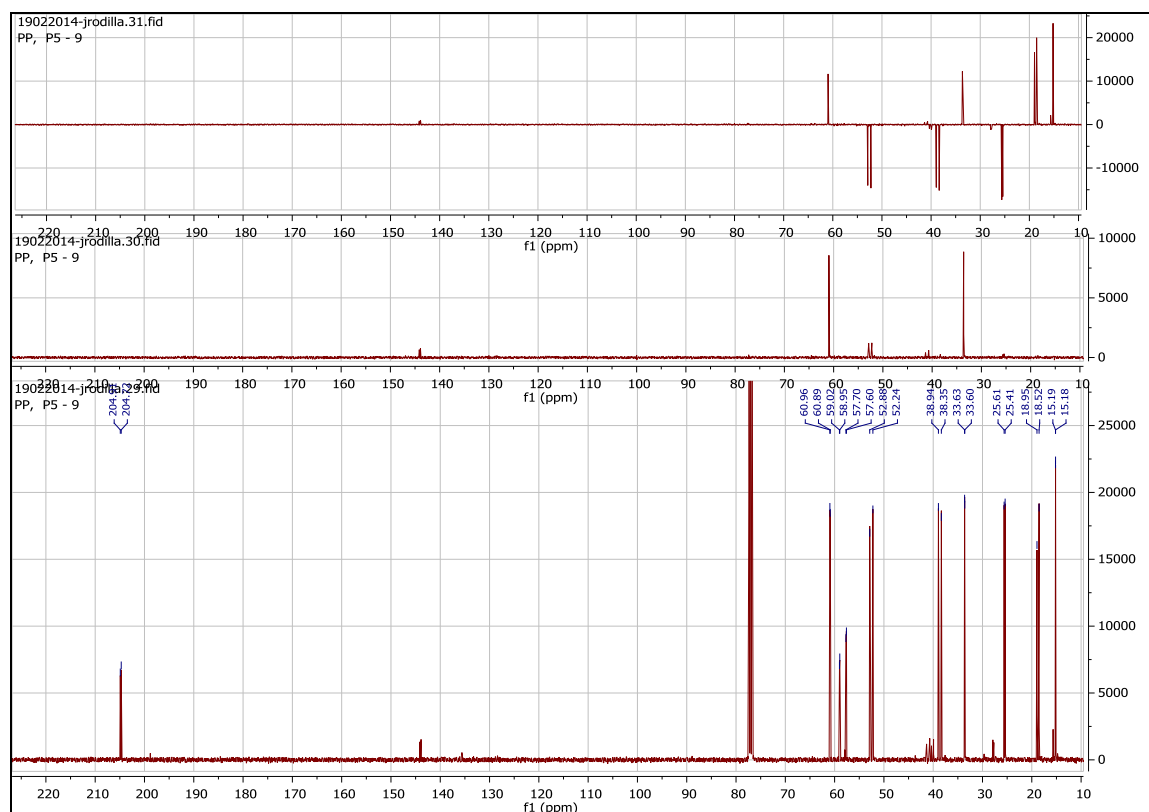


Figura 5.15: Espectro de RMN de carbono 13 da 1,6,7,8-diepoxicarvona.

Na seguinte tabela encontra-se a caracterização com todos os dados recolhidos do RMN ^{13}C do produto de reação, 1,6,7,8-Diepoxicarvona:

Tabela 5.6: Sinais de RMN de ^{13}C da 1,6,7,8-Diepoxicarvona

Posição dos Carbonos	δ (ppm)	Tipo de Carbono
1	59,2	C
2	205,0	C
3	38,9	CH_2
4	33,6	CH
5	25,4	CH_2
6	60,9	CH
7	58,9	C
8	57,6	CH_2
9	15,2	CH_3
10	18,5	CH_3

Pela análise espectroscópica de ambos os RMN, chegou-se a uma proposta de estrutura para este composto, designado de 1,6,7,8-Diepoxicarvona que se encontra de seguida desenhado e numerado:

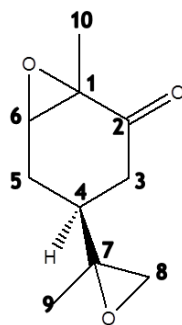


Figura 5.16: Estrutura da 1,6,7,8-Diepoxicarvona, a partir dos RMN de ^1H e ^{13}C .

5.5 Atividade Antibacteriana dos diferentes compostos

A determinação da Actividade Antibacteriana, dos diversos compostos deste trabalho de investigação, foi realizada através de três métodos:

- ✓ **Método de difusão em agar pela técnica de poço**, onde após 18-24 horas de incubação das placas com os óleos e microrganismos a serem testados, foi feita as medições dos halos de inibição. Os resultados foram obtidos através da medição do comprimento das extremidades do halo de inibição. Este método foi realizado para todos os compostos descritos no capítulo 3, deste trabalho.

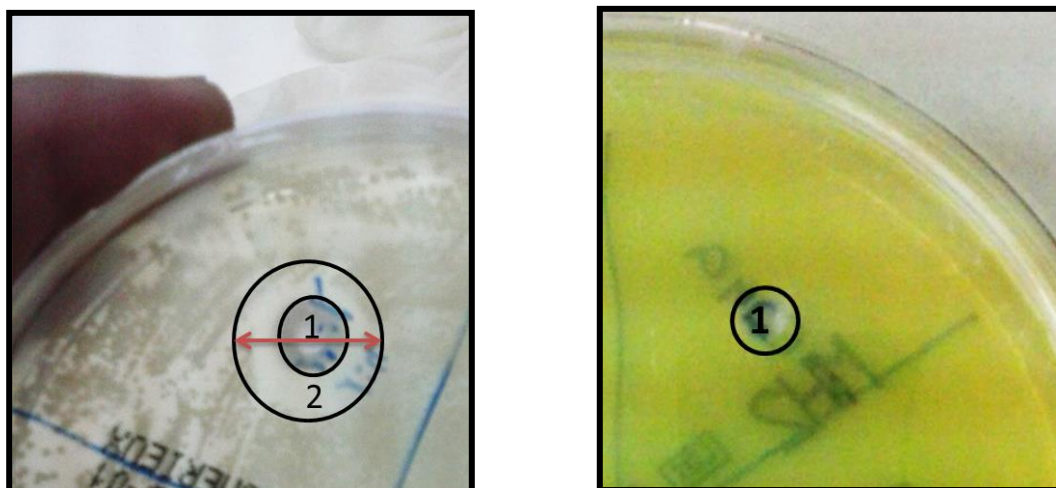


Figura 5.17: Imagens de um microrganismo inibido pelo composto a ser testado, observando-se o halo de inibição em volta do poço, na primeira imagem. NA segunda imagem, apenas se visualiza o poço sem qualquer inibição em volta deste.

