

RESSALVA

Alertamos para ausência das páginas pré-textuais não incluídas pela autora no arquivo original.

Machado, Bruna Fernanda Murbach Teles. Óleos essenciais: verificação da ação antimicrobiana *in vitro*, na água e sobre a microbiota da pele humana / Botucatu : [s.n.], 2011
Dissertação

Resumo:

Esta dissertação encontra-se dividida em introdução geral e 3 capítulos, sendo estes no formato de manuscritos a serem enviados para publicação em 3 periódicos distintos. Considerando a crescente utilização dos produtos naturais, especialmente dos obtidos a partir de plantas, objetivou-se estudar a ação antibacteriana de 27 óleos essenciais de uso em aromaterapia, sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* (n=10), *Escherichia coli* (n=9), e *Pseudomonas aeruginosa* (n=9), isoladas de casos clínicos humanos, utilizando a metodologia dos discos (difusão) e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (diluição) em Mueller Hinton Ágar (Capítulo I). Verificou-se que as linhagens de *S. aureus* foram mais susceptíveis que as de Gram negativas, sendo que os valores de CIM90% foi de 0,21mg/mL para os óleos de pimenta negra (*Piper nigrum*) e tea tree (*Melaleuca alternifolia*) e 26,52mg/mL para o óleo de copaíba (*Copaíba officinalis*). Para *E. coli*, o óleo de canela (*Cinnamomum cassia*) foi o mais efetivo, com 2,0 mg/mL para CIM90% enquanto para *P. aeruginosa* o valor foi de 8,29 mg/mL com cravo da índia (*Syzygium aromaticum*). Utilizando valores de CIM obtidos *in vitro* foram selecionados 5 óleos (cravo da índia-*Syzygium aromaticum*, gerânio-*Pelargonium graveolens*, lavanda -*Lavandula angustifolia*, palmarosa-*Cymbopogon martini* e tea tree-*Melaleuca alternifolia*) e novamente sobre linhagens de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, foi verificada a ação antibacteriana através da diluição individual de cada óleo em água e salina visando redução na contagem bacteriana em função do tempo (Capítulo II). Tanto nos ensaios em água quanto salina, verificou-se que o perfil de sensibilidade das linhagens bacterianas aos óleos essenciais foram próximos entre si, porém significativamente distintos comparados aos ensaios controles. Os óleos essenciais demonstraram o potencial inibidor sobre as três linhagens bacterianas, sendo os resultados obtidos distintos dos obtidos *in vitro* em ágar, com as Gram negativas apresentando maior susceptibilidade que o *S. aureus*. Como etapa final do estudo, foram realizados ensaios visando verificar os efeitos dos 5 óleos mencionados acima diretamente sobre a microbiota da pele humana, sendo que para este objetivo foram realizados ensaios com aplicações de preparados individuais a base de óleo de semente de uva, contendo individualmente os óleos essenciais na concentração de 2% em áreas do braço e antebraço de 15 voluntários, seguido de obtenção de amostras da microbiota destas áreas utilizando placas contendo meios de cultura (MacConkey Ágar, Manitol Salt Ágar e Plate Count Ágar) pela metodologia de contato (Rodac-Plate) (Capítulo III). Verificou-se que os preparados não foram capazes de reduzir as contagens bacterianas da microbiota da pele humana quando comparados com os respectivos controles. Assim sendo, verificou-se a ação antibacteriana dos óleos testados, porém o potencial antibacteriano variou em função da bactérias, óleos testados e metodologias utilizadas.

Palavras-chave: óleos essenciais; atividade antibacteriana; água; microbiota; concentração inibitória mínima; método da difusão.

Abstract:

This thesis is divided into general introduction and three chapters, which are in the format of manuscripts to be submitted for publication in three separate journals. Considering the increasing use of natural products, especially those obtained from plants, aimed to study the antibacterial activity of 27 essential oils used in aromatherapy, on *Staphylococcus aureus* (n=10), *Escherichia coli* (n=9), and *Pseudomonas aeruginosa* (n=9), isolated from human clinical cases, using the methodology of the disks (diffusion) and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) (dilution) on Mueller Hinton Agar (Chapter I). It was found that the strains of *S. aureus* were more susceptible than the Gram negative, and the values of MIC_{90%} was 0.21 mg/mL for the oils of black pepper (*Piper nigrum*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and 26.52 mg/mL for oil Copaiba (*Copaiba officinalis*). For *E. coli* strains, the oil of cinnamon (*Cinnamomum cassia*) was the most effective, with 2.0 mg/mL for MIC 90% while for *P. aeruginosa*, the value was 8.29 mg/mL with clove (*Syzygium aromaticum*). Using MIC values obtained in vitro were selected five oils (cloves-*Syzygium aromaticum*, geranium-*Pelargonium graveolens*, lavender- *Lavandula angustifolia*, palmarosa-*Cymbopogon martini* and tea tree-*Melaleuca alternifolia*) and the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, antibacterial activity was checked by dilution of individual oil and saline water in order to reduce the bacterial count in function of time (Chapter II). Both tests in saline and water, it was found that the sensitivity of bacterial strains to essential oils were close together, but were significantly different compared to control tests. Essential oils have demonstrated the potential inhibitor of the three bacterial strains, and the results were different from those obtained *in vitro*-ágar with Gram negative showing greater susceptibility to *S. aureus*. As a final step of the study, tests were conducted in order to verify the effects of the 5 aforementioned oils directly on the microbiota of human skin, and for this purpose tests were performed with individual applications of the prepared base of grape seed oil, containing individually essential oils at a concentration of 2% in areas of the arm and forearm of 15 volunteers, followed by obtaining samples of the biota of these areas using plates with culture media (MacConkey ágar, Mannitol Salt ágar and Plate Count ágar) by the method of contact (Rodac-Plate) (Chapter III). It was found that preparations have not been able to reduce the bacterial counts of the microbiota of human skin when compared with respective controls. Thus, there was the antibacterial action of the oils tested, but the antibacterial potential varied depending on the tested bacteria and oil, as well as the action of the oils tested directly in water was effective, with significant reduction in function of time, even though this potential inhibitor has not been proven effective when applied directly on the skin.

Keywords: essential oils, antibacterial activity, water, microbiota, minimal inhibitory concentration, difusion assays.

Introdução:

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos remotos como importantes ferramentas nos procedimentos das terapias naturais (MUKHERJEE et al., 2010), objetivando a busca por alívio e cura de doenças pelo uso de ervas e consistindo, possivelmente, uma das primeiras formas de utilização destes produtos. Os seres humanos têm usado por muito tempo as substâncias naturalmente presentes nos seres vivos, sendo as plantas em particular, para fins medicinais. Estas têm desempenhado um papel de liderança no cuidado com a saúde na maioria das culturas e com os avanços na química no início do século 19, as plantas começaram a ser estudadas com maior rigor, para entender os usos potenciais clinicamente úteis (BEUTLER, 2009).

A história do desenvolvimento das civilizações oriental e ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais, tanto na medicina como no controle de pragas e em mecanismos de defesa, com destaque para a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa, sendo que na medicina tradicional chinesa esta prática desenvolveu-se com grandiosidade e eficiência. Nos tempos atuais muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados visando o entendimento de seu mecanismo de ação e isolamento dos princípios ativos (VIEGAS JÚNIOR E BOLZANI, 2006).

Outra explicação para a crescente utilização e demanda dos produtos naturais em todo o mundo deve-se especialmente aos problemas atribuídos aos inúmeros produtos sintéticos sobre a saúde humana e também ao meio ambiente (BANDONI e CZEPAK, 2008).

SILVEIRA et al. (2008) relatam que nas últimas décadas houve aumento significativo do interesse pelas terapias naturais. Estas se expandiram globalmente e sua popularidade não somente foi intensificada nos países em desenvolvimento como também nos países onde a medicina convencional é predominante nos sistemas públicos de saúde (WHO, 2001).

As terapias naturais têm como origem as chamadas medicinas tradicionais, tendo estas sido acrescidas de novas tecnologias e pesquisas, sendo comumente chamadas de terapias complementares ou alternativas, temos como exemplo a acupuntura, aromaterapia, massoterapia, reflexoterapia etc.

A importação de antigos sistemas, como a medicina tradicional chinesa, a ayurvédica e medicinas populares, como as xamânicas ou as ligadas às religiões afro-indígenas, foi um evento histórico que chegou ao Brasil, além de outros países latino-americanos, durante a década de 80. Esse quadro apresentou repercussões na medicina bem como possibilitou a incorporação de outros sistemas como a homeopatia, medicina chinesa, medicina ayurvédica e antroposofia, as quais tiveram aceitação considerável da população não apenas por sua eficiência, mas também por suas características específicas quanto à atenção e escuta em terapêutica individualizada, estando o sujeito doente no centro da atividade terapêutica (LUZ, 2005).

Em meados de 1990 foram implementados na Austrália, especialmente em universidades, programas de educação em Medicinas Tradicionais, Naturopatia e Terapias Naturais, sendo que em 2003 existiam aproximadamente dezessete instituições que oferecem algum tipo de formação neste campo (WHO, 2003).

O crescimento exponencial no uso de terapias naturais no tratamento de várias doenças agudas e crônicas tem ocorrido de forma paralela ao progresso científico e tecnológico da medicina moderna ocidental, despertando assim interesse de usuários, pesquisadores, profissionais e gestores de serviços de saúde (SPADACIO et al., 2010).