- ✓ **Método por libertação de Vapor**, onde os resultados foram obtidos segundo a medição do halo de inibição bacteriana, provocado pelos vapores dos óleos essenciais. Esta medição foi feita do mesmo modo que para os halos de difusão em agar. Este método foi realizado para todos os compostos descritos no capítulo 3



Figura 5.18: Imagens de um microrganismo inibido pelo composto a ser testado, observando-se o halo de inibição no meio de cultura, devido aos vapores libertados do composto

- ✓ **Método de diluições em caldo (Macrodiluição)**, de modo a determinar as CMI e CMB. Após o tempo de incubação analisaram-se os tubos visualmente, observando a turbidez destes nas diferentes diluições do óleo essencial. Realizou-se a contagem de UFC nas placas de Petri, para assim, determinar as CMI e CMB dos compostos testados.

Este método foi realizado, apenas para o óleo da Carvona em Bruto, devido aos bons resultados adquiridos nos dois métodos para testar a atividade antimicrobiana, anteriormente descritos. Também as diluições 1:2, 1:4 e 1:8 do óleo em Bruto da Carvona, apresentaram resultados satisfatórios para a realização deste teste, mas o tempo limitado para a finalização do trabalho impediu que estes se testassem a nível de CMI e CMB.

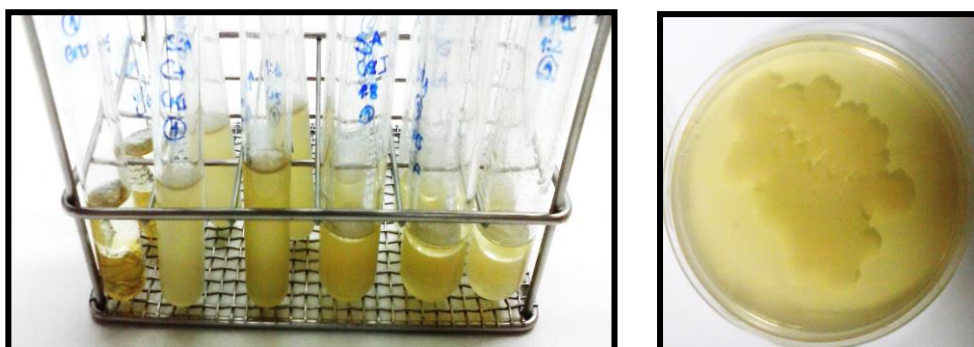


Figura 5.19: Realização dos testes de macrodiluição: CMI e CMB.

5.5.1 Halos de inibição pelo método de difusão em agar e pelo método dos Vapores

De modo a testar a ação dos óleos essenciais nas estirpes seleccionadas, nomeadamente de forte inibição, inibição moderada, fraca inibição ou sem inibição, seguiram-se os critérios dos halos de inibição, abaixo descritos, classificando os microrganismos como [Ostrosky *et al*,2008]:

Tabela 5.7: Critérios de classificação dos halos de inibição.

<i>Susceptibilidade do microrganismo</i>	<i>Medida do halo de inibição (mm)</i>
Sensíveis	Diâmetro do halo de inibição , é igual a ± 3 mm que o halo de inibição do controlo positivo
Moderadamente sensíveis	Diâmetro do halo de inibição maior que 2 mm mas menor que ± 3 mm que o halo de inibição do controlo positivo
Resistentes	Diâmetro do halo de inibição é igual ou menor que 2 mm que o halo de inibição do controlo positivo.

5.6 Halos de inibição pelo método de difusão em agar e Vapor do Controlo negativos e dos Controlos Positivos

Usou-se como controlo negativo a solução 0,15% Agar + DMSO 5%, para melhor emulsão dos óleos essenciais e seus derivados, exceto na sulfona 7 e 8, pois já se encontravam diluídas no solvente DMSO.

Como Controlos Positivos, estudou-se o antibiótico de largo espectro - Gentamicina, e o antibiótico natural beta-lactâmico, que atua sobretudo e maioritariamente em bactérias Gram-positivas- Penicilina.

→ Método de difusão em agar pela técnica do poço:

Tabela 5.8: Resultados da média dos halos de inibição em mm, dos controlos negativo e positivo frente às 3 estirpes.

<i>Estirpes</i>	<i>0,15% Agar + DMSO5%</i>	<i>DMSO</i>	<i>Gentamicina (0,5 mg/mL)</i>	<i>Penicilina (0,5 mg/mL)</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	NI	NI	33	38
<i>Escherichia coli</i>	NI	NI	30,7	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NI	NI	25	NI

*NI: Não houve inibição (ausência de halo de inibição)

→ Método de Vapores:

Tabela 5.9: Resultados da média dos halos de inibição em mm, dos controlos negativam e positivo frente às 3 estirpes.

<i>Estirpes</i>	<i>0,15% Agar + DMSO5%</i>	<i>DMSO</i>	<i>Gentamicina (0,5 mg/mL)</i>	<i>Penicilina (0,5 mg/mL)</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	NI	NI	NI	NI
<i>Escherichia coli</i>	NI	NI	NI	NI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NI	NI	NI	NI

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

5.7 Halos de inibição pelo método de difusão em agar e Vapor dos compostos denominados Sulfona 7 e 8

→ Método de difusão em agar pela técnica do poço:

⇒ No ano letivo 2013/2014 os resultados obtidos foram os seguintes:

Tabela 5.10: Resultados da média dos halos de inibição em mm, das sulfonas 7 e 8 frente às 3 estirpes.

	Concentração do produto (mg/mL)	Concentração do produto (mg/70µL)	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Sulfona 7	0,5	0,035	14	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Média			4,666666667			NI			NI		
Sulfona 8	0,5	0,035	8	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Média			2,666666667			NI			NI		

*NI: Não houve inibição (ausência de halo de inibição)

⇒ No ano letivo 2011/2012 os resultados obtidos foram, melhores, como se pode comprovar na seguinte tabela:

Tabela 5.11: Resultados da média dos halos de inibição em mm, das sulfonas 7 e 8 frente às 3 estirpes.

	Concentração do produto (mg/mL)	Concentração do produto (mg/70µL)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sulfona 7	0,5	0,035	20	8	NI
Sulfona 8	0,5	0,035	20	NI	NI

*NI: Não houve inibição (ausência de halo de inibição)

Como se pode verificar os resultados apresentam uma grande discrepância de valores a nível de atividade antibacteriana. Este facto, pode ser devido ao tempo que o produto está guardado no frio e dissolvido em DMSO. Parte do produto poder-se-á ter evaporado ou degradado, daí a atividade destas, ser neste momento, praticamente insignificante.

Comparando com os controlos positivos usados no trabalho, ambas as sulfonas nas mesmas condições de concentração, apresentavam uma atividade antibacteriana forte frente à bactéria Gram-positiva. No presente, observa-se o contrário.

→ Método de Vapores:

Tabela 5.12: Resultados da média dos halos de inibição em mm, das sulfonas 7 e 8 frente às 3 estirpes.