As terapias naturais se configuram como opções em potencial para o cuidado à saúde enquanto práticas terapêuticas, sendo evidente a ampliação do uso dessas terapias em alguns casos específicos como, por exemplo, para o câncer (SPADACIO e BARROS, 2008).

Estima-se que aproximadamente 80% da população mundial empregam frequentemente as medicinas indígenas ou tradicionais em suas necessidades primárias de saúde, especialmente àquelas que se utilizam de terapias que envolvem o uso de fitoterápicos (BAGETTA et al., 2010).

No Brasil existem iniciativas do governo para valorização do conhecimento popular e da utilização de produtos naturais pela população em seus cuidados primários de saúde. O Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos é um importante exemplo, sendo que este tem como base os fundamentos da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e tem como princípios orientadores a ampliação das opções terapêuticas e melhoria da atenção à saúde aos usuários do Sistema Único de Saúde – SUS, bem como o uso sustentável da biodiversidade brasileira, a valorização e preservação do conhecimento tradicional das comunidades e povos tradicionais, entre

outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Segundo BARROS e NUNES (2006), as terapias naturais no Brasil são norteadas pelo pensamento de que uma forma de medicina não é oposta ou contrária a outra.

Desta maneira, as plantas com propriedades terapêuticas utilizadas no cuidado de saúde, tradicionalmente constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos (OLIVEIRA et al., 2006).

Óleos essenciais

Dentre os produtos naturais empregados em abordagens terapêuticas, os óleos essenciais (OE), utilizados frequentemente na aromaterapia, são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico (EDRIS, 2007).

Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis e complexos caracterizados por um forte odor sendo sintetizados por plantas aromáticas durante o metabolismo secundário e normalmente extraídos de plantas encontradas em países quentes, como as do mediterrâneo e dos trópicos, onde representam parte importante da farmacopéia tradicional (BAKKALI et al., 2008).

A fragrância das plantas é transportada pela chamada quinta essência ou óleo essencial, e são metabólitos secundários compostos principalmente à base de uma estrutura isoprena, eles são chamados terpenos (COWAN, 1999).

As propriedades farmacológicas atribuídas aos OE são diversas e algumas são preconizadas por apresentarem vantagens importantes quando comparadas a outros medicamentos, como por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações. A volatilidade e o baixo peso molecular de seus componentes possibilitam que eles sejam rapidamente eliminados do organismo através das vias metabólicas (BANDONI e CZEPAK, 2008).

Com o descobrimento e a elucidação das centenas de componentes dos óleos essenciais nas últimas décadas, tem sido possível entender a complexidade e a diversidade que existe neste grupo de produtos naturais, o qual consiste normalmente de mono (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}), fenilpropenos e outros componentes voláteis (FRANZ, 2010). A estrutura química geral dos terpenos é $C_{10}H_{16}$, ocorrem como diterpenos, triterpenos e tetraterpenos (C_{20} , C_{30} e C_{40}), bem como hemiterpenos (C_5) e sesquiterpenos (C_{15}); quando os compostos contêm elementos adicionais, geralmente o

oxigênio, são denominados terpenóides. Terpenóides são sintetizados a partir de unidades de acetato, e como tal eles compartilham suas origens com ácidos graxos. Eles diferem dos ácidos graxos que contêm extensas ramificações e ciclização. Exemplos de terpenóides comuns são o metanol e cânfora (monoterpenos) e farnesol e artemisin (sesquiterpenos) (COWAN, 1999).

Os terpenos, substâncias presentes tanto em plantas como em animais, são descritos como possuidores de uma diversidade considerável de propriedades biológicas incluindo a ação antimicrobiana, fungicida, antiviral, anti-hiperglicêmica, antiinflamatória e atividade antiparasitária (PADUCH et al, 2007).

Os monoterpenos, importantes constituintes dos óleos essenciais, são altamente voláteis, sendo arrastados pelo vapor de água livres de outros componentes, sendo utilizados por suas características organolépticas marcantes (BANDONI e CZEPAK, 2008).

Os óleos essenciais apresentam diferentes propriedades biológicas, como a ação larvicida (RAJKUMAR et al., 2010), atividade antioxidante (WANNES et al., 2010), ação analgésica e anti-inflamatória (MENDES et al., 2010), fungicida (CARMO et al., 2008) e atividade antitumoral (SILVA, 2008).

PEREIRA et al. (2008) afirmam que o uso destes produtos vegetais vem aumentando e conquistando o mercado e a preferência dos consumidores por apresentarem benefícios à saúde, bem como possuem comprovada atividade biológica sobre microrganismos, e por isso também já foram utilizados como conservantes de alimentos ao longo da história da humanidade.

A ação antibacteriana de óleos essenciais tem sido demonstrada através da susceptibilidade de bactérias Gram positivas e negativas, conforme evidenciado pelos baixos valores de concentrações inibitórias mínimas, como o cravo da Índia que apresentou 0,09% v/v frente a bactérias Gram positivas e 0,10% v/v frente a bactérias Gram negativas (BARBOSA et al., 2009). As pesquisas e relatos sobre a ação antimicrobiana de óleos essenciais têm ampliado nos últimos anos, e de maneira geral, estes estudos limitam-se aos ensaios *in vitro*, especialmente sobre um microorganismo ou um único óleo essencial em testes únicos de sensibilidade (HAMMER et al., 1999).

Outro aspecto importante quanto ao uso dos óleos essenciais refere-se à forma de obtenção. Estes podem ser extraídos através de inúmeras técnicas e suas propriedades dependem do tipo de extração. Os métodos mais utilizados são: extração por arraste a

vapor, hidrodestilação, prensagem a frio, extração por solventes orgânicos, extração por alta pressão e extração por CO₂ supercrítico (OKOH et al., 2010).

O processo de arraste a vapor é o processo de extração mais utilizado e consiste em colocar o material vegetal no destilador, que através da passagem do vapor pelo material vegetal extrai os compostos aromáticos voláteis da planta sendo separados quando há passagem destes compostos voláteis pelo sistema de condensação, o óleo é coletado em um recipiente de decantação, onde a água separa-se naturalmente do óleo sendo possível a sua coleta através de uma torneira. O óleo essencial, assim que produzido, é colocado em funil de decantação para que haja uma separação minuciosa da água e posteriormente é envasado em vidro âmbar e mantido em local abrigado de temperaturas elevadas e luminosidade (CASTRO et al., 2005). Como exemplo de rendimento, para a produção do óleo de gerânio utiliza-se entre 500 a 600 Kg de planta fresca para obtenção de 1 Kg do óleo essencial (SILVA, 1998).

Quanto aos frutos cítricos, a extração normalmente é feita pela prensagem a frio do pericarpo, portanto sendo esta uma outra metodologia de produção de óleos essenciais. Vale destacar que o Brasil é considerado um grande produtor e exportador mundial de óleos de lima e de laranja (BIZZO et al., 2009).

As flores, folhas, cascas e rizomas também são matérias-primas para extração de importantes óleos para o comércio, com destaque para os óleos essenciais de rosas, eucalipto, canela e gengibre. Estes óleos apresentam grande aplicação nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentos e são coadjuvantes em medicamentos (BIZZO et al., 2009).

Os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (Figura 1) nestes óleos são também os principais constituintes que conferem suas características organolépticas (BIZZO et al., 2009).

A caracterização química dos componentes dos óleos essenciais é realizada normalmente através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), sendo que as regiões de pico são analisadas e seus constituintes definidos. Na Figura 2 e Tabela 1 é apresentada a cromatografia do óleo essencial de Gerânio (GOMES et al., 2006)