	Concentração do produto (mg/mL)	Concentração do produto (mg/70µL)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sulfona 7	0,5	0,035	NI	NI	NI
Sulfona 8	0,5	0,035	NI	NI	NI

*NI: Não houve inibição (ausência de halo de inibição)

Este método apenas foi concretizado no presente trabalho. Como era de esperar, e visto que as sulfonas não são compostos voláteis, não se visualizaram halos de inibição frente aos microrganismos estudados. Pode-se afirmar que houve ausência de libertação de vapores e portanto ausência de atividade antibacteriana.

5.8 Halos de inibição pelo método de difusão em agar e Vapor dos produtos da reação de síntese de Oxidação e Epoxidação de Cetonas com HT de MG/Al e uma mistura de H₂O₂ (30%)/Benzonitrilo

→ Método de difusão em agar pela técnica do poço:

Tabela 5.13: Resultados da média dos halos de inibição em mm, dos produtos de síntese frente às 3 estirpes.

	Concentração do produto (mg/mL)	Concentração do produto (mg/70µL)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Carvona	0,5	0,035	NI NI NI	NI NI NI	NI NI NI
Média			NI	NI	NI
7,8-Epoxicarvona (P1-8)	0,5	0,035	NI NI NI	NI NI NI	NI NI NI
Média			NI	NI	NI
7,8-Epoxicarvona (P2-7)	0,5	0,035	NI NI NI	NI NI NI	NI NI NI
Média			NI	NI	NI
1,6,7,8-Diepoxicarvona (P3-6)	0,5	0,035	NI NI NI	NI NI NI	NI NI NI
Média			NI	NI	NI
1,6,7,8-Diepoxicarvona (P5-9+10)	0,5	0,035	NI NI NI	NI NI NI	NI NI NI
Média			NI	NI	NI
1,6,7,8-Diepoxicarvona (P6-10)	0,5	0,035	NI NI NI	NI NI NI	NI NI NI
Média			NI	NI	NI

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

→ Método de Vapores:

Tabela 5.14: Resultados da média dos halos de inibição em mm, dos produtos de síntese frente às 3 estirpes.

	Concentração do produto (mg/mL)	Concentração do produto (mg/70µL)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Carvona	0,5	0,035	NI	NI	NI
7,8-Epoxicarvona (P1-8)	0,5	0,035	NI	NI	NI
7,8-Epoxicarvona (P2-7)	0,5	0,035	NI	NI	NI
1,6,7,8-Diepoxicarvona (P3-6)	0,5	0,035	NI	NI	NI
1,6,7,8-Diepoxicarvona (P5-9+10)	0,5	0,035	NI	NI	NI
1,6,7,8-Diepoxicarvona (P6-10)	0,5	0,035	NI	NI	NI

*NI: Não houve inibição (ausência de halo de inibição)

Após a realização de ambos os métodos verifica-se que nenhum dos subprodutos, numa concentração de 0,5 mg/mL, apresenta atividade antibacteriana. A inexistência de halos de inibição, significa que as estirpes testadas apresentam resistência frente a todos os derivados estudados e obtidos a partir das reações de oxidação e epoxidação da carvona.

5.9 Halos de inibição pelo método de difusão em agar e Vapor do óleo essencial em bruto, a carvona, e das suas diluições 1:2, 1:4 e 1:8.

→ Método de difusão em agar pela técnica do poço:

A concentração da carvona, enquanto extrato bruto, diz respeito à densidade que este apresenta, sendo de 0,96 g/cm³. A partir desta foram calculadas as concentrações para cada diluição e as concentrações existentes por poço.

Tabela 5.15: Resultados da média dos halos de inibição em mm, obtidos no método de difusão por poço de cada composto frente às estirpes Gram-positiva e Gram-negativas.

	Concentração do produto (mg/mL)	Concentração do produto (mg/70µL)	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Carvona (Extrato Bruto)	960	67,2	19	20	22	15	19	21	NI	NI	NI
Média			20,333			18,333			NI		
Diluição 1:2 de Extrato bruto da Carvona	480	33,6	18	20	20	15	15	18	NI	NI	NI
Média			19,333			16			NI		
Diluição 1:4 de Extrato bruto da Carvona	240	16,8	12	12	12	9	10	12	NI	NI	NI
Média			12			10,333			NI		
Diluição 1:8 de Extrato bruto da Carvona	120	8,4	10	11	12	8	9	10	NI	NI	NI
Média			11			9			NI		

*NI: Não houve inibição (ausência de halo de inibição)

Através dos resultados da média dos halos de inibição, pode-se concluir que quando o óleo da R-(-)-carvona é testado em bruto, apresenta forte atividade antibacteriana, quando comparadas com a gentamicina e penicilina numa concentração de 0,5 mg/mL. Apresentam maior bioatividade frente à estirpe Gram-positiva e Gram-negativa, *Escherichia coli*. Em ambos os microrganismos, o decréscimo de atividade antibacteriana à medida que o óleo vai sendo diluído, é notória.

De modo a complementar este trabalho, os resultados anteriormente descritos foram analisados através da análise estatística no programa IBM SPSS Statistics 20.

Para a análise estatística, os factores envolvidos são as variáveis independentes (as três estirpes em estudo e as diluições do óleo essencial) e uma variável dependente (os halos de inibição). A variável dependente apresentou-se normal, permitindo a utilização da ANOVA two-way.

O resultado da significância para a homogeneidade da variância é em ambas as estirpes $>0,05$ (Teste de Levene), como se pode ver posteriormente nos apêndices, o que demonstra que as variâncias nos grupos são iguais, levando a concluir que é conhecido o pressuposto da ANOVA.

Verifica-se que todos os valores são significantes ($<0,05$), pois tanto as diluições como os extratos do óleo afetam o diâmetro dos Halos de inibição. No caso da interação entre os dois fatores independentes, pode-se concluir o extrato e diluições são dependentes entre si ($p <0,05$)

Como não há indicação de qual diluição ou extrato, que afeta mais a inibição bacteriana, é necessário efetuar-se um teste *post hoc*. Por múltiplas comparações e efetuando o teste de Tukey, obtêm-se os seguintes resultados:

Tabela 5.16: Resultados da média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm) \pm o desvio padrão (Teste de Tukey, a 5% de probabilidade)

	Concentração do produto (mg/mL)	Concentração do produto (mg/70 μ L)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Carvona (Óleo Bruto)	960	67,2	20,333 \pm 0,624	18,333 \pm 1,143
Diluição 1:2 de óleo bruto da Carvona	480	33,6	19,333 \pm 0,625	16,000 \pm 1,143
Diluição 1:4 de óleo bruto da Carvona	240	16,8	12,000 \pm 0,626	10,333 \pm 1,143
Diluição 1:8 de óleo bruto da Carvona	120	8,4	11,000 \pm 0,627	9,000 \pm 1,143

De acordo com os resultados, pode-se concluir que existe uma diferença significativa entre o diâmetro dos halos de inibição para o extrato de óleo bruto da carvona em relação aos outros extratos testados, se bem que os resultados para a diluição 1:2 são muito próximos dos da carvona em óleo bruto.