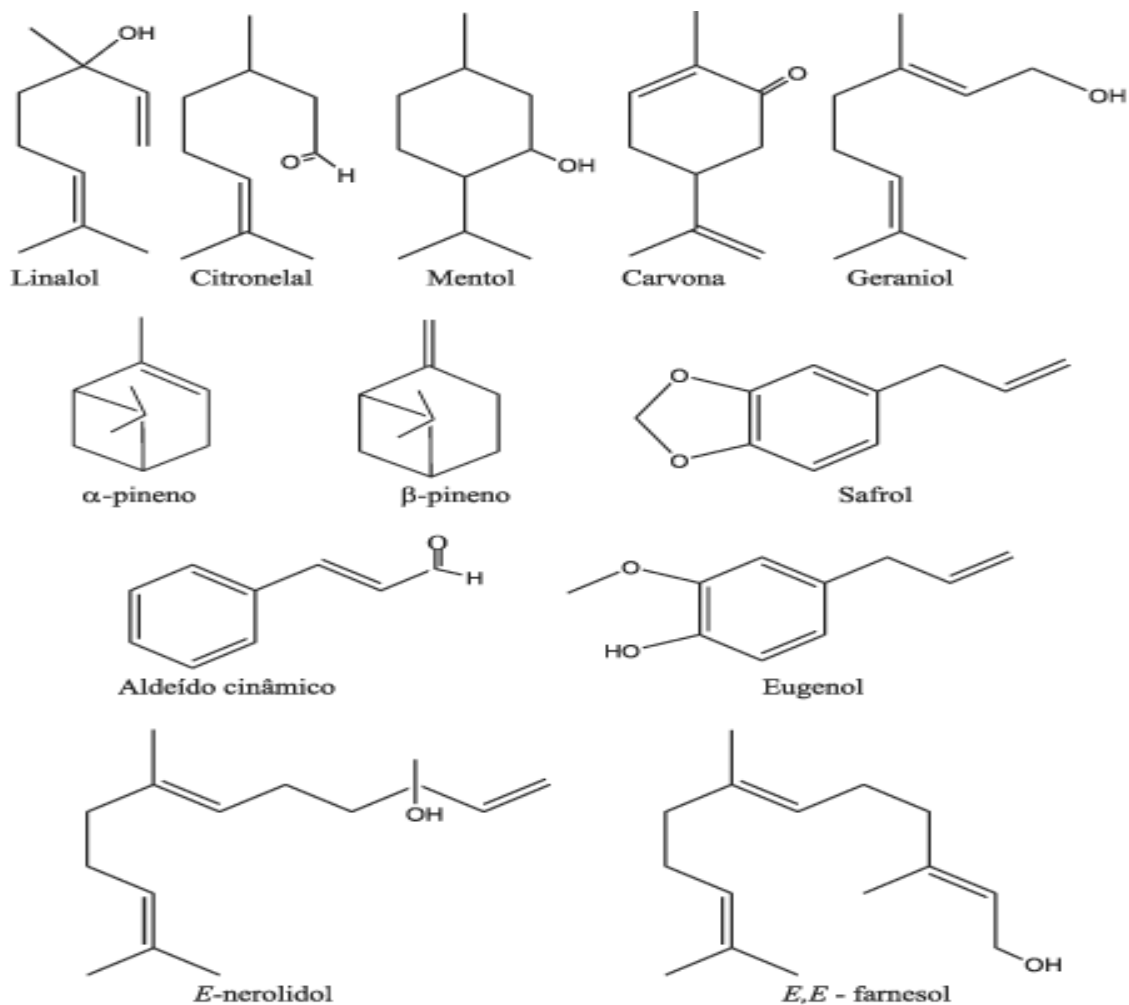


Figura 1. Estruturas Químicas de Monoterpenos, Fenilpropanóides e Sesquiterpenos (SIMAS et al., 2004).

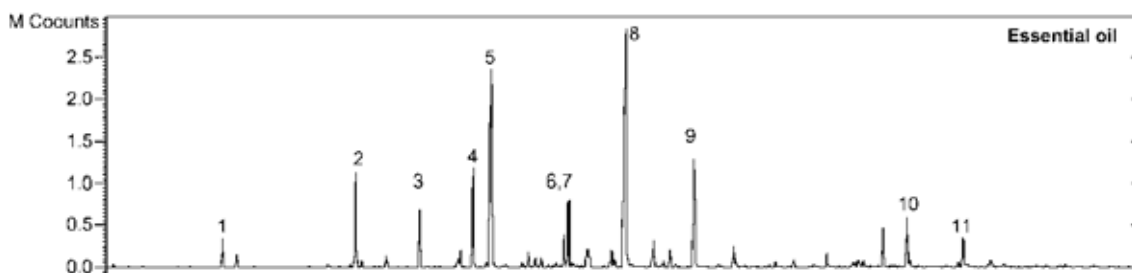


Figura 2. Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massa CG do óleo essencial de Gerânio (GOMES et al., 2006)

Tabela 1. Caracterização Química do óleo essencial de Gerânio e respectivas porcentagens dos componentes caracterizados por cromatografia gasosa.

Componentes	Porcentagem
1 Óxido de rosa	0,5
2 Isomenthona	5,6
3 Linalool	2,7
4 Guaia-6,9-diene	5,9
5 Citronellil	13,2
6 Germacrene-D	2,4
7 Geranil	5,5
8 Citronellol	26,9
9 Geraniol	8,1
10 Geranil tiglato	3,3
11 2-Phenylethyl tiglato	1,8

Fonte: Adaptado de GOMES et al., 2006

HOUGHTON et al. (2007) descreveram que pela análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais não é possível afirmar que o componente majoritário é o que realiza a atividade biológica em estudo. Assim, o efeito pode ser atribuído a um constituinte em menor proporção ou de um sinergismo entre os compostos existentes naquele óleo.

Alguns estudos também reportaram que componentes presentes nos óleos essenciais podem entrar na corrente sanguínea, atravessar a barreira hematoencefálica e chegar ao sistema nervoso central através de várias vias, sendo que a inalação (BAGETTA et al., 2010), a aplicação dérmica (BROOKER et al.,1997), injeções subcutâneas ou por vias intraperitoneais e administração oral são algumas vias mais comuns (ORAFIDIYA et al.,2005).

Aromaterapia

Aromaterapia é a terapia que utiliza de produtos vegetais, especialmente os óleos essenciais, para a promoção e manutenção da saúde. Escritas antigas evidenciaram a utilização de substâncias aromáticas na Medicina Chinesa há 4500 anos, bem como em rituais espirituais e medicinais no antigo Egito e durante a Idade Média visando prevenir infecções e pragas (STEVENSEN, 1998).

O termo aromaterapia foi concebido em 1927 pelo químico francês René-Maurice Gattefossé, que por ocasião de uma grave queimadura em sua mão a mergulhou acidentalmente em óleo essencial de lavanda e observou melhora substancial na recuperação do ferimento. Este episódio foi um estímulo considerável para a continuidade de seus estudos sobre as propriedades terapêuticas dos diferentes óleos essenciais (STEVENSEN, 1998). As formas de uso dos óleos essenciais na Aromaterapia são diversas e algumas destas são (SILVA, 1998) a aromatização de ambiente, banhos aromáticos e escalda-pés, massagem aromática, travesseiro aromático, bochechos, gargarejos e ingesta.

De acordo com JIMBO et al. (2009), a aromaterapia é um tratamento tradicional que se utiliza dos óleos essenciais de acordo com seus efeitos em diversas áreas, sendo que a sua ação se inicia com uma molécula aromática combinada com um receptor para aroma, a molécula passa pela cavidade nasal e se adere ao epitélio olfatório que envia esta informação através de seu nervo diretamente para o hipocampo, sistema límbico e corpo amigdalóide que conseqüentemente disparará estímulos no controle do sistema nervoso autônomo e no controle secretório interno, alterando uma série de reações vitais.

SCHIMITT et al. (2010) mencionam que os óleos essenciais são amplamente utilizados associados com óleos para massagens na aromaterapia e reportaram que houve maior permeabilidade dos componentes através da pele humana quando utilizados no seu estado natural como óleo essencial bruto do que quando utilizados em forma de isolados, sugerindo desta forma uma interação cooperativa entre os componentes dos óleos no que se diz respeito a sua permeabilidade.

Referências:

BAGETTA, G.; MORRONE, L. A.; ROMBOLÀ, L.; AMANTEA, D.; RUSSO, R.; BERLIOCCI, L.; SAKURADA, S.; SAKURADA, T.; ROTIROTI, D.; CORASANITI, M. T. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fitoterapia*, p. 1-9, 2010.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitória: Edufes, 2008. 624p.

BARBOSA, L. N. ; RALL, V. L. M.; FERNANDES, A. A. H.; USHIMARU, P. I.; PROBSTI, S.; FERNANDES JÚNIOR, A. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 6, n. 6, p. 725-28, 2009.

BARROS, N. F.; NUNES, E. D. Medicina alternativa e complementar no Brasil: um conceito e diferentes significados. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 2023-39, 2006.

BEUTLER, J. A. Natural products as a foundation for drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol.*, v. 46, n. 9, p. 1- 31, 2009.

BIZZO, H.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BRASIL. Ministério de Estado da Saúde. Portaria n. 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a política nacional de práticas integrativas e complementares (PNPIC) no sistema Único de Saúde. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2010.

BROOKER, D. J.; SNAPE, M.; JOHNSON, E.; WARD, D.; PAYNE, M. Single case evaluation of the effects of aromatherapy and massage on disturbed behaviour in severe dementia. *Brazilian Journal of Clinical Psychology*, v. 236, p. 187-96, 1997.

CARMO, E. S.; LIMA, E.O.; SOUZA, E. L. The potential of *origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, p. 362-367, 2008.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, n. 4, p. 564- 582, 1999.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 2007.

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. *Flavour Fragrance Journal*, v. 25, p. 112-113, 2010.

GOMES, P. B.; MATA, V. G.; RODRIGUES, A. E. Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 41, p. 50-60, 2007.

HAMMER, K. A; CARSON, C. F; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, n. 6, p. 985-90, 1999.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. -J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 391-400, 2007.

JIMBO, D.; KIMURA, Y.; TANIGUCHI, M.; INOUE, M.; URAKAMI, K. Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease. *Journal Compilation Japanese Psychogeriatric Society*, n. 9, p. 173-179, 2009.

LUZ, M. T. Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no fim do século XX. Physis, Rio de Janeiro, p.145-176, 2005.

MUKHERJEE, P. K.; VENKATESH, M.; GANTAIT, A. Ayurveda in modern medicine: development and modification of bioactivity. In: MANDER,L.;LIU,HUNG-WEN. Comprehensive natural products II. Hardbound:Elsevier, 2010. chap. 3.14, p. 479-507.