Teve-se em conta para todos os extratos as diferentes concentrações. Estas têm diferença estatística ($p <0,05$), sendo que a de 960 mg/mL é a que possui melhores resultados, frente a ambos os microrganismos.

→ **Método de Vapores:**

Tabela 5.17: Resultados da média dos halos de inibição obtidos no método de vapores de cada composto frente às estirpes Gram-positiva e Gram-negativas.

	Concentração do produto (mg/mL)	Concentração do produto (mg/70µL)	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
Carvona (Óleo Bruto)	960	67,2	41	42	40	29
Média			41,5		34,5	
Diluição 1:2 de óleo bruto da Carvona	480	33,6	19	24	12	15
Média			21,5		13,5	
Diluição 1:4 de óleo bruto da Carvona	240	16,8	0	17	7	24
Média			8,5		15,5	
Diluição 1:8 de óleo bruto da Carvona	120	8,4	NI	NI	NI	NI
Média			NI		NI	

*NI: Não houve inibição (ausência de halo de inibição)

Esta técnica consiste em verificar se o vapor do óleo essencial tem efeito antimicrobiano contra um determinado microrganismo. A carvona em óleo bruto e a diluição 1:2, são as que apresentam melhores resultados, a nível de média dos halos de inibição, notando a existência de volatilidade do óleo.

Em comparação com o teste de difusão em agar pela técnica de poço, conclui-se que os resultados a nível volátil têm maiores halos de inibição que os de difusão no meio de cultura.

5.9.1 CMI e CMB do óleo em bruto da carvona frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

A determinação da CMI e CMB foi realizada segundo o que se apresenta descrito no procedimento no capítulo 3. Alguns dos problemas desta metodologia é o facto de ser muito morosa, daí apenas se testar o óleo em bruto da carvona devido aos bons resultados apresentados frente a *S.aureus* e *E.coli*, nos métodos de difusão em agar pela técnica de poço e vapores. São técnicas mais trabalhosas e é complicado encontrar a solução correta que emulsione o óleo essencial.

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},
- A CMI_{REAL} irá situar-se entre a CMI_{OBSERVADA} e a diluição adjacente mais alta.

Quanto 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.

Visto que, em todos os ensaios, foi usado um inoculo de 10^6 UFC/ml, considera-se 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).

Os resultados encontram-se de seguida, esquematizados em tabela:

Tabela 5.18: CMI e CMB observadas e reais, e concentrações de óleo essencial de R-(-)-Carvona.

	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Valores Observados:				
Diluições	[1:8]	[1:8]	[1:4]	[1:4]
Concentração (mg/mL)	120	120	240	240
Valores Reais:				
Diluições	[1:8;1:16]		[1:4;1:8]	
Concentração (mg/mL)	[120;60]		[240;120]	

Aquando da visualização do tubo de CMI da diluição 1:2 do extrato em bruto da carvona, não se visualizou qualquer turvação perante ambas as estirpes, o que significa que não houve crescimento bacteriano. De seguida o tubo da diluição 1:4, 1:8 e 1:16 de CMI criaram uma certa dúvida a nível de turvação, pelo que nos levou a testar a CMB pela contagem de colónias.

Para determinação de CMB, analisei alguns dos tubos em que tinha dúvidas aquando a visualização dos resultados de CMI, inoculando 0,1 mL de cada tubo em duplicado, obtendo assim colónias isoladas de modo a obter a CMB. Os resultados da contagem das colónias estão de seguida apresentados na tabela 5.19:

Tabela 5.19: Média da Contagem de colónias visualizadas nos tubos de CMI testando o procedimento de CMB para se obter uma certeza da realidade.

<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
CMI	CMB	CMI	CMB
1:4	≥ 300 Colónias	1:4	7 Colónias
1:8	44 Colónias	1:8	2 Colónias
1:16	3 Colónias	1:16	0 Colónias

5.9.2 Comparação entre os halos de inibição, CMI e CMB do óleo essencial em bruto

Tabela 5.20: Comparação dos halos de inibição obtidos pela técnica de perfuração em agar com os resultados de macrodiluição na determinação de CMI e CMB, para as estirpes *E.coli* e *S.aureus*.

	<i>Óleo Essencial Bruto (mg/mL)</i>	<i>Média do halo de inibição</i>	<i>Óleo Essencial Bruto (mg/poço)</i>	<i>CMI real (mg/mL)</i>	<i>CMB real (mg/mL)</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	960	20,3	67,2	[120;60]	[120;60]
<i>Escherichia coli</i>	960	18,3	67,2	[240;120]	[240;120]

Perante os resultados descritos, pode-se afirmar que os resultados são muito semelhantes em ambas as bactérias. Não existe uma grande discrepância nos métodos de atividade antibacteriana por poços, vapores, CMI e CMB. Contudo os resultados mostram maior inibição da estirpe Gram-positiva *Staphylococcus aureus*.

5.10 Modo de Ação bacteriana

O modo de ação antibacteriana dos óleos essenciais reflete no modo como estes destoem o microrganismo, ocorrendo a morte celular. Os monoterpenos interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória.

Esta ação pode ser sugerida pela composição de cada óleo essencial. Pensa-se que a atividade antibacteriana dos óleos essenciais não seja atribuída a um só mecanismo específico, mas que existem vários alvos na célula, devido aos vários componentes existentes nos óleos essenciais. Nem todos estes mecanismos se realizam em separado. Alguns são afetados como uma consequência de outro mecanismo ocorrendo sinergia entre os vários componentes constituintes do óleo. O antagonismo entre as diversas frações também deve ser um fator a ter em conta.

“Estudo da Actividade Antibacteriana da Carvona e seus derivados”.

CAPITULO 6

6. Considerações finais

Este trabalho teve como principal objetivo estudar as atividades antibacterianas do óleo essencial R-(-)-Carvona e seus derivados das reações de oxidação de cetonas com HT de Mg/Al e uma mistura de H₂O₂(30%)/Benzonitrilo, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias escolhidas foram: *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 omnipresente representativa do meio ambiente.

Foram utilizadas três metodologias de *screening*: difusão em agar pela técnica de cavidades cilíndricas e pela técnica de vapor, diluição em caldo (macrodiluição) para obtenção da CMI e CMB. Os ensaios realizados neste estudo basearam-se em técnicas já existentes descritas em diversos artigos e ensaios experimentais que aqui não são descritos, mas que ajudaram a aperfeiçoar a prática de modo a obter resultados mais conclusivos e metodologias mais consistentes.

Depois de efetuadas as reações e a extração dos produtos por cromatografia em coluna, pode-se concluir que o melhor rendimento de produto 7,8-epoxicarvona deu-se na reação P1, 29.96%, onde foram usadas, inicialmente, 500 mg de R-(-)-Carvona e um excesso de peróxido de hidrogénio. Quanto à obtenção da 1,6,7,8-diepoxicarvoana, o melhor rendimento obtido foi na reação P6, 60%, partindo inicialmente de 600 mg de carvona.

Podemos ainda concluir que, após a recolha das frações obtidas nas reações por separação em coluna cromatográfica, os compostos 7,8-epoxicarvona e 1,6,7,8-diepoxicarvona ocorrem muitas das vezes na mesma reação. Pois, é normal, segundo certas condições reacionais ocorrer a oxidação do composto cetónico e a sua epoxidação.

Foi efetuada a caracterização das frações de óleo da R-(-)-Carvona e os seus derivados 7,8-Epoxicarvona e 1,6,8,9-Diepoxicarvona, por espectroscopia de Ressonância Magnética e Nuclear de protão e carbono, pelos quais se conseguiu codificar a estrutura molecular de cada composto estudado neste projeto. Para avaliar as suas atividades antibacterianas, dissolveram-se os produtos numa emulsão de Agar 0,15% + DMSO 5%, de modo a obter-se amostras com uma concentração final de 0,5 mg/mL, homogéneas, sem diferença de fases e com menor interferência nos resultados.

Primeiramente testou-se a R-(-)-Carvona e o componente maioritário de cada reação (concentração de 0,5 mg/mL), pelo método de difusão por perfuração em agar e pelo método de Vapores. Os resultados foram negativos pelo que nenhum dos produtos apresentou efeito inibitório sobre os microrganismos testados. Os resultados negativos foram coerentes em ambos os métodos de screening.

Posteriormente, realizaram-se os testes de difusão em agar por poços e pelo método de vapores para o óleo essencial R-(-)-Carvona em bruto (960 mg/mL), e para as suas diluições de 1:2 (480 mg/mL), 1:4 (240 mg/mL) e 1:8 (120 mg/mL). Os resultados neste caso foram positivos, verificando inibição sobre os microrganismos testados.

Conclui-se que o extrato bruto do óleo da Carvona e a sua diluição 1:2 apresentam uma boa inibição perante estirpe *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e a estirpe Gram-negativa *Escherichia coli*, quando comparados com os antibióticos usados numa concentração de 0,5 mg/mL. Ambas as estirpes, anteriormente referidas apresentam bioactividade semelhante com difusão do óleo no meio de cultura agar e através da sua volatilidade. A bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrou-se resistente perante este óleo essencial em extrato bruto e suas diluições.

Como se pode verificar nos resultados, a carvona é um composto volátil, comprovando-se este facto no método de difusão em agar pelo teste dos vapores. O extrato bruto do óleo da carvona e as suas diluições 1:2 e 1:4, apresentam libertação de vapor e assim inibição de *S.aureus* e *E.coli*.

Através dos ensaios para CMI e CMB, da carvona em extrato bruto, comprovam-se os resultados de halos de inibição pela técnica de difusão em agar por poços a nível de resultados positivos.

Posteriormente, realizou-se a avaliação da atividade antibacteriana da sulfona 7 e 8, compostos já testados no meu projeto de licenciatura. Quando testados pela primeira vez no ano 2011/2012, estas, dentre todos os compostos contendo o grupo sulfona que estudei, foram as que melhor e mais forte atividade antibacteriana através da média dos halos de inibição, apresentaram. Mostraram-se mais ativas, principalmente sobre o microrganismo Gram-positivo (*S.aureus*), comparativamente com o antibiótico Gentamicina nas mesmas condições de concentração. No presente ao letivo quando as voltei a estudar nas mesmas condições iniciais, os resultados foram completamente o oposto. Apresentaram uma fraca atividade antibacteriana frente a *S.aureus* e não apresentaram inibição frente às bactérias Gram-negativas. O facto de se manterem já há dois anos dissolvidas em DMSO pode ter alterado a sua estrutura e composição ou até mesmo tê-las destruído enquanto moléculas. Quanto ao método dos vapores, e como já era esperado, não apresentaram halos de inibição frente aos microrganismos testados, pois estes compostos não são voláteis.

Pode-se concluir que a bactéria mais resistente, encontrada no presente trabalho é a *Pseudomonas aeruginosa*, devido à sua constituição membranar. Vários estudos sobre produtos naturais, nomeadamente os óleos essenciais, a nível de artigos científicos bem como por alunos orientados pelo meu orientador de Mestrado, referem a dificuldade que existe em inibir a bactéria Gram-negativa, *Pseudomonas aeruginosa*.

Já a bactéria que melhores resultados demonstra, neste caso, devido ao facto de ser mais facilmente inibida por certos compostos, principalmente óleos essenciais, é a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*.

O óleo essencial, Carvona, tem grande importância comercial amplamente usado na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética.

▪ **Projetos futuros:**

- ✓ Realizar a reação de Bayer-Villager a partir do Óleo essencial, comercializado, a R-(-)-Carvona. Posteriormente avaliar a atividade antibacteriana dos produtos da reação de Bayer-Villager. Foram efetuadas algumas tentativas no decorrer deste trabalho prático, mas nenhuma teve o sucesso pretendido;
- ✓ Conseguir obter a sulfona 7 e 8, com a sua estrutura e peso inicial, e estudar novamente a atividade antibacteriana desta, para confirmar os bons resultados obtidos anteriormente no meu projeto de licenciatura e poder-se estudar a sua concentração mínima inibitória e bactericida;
- ✓ Estudar o efeito da Resazurina nos estudos de CMI e CMB realizados, para uma melhor verificação a olho nu da existência ou inexistência de crescimento bacteriano;
- ✓ Estudar os efeitos sinérgicos e antagónicos dos vários produtos maioritários;
- ✓ Estudar a existência de possíveis interações entre o óleo essencial e o emulsionante, verificando se agem antagónica ou sinérgicamente, testando com vários tipos de emulsionantes.

“Estudo da Actividade Antibacteriana da Carvona e seus derivados”.

CAPITULO 7

7. Bibliografia

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

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

Almeida, P.P.de, (2006). “Extração de óleo essencial de Hortelã (*Mentha spicata* L.) com misturas de solventes a alta pressão”. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

Arruda, T.A., Antunes, R.M.P, Catão, R.M.R., Lima, E.O., Sousa, D.P., Nunes, X.P., Pereira, M.S.V., Filho, J.M.B., Cunha, E.V.L., (2006). “Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues.” Revista Brasileira de Farmacognosia, 16(3):307-311.

Bakkali,F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar,M., (2008). “Biological effects of essential oils - A review”. Food and Chemical Toxicology, 46, 446-475.