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

ORAFIDIYA, L. O.; AGBANI, E. O.; IWALEWA, E. O.; ADELUSOLA, K. A.; OYEDAPO, O. O. Studies on the acute and sub-chronic toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. leaf. Phytomedicine, v. 11, p. 71-76, 2004.

PADUCH, R.; SZERSZEŃ, M. K.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, v. 55, n. 5, Oct. 2007.

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

SCHIMITT, S.; SCHAEFER, U.; SPORER, F.; REICHLING, J. Comparative study on the in vitro human skin permeation of monoterpenes and phenylpropanoids applied in rose oil and in form of neat single compounds. Pharmazie, v. 65, n. 2, p. 102-105, 2010.

SILVA, A. R. Tudo sobre aromaterapia. São Paulo: Roca, 1998. 624 p.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amazonica*, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRAM, A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 4, n. 18, p. 618-626, 2008.

SPADACIO, C.; BARROS, N. F. Uso de medicinas alternativas e complementares por pacientes com câncer: revisão sistemática. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, p.7-13, 2008.

SPADACIO,C;CASTELLANOS,M.E.P;BARROS,N.F;ALEGRE,S.M;TOVEY,P;BROOM,A. Medicinas Alternativas e Complementares: uma metassíntese. *Caderno de Saúde Pública*:Rio de Janeiro,v. 26,n.1,p.7-13,2010.

STEVENSEN, C. J. Aromatherapy in dermatology. *Clinics in Dermatology*, v. 16, p. 689-694, 1998.

VIEGAS JÚNIOR,C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WANNES, W. A.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, M. B.; OUCHIKH, O.; HAMDAROU, G.; KCHOUK, M. E.; MARZOU, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle(*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 1362-1370, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. National policy on traditional medicine and complementary/alternative medicine: general guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva, 2000. 24 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working group meeting on quality of academic education in traditional medicine: legal status of traditional medicine and complementary/alternative medicine. Geneva, 2003. 71 p.

Capítulo I

*Escrito segundo normas da revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Capítulo I

Running title: Ação antimicrobiana de óleos essenciais

Ação antimicrobiana de óleos essenciais de uso em terapias naturais

Bruna Fernanda Murbach Teles Machado^{1*}, Lidiane Nunes Barbosa¹, Isabella da Silva Probst¹, Ary Fernandes Junior¹

^{1*}Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, Brasil. Tel. 55 14 38116058

Autor correspondente: e-mail: brunatura@ibb.unesp.br

RESUMO

Os produtos naturais têm sido estudados para entendimento de suas propriedades biológicas, especialmente no tratamento das doenças que acometem o homem. Os estudos sobre a ação antimicrobiana apresentaram um aumento significativo devido à constante busca por princípios ativos com potencial de uso na terapêutica das doenças infecciosas. Por outro lado, a aromaterapia, uma terapia natural com grande destaque atualmente, se utiliza de inúmeros óleos essenciais, sendo que muitos com um potencial antimicrobiano comprovado. Assim, objetivou-se estudar a ação antimicrobiana de 27 óleos essenciais de uso em aromaterapia, sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* (n=10), *Escherichia coli* (n=9), e *Pseudomonas aeruginosa* (n=9), espécimes clínicos humanos, utilizando a metodologia dos discos (difusão) e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (diluição) em Mueller Hinton Ágar. Verificou-se que dentre os óleos testados, utilizando os valores de CIM para 90% das linhagens testadas, as linhagens de *S. aureus* foram mais susceptíveis que as Gram negativas, sendo que os valores de CIM90% foi de 0,21mg/mL para os óleos de pimenta negra (*Piper nigrum*) e tea tree (*Melaleuca alternifolia*) e 26,52mg/mL para o óleo de copaíba (*Copaíba officinalis*). Para *E. coli*, o óleo de canela (*Cinnamomum cassia*) foi o mais efetivo, com 2,0 mg/mL para CIM90% enquanto para *P. aeruginosa* o valor de CIM90% foi de 8,29 mg/mL com o óleo de cravo da índia (*Syzygium aromaticum*). Assim, o estudo confirma a maior susceptibilidade de linhagens bacterianas Gram positivas em relação às Gram negativas, embora exista uma variação significativa da ação antibacteriana dos óleos testados frente às espécies de bactérias estudadas.

Palavras-chaves: atividade antibacteriana; aromaterapia; óleos essenciais; bactérias; Concentração Inibitória Mínima.

Running title: Essential oils antimicrobial activity

Antimicrobial activity of essential oils for use in natural therapies

Bruna Fernanda Murbach Teles Machado^{1*}, Lidiane Nunes Barbosa¹, Isabella da Silva Probst¹, Ary Fernandes Junior¹

^{1*}Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, Brasil. Tel. 55 14 38116058

Corresponding author: e-mail: brunatura@ibb.unesp.br

ABSTRACT

The natural products have been studied aiming understand the biological properties with potential for human diseases treatment. Studies on the antimicrobial activity had a significant increase in scientific publications, as there is constant search for active compounds with potential use in therapy of infectious diseases. Moreover, aromatherapy, a natural therapy with great emphasis today, uses many essential oils, and many with proven antimicrobial activity. Thus, the study aimed to investigate the antimicrobial activity of 27 essential oils for use in procedures in aromatherapy, on *Staphylococcus aureus* (n = 10), *Escherichia coli* (n = 9) and *Pseudomonas aeruginosa* (n = 9) isolated from human clinical cases, using the methodology of the disc (diffusion) and inhibitory concentration minimum (CIM) (dilution) on Mueller Hinton Ágar. It was found that among the tested oils, especially using the MIC values for 90% of tested strains to the strains of *S. aureus* were more susceptible than the Gram negative, and the values of MIC_{90%} was 0.21 mg/mL for black pepper oil (*Piper nigrum*) and Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) and 26.52 mg/mL for oil Copaiba (*Copaiba officinalis*). *E. coli*, oil of cinnamon (*Cinnamomum cassia*) was the most effective, with 2.0 mg/mL for MIC 90% while for *P. aeruginosa* the MIC 90% value was 8.29 mg/mL with the oil of clove (*Syzigium aromaticum*). Thus, the study confirms the higher susceptibility of Gram positive bacterial strains in relation to Gram negative, although there is a significant variation in the antibacterial action of the oils tested against the bacteria strains studied.

Key words: antibacterial, aromatherapy, essential oils, bacteria, minimum inhibitory concentration.

INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo têm sido registrados inúmeros procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem ainda obstáculos básicos para sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares até a realização de exames e obtenção dos medicamentos necessários. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização especialmente pelas populações dos países em desenvolvimento (Veiga Junior & Pinto 2005).

Quanto às plantas aromáticas, bem como os respectivos óleos essenciais, estas são utilizadas desde o início da história da humanidade para saborizar comidas e bebidas; empiricamente usadas para disfarçar odores desagradáveis; atrair outros indivíduos e controlar problemas sanitários, contribuindo para o bem-estar dos seres humanos e animais, demonstrando assim uma antiga tradição sócio-cultural e sócio-econômica da utilização destes produtos (Franz 2010).

Os óleos essenciais, normalmente líquidos, voláteis, lípidos e raramente coloridos, são compostos complexos voláteis, caracterizados pelo forte odor e sintetizados pelas plantas aromáticas como metabólitos secundários, que atuam na proteção das mesmas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas. Eles podem ser sintetizados em várias partes da planta como por exemplo botões florais, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutos, raízes, madeira ou cascas, sendo armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Bakkali et al. 2008). Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas, dos metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis e apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes das interações bioquímicas, fisiológicas, ecológicas e evolutivas, fazendo com que estes fenômenos representem uma interface química importante entre as plantas e o ambiente circundante (Gobbo-Neto & Lopes 2007).

Quanto à produção industrial, os óleos essenciais são obtidos principalmente por destilação a vapor; encontra-se em ascensão nas indústrias alimentícias e farmacêuticas a aplicação de fluídos pressurizados supercríticos, em especial dióxido de carbono (Mazutti et al. 2006).

O processo de arraste a vapor é o processo de extração mais utilizado e consiste em colocar o material vegetal no destilador, que através da passagem do vapor pelo material vegetal extrai os compostos aromáticos voláteis da planta que passa através do sistema de condensação e é coletado em um recipiente de decantação, onde a água separa-se naturalmente do óleo assim formado; sua retirada do recipiente é feita através de uma torneira. O óleo essencial assim que obtido é colocado em funil de decantação para que haja uma separação minuciosa da água e posteriormente é envasado em vidro âmbar e mantido em local abrigado de temperaturas elevadas e luminosidade (Castro et al. 2005).

A extração com fluido supercrítico permite uma modificação contínua do poder de dissolução e seletividade, alterando a densidade do solvente. O fluido tem a densidade de um líquido e solubilizam sólidos como um solvente líquido, mas tem um poder de difusão semelhante a um gás, permeando materiais sólidos com muita facilidade, o poder de solubilização aumenta com a densidade do fluido; altas densidades de um fluido supercrítico são possíveis em altas pressões e permite dissolver grandes quantidades de compostos orgânicos. Os compostos dissolvidos podem ser recuperados a partir do líquido pela redução da sua densidade, diminuindo a pressão ou aumentando a temperatura. Este processo de separação em baixas temperaturas pode impedir a degradação dos compostos químicos durante a extração (Xiao et al. 2007).