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

Barry A.L., Craig W.A., Nadler H., Reller L.B., Sanders C.C. e Swenson J.M., (1999). “Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial Agents”. Approved Guideline NCCLS, M26-A, Vol. 19, N° 18.

Burt, S., (2004). “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review”. International Journal of Food Microbiology, 94, 223- 253.

Carvalho, C.C:C.R.de, Fonseca, M.M.R.de, (2006). “Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene.” Science Direct, Food Chemistry, 95, 413-422.

Chung; H.K., Yang, K.S., Kim, J., Kim, J.C., Lee, K.Y., (2007). “Antibacterial Activity of Essential Oils on the Growth of *Staphylococcus aureus* and Measurement of their

- Binding Interaction Using Optical Biosensor”. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(11), 1848-1855.
- Costa, D.A., Oliveira, G.A.L.D., Costa, J.P., Souza, G.F.D., Sousa, D.P.D., Freitas, R.M.D., (2012). “Avaliação da Toxicidade Aguda e do Efeito Ansiolítico de um Derivado Sintético da Carvona”. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, 16, 303-310.
- Cowan, M.M., (1999). “Plant Products as Antimicrobial Agents”. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Curti, C., M. Laget, (2007). "Rapid synthesis of sulfone derivatives as potential anti-infectious agents." *European Journal of Medicinal Chemistry* 42(6): 880-884.
- Ehlert, P.A.D., Ming, L.C., Marques, M.O.M., Fernandes, D.M., Rocha, W.A., Luz, J.M.Q., Silva, R.F., (2013). “Influência do horário de colheita sobre o rendimento e composição do óleo essencial de erva-cidreira brasileira [*Lippia alba*(Mill)N.E.Br.]”. *Revista Brasileira de plantas medicinais, Botacatu*, v.15, n.1, p.72-77.
- Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venâncio F., Tavares R., Brito J.C., Figueiredo A.C., Barroso J.G. e Pedro L.G., (2003). “Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*”. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 35-40.
- Ferraro M.J., Wikler M.A., Craig W.A., Dudley M.N., Eliopoulos G.M., Hecht D., W., Hindler J., Reller L.B., Sheldon A.T., Swenson J.M., Tenover F.C., Testa R.T. e Weinstein M.P., (2003). “Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico”. Norma aprovada - Sexta edição, NCCLS, M7-A6, Vol.23, No. 2, pag.11.
- Ferreira, W. F. Canas, Sousa, J.C. F. D., Lima, N.,(2010). “Microbiologia”. Lidel-edições técnicas, lda
- FLORES, D. R. O. R., (1979). "Tratamiento de la lepra."
- França, T.G.D., (2009). “Efeito da desnutrição protéico-calórica experimental na resposta imune e na susceptibilidade à infecção por *Staphylococcus aureus*”. Dissertação de Mestrado, BOTUCATU-SP.
- Gonçalves, J.C.R., Alves, A.D.M.H., Araújo, A.E.D., Cruz, J.S., Araújo, D.A.M., (2010). “Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats”. *European Journal of Pharmacology*, 645, 108-112.

- Gondo, G.D.G.A., (2012). “Avaliação da Actividade Quimiopreventiva Citotóxica e Antimicrobiana da Carvona e Derivados”. Universidade estadual Paulista, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Araraquara.
- Gonzaga, J.C., (2008). “Epoxidación regioselectiva de diofelinas terpénicas mediante catalizadores heterogéneos”. Tesis doctoral, Universidade Complutense de Madrid, Espanha.
- Laciar, S., Ruiz, R.L.V., Flores, R.C., Saad, J.R., (2009). “Antibacterial and antioxidante activities of the essential oil of *Artemisia echegarayi* Hieron. (Asteraceae)”. *Revista Argentina de Microbiologia*, 41, 226-231.
- Madigan, Martinko, Parker, (2004) “Microbiologia de Brock”. Editora Prentice Hall Brasil, 10ª edição.
- Mahajan, N. S., Jadhav, R.L., Pimpodkar, N. V., Dias, R.J., Manikrao, A. M., (2009). “Green Solid Oxidation of Sulfides to Sulfones Using Oxone and Biological Evaluation”. *Asian Journal of Chemistry*, 21 v., 5415-5420 p.
- Martini, M.G., (2011). “Análise química e da actividade antimicrobiana dos oleos essenciais de *Ocimum selloi* Benth, *Hesperozygis myrtoides* (A. ST.-Hil) Epling e *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae)”. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas.
- Mayer, G., (2011). “Antibióticos- Síntese de proteínas, síntese de ácidos nucleicos e metabolismo”. *Bacteriologia, Microbiologia e Imunologia Online*, capítulo 6, 6ª Edição.
- Nascimento, P. F.C., Nascimento, A. C., Rodrigues, C.S., Antonioli, A.R., Santos, P.O., Júnior, A.M.B., Trindade, R.C., (2007). “Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos”. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1):108-113.
- Neves, P.P., (2012). “Estudo da Composição dos Produtos da Reação de Baeyer-Villiger da Carvona”. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química Industrial, Covilhã.
- Neves, P.R., Mamizuka, E.M., Levy, C.E., Lincopan, N., (2011). “ *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil”. *J Bras Med Lab*, v.47, n.4, p.409-420.
- Nogueira, J. M. R.; Miguel, L.F.S.. “Conceitos e Métodos para a formação de Profissionais em laboratórios de Saúde- Bacteriologia”. Capítulo 3.

- Oliveira, B.D., (2009). “Biotransformação da R-(+) e S-(-) Carvona por fungos filamentosos”. Universidade Estadual de Goiás, Programa de Pós Graduação em Ciências Moleculares, Anapolis.
- Opromolla, D. V. A.,(1997). “Terapêutica da hanseníase”. Medicina Ribeirão Preto 30: 345-350.
- 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.
- Paredes, F., Roca, J.J., (2004). “Âmbito Farmacêutico - Farmacologia”. Volume 23.
- Pelczar Jr., M. J.; Chan, E.C.C; Krieg, N. R.; (1996). “Microbiologia - Conceitos e Aplicações”. 2ª Edição, Volume 2; MAKRON Books do Brasil Editora Ltda.
- Peña, J., Moro, R.F., Basabe, P., Marcos, I.S., Diez, D., (2012). “Solvent free L-proline-catalysed domino Knoevenagel/6 π -electrocyclization for the synthesis of highly functionalised 2H-pyrans”. RSC Advances, 2, 8041-8049.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J., (2007). “Farmacologia”. 6ª edição.
- Rodrigues, C.V.F.,(2010) “Estudo da actividade antibacteriana de diversos óleos essenciais”. Dissertação para obter o Grau de Mestre, Unversidade da Beira Interior, Covilhã.
- SAGA, T. and K. YAMAGUCHI, (2009). "History of antimicrobial agents and resistant bacteria." JMAJ Japan Medical Association Journal 52(2): 103-108.
- Santos, A.L.D., Santos, D.O., Freitas, C.C.D., Ferreira, B.L.A, Afonso, ilídio F., Rodrigues, C.R., Castro, H.C., (2007). “Staphylococcus aureus: visiting a strain of clinical importance”. J Bras Patol Med Lab; V.43,nº 6,p.413-423.
- Sell, C.S., (2003). “A fragrant introduction to terpenoid chemistry”. Royal Society of Chemistry, 76-100.
- Silva, N.C.C., (2010). “Estudo comparativo da acção antimicrobiana de extratos de óleos essenciais de plantsa medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas.” Universidade Estadual Paulista, Dissertação para obtenção do titulo de Mestre, Botucatu-SP.
- Sousa, C.T.D., Machado, T.F., Nogueira, N.A.P., Lima, E.C.D. “Avaliação da atividade antimicrobiana do óleos essencial de Lippia alba frente ao Saphylococcus aureus, à Salmonella choleraesuis, Echerichia coli e Pseudomona aeruginosa”. Universidade Fedral do Ceará, Embræoa Agroindustria Tropical, Brasil.

- Sousa, D.P.de, Nóbrega, F.F.de F., Almeida, R.N.de, (2007). "Influence of the chirality of (R)-(-)-and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: A comparative study". Wiley InterScience, Chirality 19:264-268.
- Sousa, J.C.de, (2006). "Manual de Antibióticos Antibacterianos". Edições Universidade Fernando Pessoa, 2ª Edição.
- Souza, F.V.M., Rocha, M.B.da, Souza, D.P.da, Marçal, R.M., (2013). "(-)-Carvone: Antisasmotic effect and mode of action". Journal Elsevier, Fitoterapia, 85, 20-24.
- Todar, K., (2002)." Pathogenic E. coli". Todar's Online of Bacteriology; University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology; 2002.
- Todar, K., (2004)." Pseudomonas aeruginosa". Todar's Online of Bacteriology; University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology; 2004.
- Todar, K., (2005). "Staphylococcus". Todar's Online of Bacteriology; University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.
- Todar, K., (2005). "Todar's Online of Bacteriology". www.textbookofbacteriology.net
- Valeriano, C., Piccoli, R.H., Cardoso, M.G., Alves, E., (2012). "Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar". Revista Brasileira de plantas medicinais, Botucatu, .4, n.1, p.57-67.
- Wen, D., Liu, Y., Li, W., Liu, H., (2004). "Separation methods for antibacterial and antirheumatism agents in plant medicines". Journal of Chromatography B, 812, 101-117.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J., (2011). "Prescott's Microbiology". International Edition, 8ª Edição.

“Estudo da Actividade Antibacteriana da Carvona e seus derivados”.

Apêndices

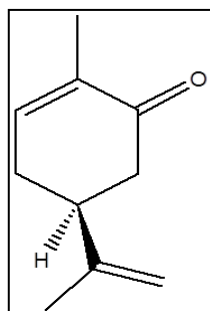
Apêndice A

✓ Procedimento para a preparação da hidrotalcita de Mg/Al:

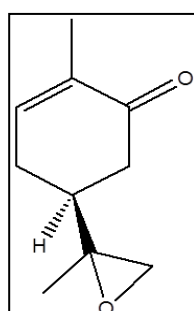
A hidrotalcita foi preparada a partir de uma solução aquosa contendo 15 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ e 5,9 g de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ em 100 ml de água destilada. Esta solução foi adicionada lentamente (gota a gota) sobre 100 ml de uma segunda solução aquosa de 2,7 g de Na_2CO_3 , cujo pH foi ajustado previamente a 11,5 através da adição de NaOH 1M. O pH selecionado foi mantido constante durante todo o processo utilizando um medidor de pH com dosímetro controlado. A agitação foi mantida constante e forte durante todo o processo. À medida que avança a adição da solução de cátions sobre a solução de carbonato, observa-se a formação de uma suspensão branca. Após a finalização da adição, a suspensão foi mantida em agitação a pressão e temperatura ambiente durante 24h. Subsequentemente, a suspensão foi centrifugada e o sólido foi lavado cuidadosamente com água destilada até à eliminação total dos aniões cloreto das águas de lavagem. Finalmente, o sólido obtido foi seco em estufa a 45°C.

Apêndice B

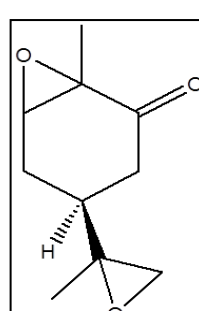
✓ Estruturas de todos os compostos testados neste trabalho



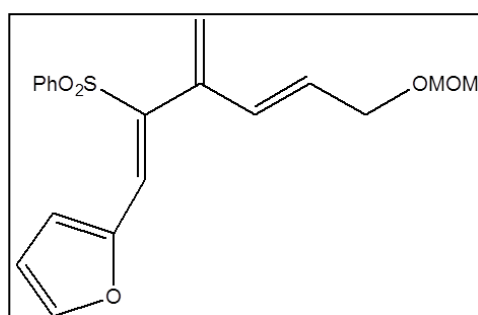
R-(-)-Carvona



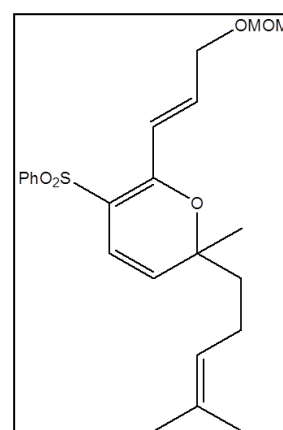
7,8-EpoxiCarvona



1,6,7,8-DiepoxiCarvona



Sulfona 7



Sulfona 8

Apêndice C

1. Óleo essencial Carvona (extrato bruto) - Estirpe *Staphylococcus aureus*

Tabela 8.1: Teste de Levene para igualdade de Variâncias.

Variável dependente: Halos de inibição (mm)

F	df1	df2	Sig.
2,872	3	8	0,104

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

a. Intercepção + Diluições + Extractos + Diluições * Extractos

Tabela 8.2: Teste de efeitos entre grupos.

Variável dependente: Halos de inibição (mm)

Parâmetro	Soma dos quadrados	df	Quadrado da média	F	Sig.
Modelo Corrigido	211,333 ^a	3	70,444	60,381	0
Intercepção	2945,333	1	2945,333	2524,571	0
Extractos	0	0	.	.	.
Diluições	0	0	.	.	.
Extractos * Diluições	0	0	.	.	.
Erro	9,333	8	1,167		
Total	3166	12			
Total corrigido	220,667	11			

a. R quadrado = 0,958 (R Squared Ajustado = 0,942)

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 8.3: Comparação entre os grupos das diluições.