Paracelso introduziu o termo óleo essencial (O.E.) durante a Renascença e este designava “a alma da planta”, a quintessência para a cura (Silva 1998). A Aromaterapia é a terapia que faz uso dos óleos essenciais para a promoção e manutenção da saúde e parece agir através do sistema límbico, especialmente sobre a amígdala e o hipocampo (Cavanagh & Wilkinson 2002).

O termo aromaterapia foi concebido em 1927 pelo químico francês René-Maurice Gattefossé, que por ocasião de uma grave queimadura em sua mão mergulhou acidentalmente em óleo essencial de lavanda e observou melhora substancial na recuperação do ferimento. Este episódio foi um estímulo considerável para a continuidade de seus estudos sobre as propriedades terapêuticas dos diferentes óleos essenciais (Stevensen 1998).

Gattefossé aplicou sua experiência em hospitais militares durante a Primeira Guerra Mundial quando utilizou óleos essenciais na prevenção de gangrenas e para curar queimaduras, promovendo a reabilitação dos soldados. Jean Valnet, fisiologista,

serviu com as tropas francesas durante a Segunda Guerra Mundial e também aplicou de forma significativa os óleos essenciais, curando infecções e diminuindo também o uso massivo de penicilina (Stevensen 1998). Além da atividade antimicrobiana observada por Gattefossé e Valnet, os óleos essenciais apresentam diversas outras propriedades biológicas, como por exemplo, ação larvicida (Rajkumar et al. 2010), atividade antioxidante (Wannes et al. 2010), ação analgésica e anti-inflamatória (Mendes et al. 2010), fungicida (Carmo et al. 2008) e atividade antitumoral (Silva 2008).

A atividade antimicrobiana dos OEs *in vitro* tem sido amplamente estudada sobre uma série de microorganismos (López et al. 2005). Apesar disto, o surgimento de bactérias multi-resistentes representa um desafio no tratamento de infecções, sendo assim notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para uso no combate a esses microrganismos (Pereira et al. 2004, Hemaiswarya et al 2008). Historicamente, a maioria dos antibióticos provém de um pequeno conjunto de estruturas moleculares cujas vidas funcionais foram estendidos por gerações de reorganizações e arranjos sintéticos (Fischbach & Walsh 2009). Além disto, a propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais é considerada de grande interesse para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas desde que o uso de aditivos naturais ganhou importância como tendência na substituição dos conservantes sintéticos artificiais (Okoh et al. 2010).

Inúmeros relatos foram feitos sobre os mecanismos de ação antimicrobiana dos óleos, sendo que alguns casos foram parcialmente elucidados como, por exemplo, para o óleo essencial de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) que causa lise e perda da integridade da membrana, devido à saída de íons e inibição da respiração celular (Cox et al. 2000, Carson et al. 2006). Como um típico composto lipofílico, os óleos essenciais atravessam a parede celular e a membrana citoplasmática, a atividade citotóxica parece estar ligada ao rompimento das estruturas das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, devido ao seu mecanismo de ação que atinge vários alvos ao mesmo tempo, nenhuma resistência ou adaptação particular aos óleos essenciais tem sido descrita (Bakkali et al. 2008). Por isso, objetivamos verificar *in vitro* a ação antimicrobiana de óleos essenciais de uso em terapias naturais sobre linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de materiais clínicos humanos bem como sobre linhagens padrões ATCC (American Type Culture Collection), utilizando a metodologia da difusão a partir de discos e diluição em

Ágar Mueller Hinton para determinação dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e apresentar caracterização química dos óleos essenciais através da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

MATERIAIS E MÉTODOS

Óleos essenciais. Os óleos essenciais, sendo 27 no total, foram selecionados para o estudo em função do seu uso freqüente na aromaterapia. Para tanto, foram obtidas amostras dos óleos essenciais de Alecrim (*Rosmarinus officinallis*), Bergamota (*Citrus aurantium bergamia*), Canela (*Cinnamomum cassia*), Cardamomo (*Eletaria cardamomum*), Cedro (*Cedrus atlantica*), Cipreste (*Cupressus sempervirens*), Copaíba (*Copaifera officinalis*), Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*), Eucalipto (*Eucalipto globulus*), Erva Doce (*Foeniculum vulgare*), Gengibre (*Zingiber officinalis*), Gerânio (*Perlagonium graveolens*), Hortelã do Brasil (*Mentha arvensis*), Laranja (*Citrus aurantium dulcis*), Lavanda (*Lavandula officinalis*), Lemongrass (*Cymbopogon schoenanthus*), Limão Tahiti (*Citrus limonum*), Manjerona (*Origanum majorana*), Noz Moscada (*Myristiva fragans*), Palmarosa (*Cymbopogon martini*), Patchouli (*Pogostemon patchouli*), Pimenta Negra (*Piper nigrum*), Pinho (*Pinus silvestris*), Sálvia Esclaréia (*Salvia sclarea*), Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*), Vetiver (*Vetiveria zizanioides*), Ylang ylang (*Cananga odorata*) diretamente da empresa *By Samia Aromaterapia* (São Paulo-SP, Brasil) em frascos de vidro âmbar com capacidade para 10 mL na forma comercializada pela referida empresa e mantidos em temperatura ambiente. Considerando a necessidade da caracterização química dos óleos foram obtidos junto à empresa fornecedora das amostras os dados sobre análise cromatográfica por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Para cada óleo estudado foram determinados os valores de densidade (mg/mL) utilizando metodologia adaptada de Fonseca e Librand (2008), em tubos tipo *ependorfs*, sendo estes pesados (P_1) em balança analítica; adição de 1 mL (V) do óleo sendo realizada nova pesagem (P_2). A densidade (D) foi calculada utilizando fórmula a seguir.

$$D = \frac{P_2 - P_1}{V} = \frac{mg}{mL}$$

Linhagens Bacterianas. Foram utilizadas linhagens bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de espécimes clínicos humanos, além de uma linhagem bacteriana padrão American Type Culture Collection (ATCC) para cada espécie de *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853), estocadas, em Brain Heart Infusion (BHI) contendo glicerol, em -70°C no Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu-SP. Previamente a utilização nos ensaios, as linhagens foram semeadas em placas de ágar Sangue para verificação de viabilidade e pureza, e semeadas em ágar nutriente pra uso nas várias etapas do estudo. Por ocasião da realização dos ensaios de sensibilidade, a linhagens eram inoculadas em BHI e incubadas a $35^{\circ}\text{C}/18-24$ horas seguido de padronização das suspensões bacterianas em solução salina (0.85%) estéril utilizando a escala 0,5 de McFarland.

Testes de sensibilidade pela metodologia da difusão a partir de discos. Os ensaios de sensibilidade utilizando o princípio da difusão em ágar foram realizados com algumas modificações segundo preconizado por CLSI (2005).

A suspensão bacteriana, conforme descrita em 3.2, para linhagem padrão ATCC de cada espécie bacteriana, na concentração equivalente a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), foi inoculada com auxílio de *swabs* estéreis, homogeneamente, em placas de petri contendo Mueller Hinton Ágar (MHA) com adição de 0,5% de Tween 80. Volumes de $15\mu\text{L}$ de cada óleo essencial foram colocados em discos de papel de filtro estéreis e na sequência foram distribuídos na superfície das placas de MHA semeadas com as respectivas bactérias e incubadas a $36^{\circ}\text{C}/24$ horas. Após o período de incubação, os halos de inibição que se formaram foram medidos em milímetros (mm). Os ensaios foram realizados em duplicata e os controles incluíram discos de antibióticos cloranfenicol e tetraciclina, sendo ambas drogas na concentração de 30 mg, da marca Laborclin. Estes ensaios foram realizados em triplicatas. Vale esclarecer que nesta etapa inicial do estudo foi testado um total de 23 óleos, pois alguns óleos ainda não haviam sido obtidos, sendo eles os óleos ainda faltantes o Eucalipto, Lemongrass, Pinho e Ylang Ylang.

Testes de sensibilidade pela metodologia de diluição em ágar e determinação de CIM. Os testes de sensibilidade para determinação da CIM dos óleos essenciais foram realizados segundo a metodologia da diluição em ágar (CLSI, 2005), sendo os óleos

essenciais diluídos em MHA mais Tween 80 a 0,5%, que após semeadura das linhagens e incubação foram realizadas leituras dos valores de CIM para cada linhagem bacteriana testada. O MHA foi esterilizado adicionado de Tween 80 e mantido na temperatura de aproximadamente 45°C, quando foram feitas as misturas em tubos estéreis dos volumes dos óleos essenciais e o meio de MHA fundido para obtenção das concentrações nas placas de Petri equivalentes a 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 %v/v, totalizando um volume de 20 mL em cada placa (meio de cultura mais volume de óleo essencial).

A inoculação das 32 linhagens, 9 linhagens de *E. coli*, 10 *S. aureus*, 10 *P. aeruginosa*, além de uma padrão ATCC de cada espécie, foi feita a partir das suspensões bacterianas padronizadas na escala 0,5 de McFarland, nas quais foram feitas diluições 1:20 em BHI visando obter concentração bacteriana ao redor de 10^5 a 10^6 UFC/mL de cada linhagem. Após colocação dos inóculos na base do multiinoculador de Sterr (Fig.1) procedeu-se a inoculação das linhagens nas respectivas placas contendo os óleos essenciais, tomando-se o cuidado para não haver mistura das linhagens na placa, seguido da incubação a 35°C/18-24 horas. A leitura dos resultados foi feita para verificação de crescimento bacteriano através da formação de colônias das respectivas linhagens e anotação dos valores de CIM para cada linhagem. Após anotação dos resultados foram feitas as devidas transformações dos valores em %v/v para mg/mL utilizando dados referentes a densidade de cada óleo, seguido do cálculo das respectivas CIM 90% frente as linhagens bacterianas testadas.