(I) Diluições	(J) Diluições	Diferença da média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
960 mg/mL	480 mg/mL	1	0,88192	0,681	-1,8242	3,8242
	240 mg/mL	8,3333*	0,88192	0	5,5091	11,1575
	120 mg/mL	9,3333*	0,88192	0	6,5091	12,1575
480 mg/mL	960 mg/mL	-1	0,88192	0,681	-3,8242	1,8242
	240 mg/mL	7,3333*	0,88192	0	4,5091	10,1575
	120 mg/mL	8,3333*	0,88192	0	5,5091	11,1575
240 mg/mL	960 mg/mL	-8,3333*	0,88192	0	11,1575	-5,5091
	480 mg/mL	-7,3333*	0,88192	0	10,1575	-4,5091
	120 mg/mL	1	0,88192	0,681	-1,8242	3,8242
120 mg/mL	960 mg/mL	-9,3333*	0,88192	0	12,1575	-6,5091
	480 mg/mL	-8,3333*	0,88192	0	11,1575	-5,5091
	240 mg/mL	-1	0,88192	0,681	-3,8242	1,8242

Tabela 8.4: Comparação entre os grupos dos extractos.

(I) Extratos	(J) Extratos	Diferença da Média (I-J)	Desvio padrão	Sig.	Intervalo de confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
Óleo bruto Carvona	Diluição 1:2 do óleo em bruto da carvona	1,0000	,88192	,681	-1,8242	3,8242
	Diluição 1:4 do óleo em bruto da carvona	8,3333*	,88192	,000	5,5091	11,1575
	Diluição 1:8 do óleo em bruto da carvona	9,3333*	,88192	,000	6,5091	12,1575
Diluição 1:2 do óleo em bruto da carvona	Óleo bruto Carvona	-1,0000	,88192	,681	-3,8242	1,8242
	Diluição 1:4 do óleo em bruto da carvona	7,3333*	,88192	,000	4,5091	10,1575
	Diluição 1:8 do óleo em bruto da carvona	8,3333*	,88192	,000	5,5091	11,1575
Diluição 1:4 do óleo em bruto da carvona	Óleo bruto Carvona	-8,3333*	,88192	,000	-11,1575	-5,5091
	Diluição 1:2 do óleo em bruto da carvona	-7,3333*	,88192	,000	-10,1575	-4,5091
	Diluição 1:8 do óleo em bruto da carvona	1,0000	,88192	,681	-1,8242	3,8242
Diluição 1:8 do óleo em bruto da carvona	Óleo bruto Carvona	-9,3333*	,88192	,000	-12,1575	-6,5091
	Diluição 1:2 do óleo em bruto da carvona	-8,3333*	,88192	,000	-11,1575	-5,5091
	Diluição 1:4 do óleo em bruto da carvona	-1,0000	,88192	,681	-3,8242	1,8242

Baseado em médias observadas. O termo erro refere-se ao Quadrado da média (Erro) = 1,167.

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

2. Óleo essencial Carvona (extrato bruto) - Estirpe *Escherichia coli*

Tabela 8.5: Teste de Levene para igualdade de Variâncias.

Variável dependente: Halos de inibição (mm)

F	df1	df2	Sig.
1,671	3	8	,250

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 8.6: Teste de efeitos entre grupos.

Variável dependente: Halos de inibição (mm)

Parâmetro	Soma dos quadrados	df	Quadrado da média	F	Sig.
Modelo Corrigido	179,583 ^a	3	59,861	15,284	,001
Intercepção	2160,083	1	2160,083	551,511	,000
Extractos	,000	0	.	.	.
Diluições	,000	0	.	.	.
Extractos * Diluições	,000	0	.	.	.
Erro	31,333	8	3,917		
Total	2371,000	12			
Total corrigido	210,917	11			

b. R quadrado = 0,851 (R Squared Ajustado = 0,796)

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 8.7: Comparação entre os grupos das diluições.

(I) Diluições	(J) Diluições	Diferença da média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
960 mg/mL	480 mg/mL	2,3333	1,61589	,509	-2,8413	7,5080
	240 mg/mL	8,0000*	1,61589	,005	2,8253	13,1747
	120 mg/mL	9,3333*	1,61589	,002	4,1587	14,5080
480 mg/mL	960 mg/mL	-2,3333	1,61589	,509	-7,5080	2,8413
	240 mg/mL	5,6667*	1,61589	,033	,4920	10,8413
	120 mg/mL	7,0000*	1,61589	,011	1,8253	12,1747
240 mg/mL	960 mg/mL	-8,0000*	1,61589	,005	-13,1747	-2,8253
	480 mg/mL	-5,6667*	1,61589	,033	-10,8413	-,4920
	120 mg/mL	1,3333	1,61589	,841	-3,8413	6,5080
120 mg/mL	960 mg/mL	-9,3333*	1,61589	,002	-14,5080	-4,1587
	480 mg/mL	-7,0000*	1,61589	,011	-12,1747	-1,8253
	240 mg/mL	-1,3333	1,61589	,841	-6,5080	3,8413

Baseado em médias observadas.

O termo erro refere-se ao Quadrado da média (Erro) = 3,917

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

Tabela 8.8: Comparação entre os grupos dos extractos.

(I) Extratos	(J) Extratos	Diferença da Média (I-J)	Desvio padrão	Sig.	Intervalo de confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
Óleo bruto Carvona	Diluição 1:2 do óleo em bruto da carvona	2,3333	1,61589	,509	-2,8413	7,5080
	Diluição 1:4 do óleo em bruto da carvona	8,0000*	1,61589	,005	2,8253	13,1747
	Diluição 1:8 do óleo em bruto da carvona	9,3333*	1,61589	,002	4,1587	14,5080
Diluição 1:2 do óleo em bruto da carvona	Óleo bruto Carvona	-2,3333	1,61589	,509	-7,5080	2,8413
	Diluição 1:4 do óleo em bruto da carvona	5,6667*	1,61589	,033	,4920	10,8413
	Diluição 1:8 do óleo em bruto da carvona	7,0000*	1,61589	,011	1,8253	12,1747
Diluição 1:4 do óleo em bruto da carvona	Óleo bruto Carvona	-8,0000*	1,61589	,005	-13,1747	-2,8253
	Diluição 1:2 do óleo em bruto da carvona	-5,6667*	1,61589	,033	-10,8413	-,4920
	Diluição 1:8 do óleo em bruto da carvona	1,3333	1,61589	,841	-3,8413	6,5080
Diluição 1:8 do óleo em bruto da carvona	Óleo bruto Carvona	-9,3333*	1,61589	,002	-14,5080	-4,1587
	Diluição 1:2 do óleo em bruto da carvona	-7,0000*	1,61589	,011	-12,1747	-1,8253
	Diluição 1:4 do óleo em bruto da carvona	-1,3333	1,61589	,841	-6,5080	3,8413

Baseado em médias observadas. O termo erro refere-se ao Quadrado da média (Erro) = 3,917

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