Análise estatística. Para os resultados obtidos através da metodologia de difusão em ágar obtivemos as médias de formação de halos e utilizamos o teste de variância (ANOVA), para os testes de sensibilidade pela metodologia de difusão em ágar utilizamos para confrontar três ou mais tratamentos independentes o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para análise significativa ($p \leq 0,001$), aplicamos teste de comparações múltiplas entre os tratamentos, o teste de Student-Newman-Keuls.

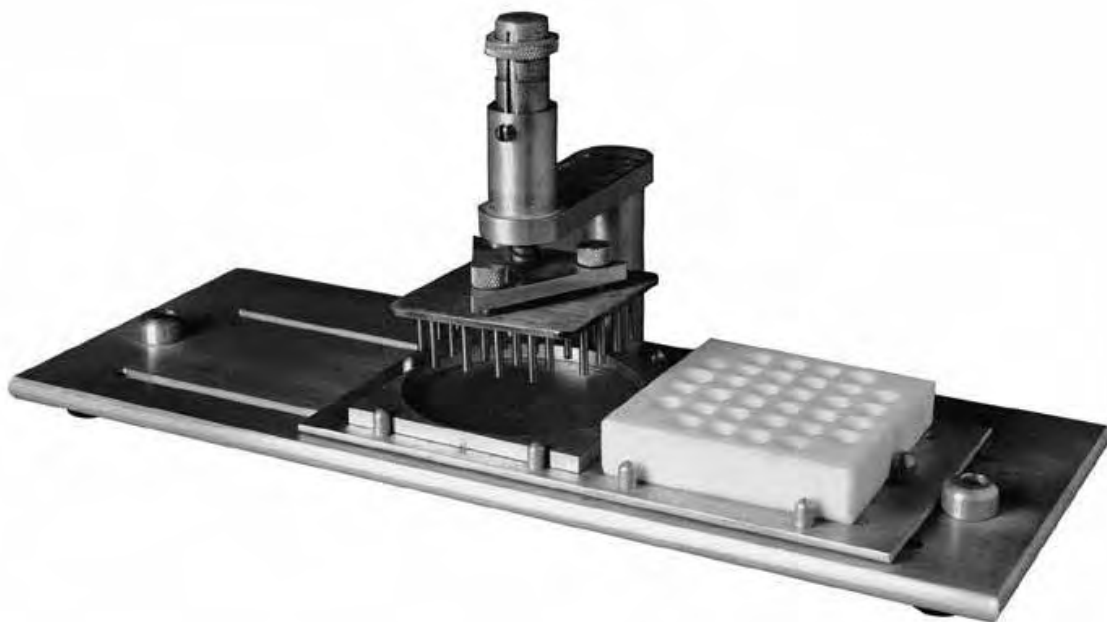


Fig. 1. Multiinoculador de Sterr

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As investigações sobre a atividade antimicrobiana, o modo de ação e usos potenciais dos óleos voláteis de plantas ganharam destaque nas últimas décadas paralelamente aos avanços nas abordagens tradicionais sobre a proteção da saúde dos seres humanos, animais bem como na proteção de alimentos contra a presença de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Assim, tem sido observado numa escala global inúmeras investigações sobre atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente a diferentes microrganismos (Dorman e Deans 2000). Desta forma os resultados a seguir tem sua importância por relacionar informações nesta linha de pesquisa.

Os resultados sobre a densidade (mg/mL) bem como os compostos químicos e respectivos percentuais de participação na composição total dos dos óleos essenciais, são apresentados na Tabela I. Destacamos que a caracterização química dos óleos estudados foi obtida junto a empresa By Samia Aromaterapia, fornecedora das amostras dos óleos essenciais para o estudo. Verifica-se de forma geral que todos os óleos estudados apresentaram massa específica acima de 800 mg/mL, sendo que o óleo de laranja, apresentou o menor valor para densidade (820 mg/mL) enquanto que patchouli (1009 mg/mL), canela (1008 mg/mL) e o cravo (988mg/mL) apresentaram os maiores valores de densidade. Embora a caracterização química dos óleos tenham uma

importância na realização dos estudos desta natureza, segundo alguns autores não é possível afirmar que o componente majoritário é o responsável pela atividade biológica em estudo, assim o efeito pode ser atribuído a um constituinte em menor proporção ou de um sinergismo entre os compostos existentes no óleo (Cowan 1999, Houghton et al. 2007, Pupo et al. 2007, Hemaiswarya et al. 2008). De forma geral os óleos essenciais mostraram uma diversidade quanto a sua caracterização química, porém estas em concordância com a literatura em questão.

Segundo Klančnik et al. (2010), a metodologia dos discos tem como importância maior em fornecer dados iniciais da ação antimicrobiana de produtos naturais, pela facilidade e rapidez de execução. Porém, considera-se fundamental a continuidade dos estudos para obtenção de valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), que foi realizado na segunda parte deste estudo. Os resultados obtidos com a metodologia de difusão em ágar estão apresentados na Tabela II. Desta forma, pela metodologia da difusão em ágar (discos) verificou-se que dos 23 óleos testados nesta etapa da pesquisa, apenas o óleo essencial de Copaíba não apresentou atividade antibacteriana para nenhuma das três cepas testadas.

A linhagem ATCC 25923 de *S. aureus* foi a que apresentou maior índice de susceptibilidade aos diferentes óleos essenciais, tendo apresentado halo de inibição para um total de 22 óleos, ou seja, a 95% dos óleos testados, sendo que o óleo de cravo apresentou o maior halo de inibição com um diâmetro médio de 18,36 mm. Em relação a padrão ATCC 25922 de *E. coli*, verifica-se que esta apresentou halo de inibição frente a 12, ou seja, para 52% dos óleos essenciais testados, sendo que o óleo que apresentou o maior halo de inibição foi o de Tea Tree com um valor de 16,5 mm.

Por outro lado, a linhagem ATCC 27853 de *P. aeruginosa*, se mostrou sensível pelo teste do disco frente a 11, ou seja, para 48% dos óleos essenciais testados, sendo que novamente o maior halo de inibição obtido foi de 13,8 mm para o óleo de Tea Tree.

De acordo com Carson e Riley (1995) o terpinen-4-ol, composto majoritário do óleo de tea tree, apresenta atividade antibacteriana sobre linhagens de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, que também foram as linhagens testadas utilizando a metodologia da difusão.

TABELA I

Densidade e Componentes químicos dos óleos essenciais obtidos junto à empresa fornecedora dos óleos essenciais testados (By Samia Aromaterapia) (n/d- informações não obtidas)

Óleo essencial	Densidade (mg/mL)	Nome dos Compostos (%)
Alecrim (<i>Rosmarinus officinallis</i>)	885	1,8 cineol (31,57); cânfora (20,42); α -pineno (15,78); canfeno (4,93); limoneno (3,76); geraniol (2,43); mirceno (2,02); linalol (1,70); para-cimeno (1,66); γ -terpineno (1,14); α -terpinoleno (0,99); acetato de bornilo (0,41); borneol (0,15)
Bergamota (<i>Citrus aurantium bergamia</i>)	871	limoneno (35,24); acetato de linalina (30,40); linalol (18,45); β -pineno (5,42); γ -terpineno (3,74); sabineno (0,92); α -pineno (0,89); mirceno (0,81); para-cimeno (0,45)
Canela (<i>Cinnamomum cassia</i>)	1008	eugenol (72,13); acetato de eugenila (3,87); β -cariofileno (3,48); benzoato de benzila (3,24); linalol (1,23); para-cimeno (0,76); α -pineno (0,63); α -humuleno (0,61); α -felandreno (0,49); 1,8 cineol (0,27); limoneno (0,22); canfeno (0,21); β -pineno (0,21)
Cardamomo (<i>Elettaria cardamomum</i>)	869	n/d
Cedro (<i>Cedrus atlantica</i>)	891	widreno (27,75); α -cedrol (22,14); α -cedreno (19,84); α -muuroleno (4,55); widrol (3,79)
Cipreste (<i>Cupressus sempervirens</i>)	840	α -pineno (52,26); δ -3-careno; α -terpinoleno (2,65); acetato de α -terpinila (2,63); limoneno (2,60); mirceno (2,40); terpinen-4-ol (1,40); sabineno (1,24); β -pineno (1,14); α -tujeno (0,96); α -fencheno (0,81); γ -terpineno (0,79); p-cimeno (0,70); acetato de geranila (0,41); α -terpineno (0,35); 1,8 cineol (0,34); canfeno (0,28)
Copaíba (<i>Copaifera officinalis</i>)	884	β -cariofileno (44,47); β -bisaboleno (8,0); germacreno b (8,0); α -copaeno (7,98); germacreno d (5,95); α -humuleno (5,40); δ -cadineno (4,57)
Cravo da Índia (<i>Syzygium aromaticum</i>)	988	eugenol (83,63); ceta-cariofileno (12,39); alfa-humuleno (3,05); eugenol acetato (0,93)
Eucalipto (<i>Eucalypto globulus</i>)	883	1,8 cineol (80,17); α -pineno (11,25); diacetona álcool (4,32); p-cimeno (2,28); α -terpineol (0,85); terpinen-4-ol (0,60); β -pineno (0,53)
Erva Doce (<i>Foeniculum vulgare</i>)	919	trans-anetol (95,66); linalol (2,91); estragol (0,39); α -pineno (0,13)
Gengibre (<i>Zingiber officinalis</i>)	850	α -zingibereno (22,85); curcumeno (18,96); β -sesquifelandreno (13,12); β -bisaboleno (11,58); α -farneseno (4,28); canfeno (1,77); β -felandreno (1,58); 1,8 cineol (1,35); α -pineno (0,43); trans- β -farneseno (0,30); mirceno (0,20)
Gerânio (<i>Perlagonium graveolens</i>)	848	citronelol (31,58); geraniol (25,47); fermiato de citronelita (12,74); fermiato de geranila (6,71); linalol (6,33); isomenthone (4,35); rose oxide (0,89); acetato de citronelita (0,48)
Hortelã do Brasil (<i>Mentha arvensis</i>)	849	mentol (54,48); mentona (19,12); pulegona (5,57); isopulegol (2,02)

Óleo essencial	Densidade (mg/mL)	Nome dos Compostos (%)
Laranja (<i>Citrus aurantium dulcis</i>)	820	limoneno (96,25); mirceno (1,81); linalol (0,49); α -pineno (0,49); sabineno (0,32); β -felandreno (0,27)
Lavanda (<i>Lavandula officinalis</i>)	853	1,8 cineol (45,97); p-cimeno (4,19); 1-terpinen-4-ol (2,30); alfa-pineno (1,48); limoneno (1,46); gama-terpineno (1,17); terpinoleno (1,04)
Lemongrass (<i>Cymbopogon schoenanthus</i>)	858	geranial (48,57); neral (32,86); acetato de geranila (3,98); β -cariofileno (1,59); linalol (1,23); canfeno (1,19); óxido de cariofileno (0,67); eugenol (0,48); limoneno (0,23); α -pineno (0,20); trans- β -ocimeno (0,12)
Limão Tahiti (<i>Citrus limonum</i>)	840	limoneno (62,34); γ -terpineno (11,96); β -pineno (10,23); β -bisaboleno (2,68); α -pineno (1,97); geraniol (1,84); mirceno (1,49); para-cimeno (1,18); neral (1,04); trans- α -bergamoteno (1,02); α -tujeno (0,50)
Manjerona (<i>Origanum majorana</i>)	841	1,8 cineol (48,05); linalol (22,69); limoneno (8,10); α -pineno (4,42); β -pineno (4,05); acetato de isobornilo (2,82); para-cimeno (2,21); estragol (1,02); γ -terpineno (0,96); canfeno (0,74); wiridiflorol (0,73); mirceno (0,51); borneol (0,49); óxido trans-linalol (0,24); óxido de cis-linalol (0,21)
Noz Moscada (<i>Myristiva fragans</i>)	889	α -pineno (18,35); miristicin (17,65); β -pineno (12,29); sabineno (10,15); terpinen-4-ol (8,21); γ -terpineno (4,18); limoneno (3,63); para-cimeno (3,15); α -terpinoleno (2,91); safrol (2,68); 1,8 cineol (2,16); terpinoleno (1,84); metil eugenol (1,59); α -terpineol (1,52); δ -3-careno (1,41); elemicin (0,74); eugenol (0,53)
Palmarosa (<i>Cymbopogon martini</i>)	874	geraniol (57,49); acetato de geranila (13,56); linalol (1,71); beta-cariofileno (1,07); ocimeno (0,27)
Patchouli (<i>Pogostemon patchouli</i>)	1009	patchoulol (25,21); δ -guaieeno (11,49); α -gurjuneno (11,26); seicheleno (9,61); α -guaieeno (9,56); álcool benzílico (6,73); vidreno (3,12); aromadendreno (2,81); α -cedrol (2,63); β -patchouleno (1,57)
Pimenta Negra (<i>Piper nigrum</i>)	846	limoneno (23,80); δ -3-careno (21,97); α -pineno (12,89); β -cariofileno (11,34); β -pineno (3,91); sabineno (3,78); α -felandeno (3,76); mirceno (2,88); para-cimeno (1,38); linalol (1,24); terpinoleno (1,17); β -selineno (1,11); 1,8 cineol (0,98); α -terpineno (0,97); α -humuleno (0,77); α -copaeno (0,71); eugenol (0,56); terpinen-4-ol (0,47); canfeno (0,21); safrol (0,17)
Pinho (<i>Pinus silvestris</i>)	874	acetato de bornila (32,74); canfeno (21,67); α -pineno (10,95); limoneno (4,42); 1,8 cineol (3,15); borneol (3,11); β -pineno (1,82); β -cariofileno (1,53); terpinoleno (1,01); mirceno (0,54); acetato de geranila (0,34); cânfora (0,22); para-cimeno (0,14); γ -terpineno (0,12)
Sálvia Esclareía (<i>Salvia sclarea</i>)	857	acetato de linalina (66,77); linalol (22,67); acetato de geranila (3,29); β -cariofileno (1,15); mirceno (0,18); limoneno (0,15); 1,8 cineol (0,12)
Tea Tree (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	858	1-terpinen-4-ol (53,40); p-cimeno (8,09); gama-terpineno (5,34); 1,8 cineol (3,18); alfa-pineno (1,40); terpinoleno (1,05); limoneno (0,70)
Vetiver (<i>Vetiveria ziznoides</i>)	977	n/d
Ylang Ylang (<i>Cananga odorata</i>)	904	trans- β -cariofileno (12,92); linalol (11,38); germacreno-d (11,21); benzil acetato (10,34); acetato de geranila (9,87);

TABELA II.

Valores das médias dos halos de inibição para 23 óleos essenciais e antibióticos testados frente às linhagens padrões ATCC para as espécies de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Letras diferentes nas colunas representam diferenças estatísticas entre as médias dos halos de inibição (mm) para os óleos essenciais quando $p \leq 0,05$.

Óleo essencial	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Alecrim (<i>Rosmarinus officinallis</i>)	4 ^{bc}	8,3 ^{abc}	5,66 ^{abc}
Bergamota (<i>Citrus aurantium bergamia</i>)	0 ^c	5,8 ^{abc}	0 ^c
Canela (<i>Cinnamomum cassia</i>)	12,3 ^{ab}	15,5 ^{ab}	10,2 ^{ab}
Cardamomo (<i>Elettaria cardamomum</i>)	0 ^c	9,33 ^{abc}	0 ^c
Cedro (<i>Cedrus atlantica</i>)	1,5 ^c	11,5 ^{abc}	0 ^c
Cipreste (<i>Cupressus sempervirens</i>)	1,5 ^c	5,1 ^{abc}	2 ^{bc}
Copaíba (<i>Copaifera officinalis</i>)	0 ^c	0 ^c	0 ^c
Cravo da Índia (<i>Syzygium aromaticum</i>)	15,4 ^a	18,3 ^a	13,7 ^a
Erva Doce (<i>Foeniculum vulgare</i>)	0 ^c	5,6 ^{abc}	0 ^c
Gengibre (<i>Zingiber officinalis</i>)	0 ^c	4,1 ^{bc}	0 ^c
Gerânio (<i>Perlagonium graveolens</i>)	4 ^{bc}	13,1 ^{abc}	0 ^c
Hortelã do Brasil (<i>Mentha arvensis</i>)	3,5 ^{bc}	17,1 ^{ab}	6,6 ^{abc}
Laranja (<i>Citrus aurantium dulcis</i>)	0 ^c	3,8 ^{bc}	0 ^c
Lavanda (<i>Lavandula officinalis</i>)	2,6 ^{bc}	12,3 ^{abc}	0 ^c
Limão Tahiti (<i>Citrus limonum</i>)	0 ^c	9,6 ^{abc}	0 ^c
Manjerona (<i>Origanum majorana</i>)	15,3 ^a	13,6 ^{ab}	9,8 ^{abc}
Noz Moscada (<i>Myristiva fragans</i>)	4,9 ^{bc}	12,3 ^{abc}	5,5 ^{abc}
Palmarosa (<i>Cymbopogon martini</i>)	3 ^{bc}	16,0 ^{ab}	0 ^c
Patchouli (<i>Pogostemon patchouli</i>)	0 ^c	13,1 ^{abc}	2,5 ^{bc}
Pimenta Negra (<i>Piper nigrum</i>)	0 ^c	8,2 ^{abc}	1,33 ^{bc}
Sálvia Esclareia (<i>Salvia sclarea</i>)	0 ^c	11,9 ^{abc}	0 ^c
Tea Tree (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	16,5 ^a	17,1 ^{ab}	13,8 ^a
Vetiver (<i>Vetiveria ziznoides</i>)	0 ^c	14,6 ^{ab}	2,1 ^{bc}
Cloranfenicol	23,5	24	5,5
Tetraciclina	30,5	24,5	11,6

Na segunda etapa do estudo foram realizados os ensaios utilizando metodologia da diluição em ágar de um total de 27 óleos, tendo acrescentado os óleos de Eucalipto, Lemongrass, Pinho e Ylang Ylang. Os valores das Concentrações Inibitórias Mínimas 90% (CIM90%) para os 27 óleos essenciais frente as linhagens bacterianas testadas (Tabela III), demonstram que as cepas de *S. aureus* novamente apresentaram susceptibilidade a um maior número de óleos essenciais, sendo que dos 27 óleos testados, 8 apresentaram atividade inibidora com valores de CIM90% abaixo de 0,30 mg/mL (Eucalipto, Lemongrass, Patchouli, Pimenta Negra, Sálvia Esclaréia, Tea Tree, Vetiver, Ylang Ylang).

O óleo essencial de Manjerona no teste de difusão demonstrou uma boa atividade para as três linhagens testadas resultou em halos de 15,3 mm para *E. coli*, 13,6 mm para *S. aureus* e 9,8 mm para *P. aeruginosa*, porém nos ensaios utilizando a metodologia de diluição em ágar até as concentrações testadas não foi possível determinar a concentração inibitória mínima do óleo de manjerona para as linhagens de *P. aeruginosa*, estes resultados corroboram com os de Hammer et al. (2009) os quais determinaram as CIM's de manjerona para *E. coli* e *S. aureus* porém não obtiveram resultados para *P. aeruginosa*.

De forma geral, a linhagem de *S. aureus* foi a mais sensível aos produtos naturais, o que novamente confirma relatos da literatura (Betoni et al. 2006, Silva e Fernandes Júnior 2010) que as bactérias Gram positivas são mais sensíveis aos produtos naturais que as Gram negativas. Esses dados são importantes para a terapêutica das infecções causadas por essas bactérias, os *S. aureus* são descritos como um dos principais agentes responsáveis por infecções, sua virulência e capacidade de adquirir resistência aos antimicrobianos resulta em um problema sério em todo o mundo para os hospitais e profissionais de saúde (Carvalho et al. 2009).

A *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram negativa que produz pigmentos hidrossolúveis, com ampla distribuição no solo e na água, é um patógeno hospitalar que se desenvolve em áreas úmidas como pias, banheiras e chuveiros sendo considerada uma bactéria resistente (Jawetz et al. 2005).

TABELA III.

Concentração Inibitória Mínima 90% (CIM90%) (mg/mL) dos óleos essenciais frente as linhagens padrões ATCC e amostras clínicas humanas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* testadas. Os valores com símbolo > foram desconsiderados na análise estatística, pois não mostraram ação inibidora até as concentrações máximas testadas.

Óleo essencial	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Alecrim (<i>Rosmarinus officinallis</i>)	22,12 ⁱ	7,26 ^t	>26,55
Bergamota (<i>Citrus aurantium bergamia</i>)	>26,13	19,81 ^w	>26,13
Canela (<i>Cinnamomum cassia</i>)	2,0 ^b	1,14 ^{ok}	30 ^{ba}
Cardamomo (<i>Eletaria cardamomum</i>)	>26,07	7,58 ^s	>26,07
Cedro (<i>Cedrus atlantica</i>)	26,73 ^k	2,76 ^{nl}	>26,73
Cipreste (<i>Cupressus sempervirens</i>)	>25,2	>25,2	>25,2
Copaíba (<i>Copaifera officinalis</i>)	>26,52	26,52 ^z	>26,52
Cravo da Índia (<i>Syzygium aromaticum</i>)	1,98 ^a	1,21 ^k	8,29 ^a
Eucalipto (<i>Eucalypto globulus</i>)	14,35 ^h	0,22 ^c	>26,49
Erva Doce (<i>Foeniculum vulgare</i>)	20,22 ^l	7,81 ^{us}	>27,57
Gengibre (<i>Zingiber officinalis</i>)	>25,5	4,93 ^{qp}	>25,5
Gerânio (<i>Perlagonium graveolens</i>)	4,24 ^{ec}	0,31 ^{ge}	>25,4
Hortelã do Brasil (<i>Mentha arvensis</i>)	5,52	2,26 ^l	>25,47
Laranja (<i>Citrus aurantium dulcis</i>)	>24,63	16,5 ^x	>24,63
Lavanda (<i>Lavandula officinalis</i>)	25,59 ^{ml}	4,27 ^r	>25,59
Lemongrass (<i>Cymbopogon schoenanthus</i>)	2,1 ^{gc}	0,22 ⁱ	>25,74
Limão Tahiti (<i>Citrus limonum</i>)	>25,2	14,91 ^v	>25,2
Manjerona (<i>Origanum majorana</i>)	4,21 ^{dc}	4,21 ^p	>25,23
Noz Moscada (<i>Myristiva fragans</i>)	18,52 ^j	13,96 ^{yx}	>26,67
Palmarosa (<i>Cymbopogon martini</i>)	2,09 ^{fc}	0,59 ^m	>26,22
Patchouli (<i>Pogostemon patchouli</i>)	>30,27	0,25 ^f	>30,27
Pimenta Negra (<i>Piper nigrum</i>)	>25,38	0,21 ^a	>25,38
Pinho (<i>Pinus silvestris</i>)	>26,22	2,58 ^{ji}	>26,22
Sálvia Esclaréia (<i>Salvia sclarea</i>)	>25,71	0,29 ^{hf}	>25,71
Tea Tree (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	4,29 ^e	0,21 ^b	>25,74
Vetiver (<i>Vetiveria ziznoides</i>)	>29,31	0,24 ^e	>29,31
Ylang Ylang (<i>Cananga odorata</i>)	>27,12	0,23 ^d	>27,12

. Letras diferentes nas colunas representam diferenças estatísticas entre as medianas de atividade antibacteriana entre os óleos essenciais (mg/mL) quando $p \leq 0,001$

Apesar da *E. coli* ser uma bactéria Gram negativa assim como a *P. aeruginosa*, obtivemos sensibilidade frente a 14 óleos testados até a concentração máxima testada. Estes resultados corroboram com os de Duarte et al. (2007) quando reportam que houve ação antimicrobiana para 17 óleos de um total de 29 testados contra *E. coli*, sendo que concluíram que a atividade antibacteriana do óleo de *Cymbopogon martini* (palmarosa) e de seu composto majoritário, o geraniol, podem ser úteis para o tratamento de diarreia causada por cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica.

Considerando-se as duas metodologias utilizadas para verificar a ação antimicrobiana, ou seja, a difusão a partir de discos impregnados e diluição, alguns comentários são pertinentes. De todos os óleos testados, o Cipreste (*Cupressus sempervirens*) foi o único que não apresentou atividade antibacteriana utilizando a metodologia de diluição em ágar para as cepas testadas. Segundo Hammer et al. (1999) este óleo também não apresentou atividade frente a *E. coli* e *P. aeruginosa* embora tenha apresentado ação sobre linhagens de *S. aureus*, com um valor de CIM de 2% v/v. Porém, reportam os autores que foi utilizado nos ensaios uma única cepa padrão NCTC (National Collection of Type Cultures), o que pode explicar os resultados distintos obtidos, considerando que neste estudo foram testadas linhagens isoladas de casos clínicos humanos, e portanto fenótipos distintos entre si.

Há diferença na ação antimicrobiana dos óleos quando comparado os resultados das diferentes metodologias utilizadas. O óleo de Cipreste não demonstrou ação antimicrobiana no teste de diluição e apresentou atividade antibacteriana no teste de difusão em ágar. Por outro lado, o óleo essencial de Copaíba, apesar de não ter apresentado atividade nos testes utilizando a metodologia de difusão, no teste de diluição foi possível calcular a CIM 90% para as linhagens de *S. aureus*.

De forma geral, os óleos de canela e de cravo da Índia foram os óleos que apresentaram os maiores potenciais inibidores sobre as três linhagens bacterianas utilizadas, conforme é possível verificar na Fig. 2. De acordo com Prabuseenivasan et al. (2006) estes óleos foram capazes de inibir o crescimento tanto de bactérias Gram positivas como Gram negativas.



Fig. 2. Teste de sensibilidade através da diluição em ágar para os óleos essenciais de canela e cravo

Ambos os óleos apresentam como composto majoritário o eugenol, apesar de não podermos afirmar que este seja o único componente que desempenhe ação antibacteriana, seu potencial para esta atividade foi evidenciado por Qiu et al. (2010). O óleo essencial de cravo exibiu a melhor atividade dentre os 27 óleos testados para as duas linhagens Gram negativas, no entanto para as linhagens de *S. aureus* o óleo de Pimenta Negra com apenas 0,21 mg/mL inibiu 90% destas cepas.

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

De forma geral foi possível concluir pelos resultados obtidos que houve elevada resistência das linhagens de *P. aeruginosa* aos óleos essenciais enquanto que na outra extremidade verificou-se uma sensibilidade também considerável das linhagens de *S. aureus*, mais que foi verificado potencial antimicrobiano para os dois grupos de bactérias testadas, ou seja, Gram positiva e Gram negativa. Também pode ser observada diferença entre resultados de ação antimicrobiana quando a metodologia adotada foi a difusão e diluição.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a empresa By Samia Aromaterapia pelo fornecimento dos óleos essenciais testados bem como gentilmente forneceu as caracterizações químicas

por GC-MS dos mesmos. Agradecem também ao prof. Dr. Luciano Barbosa, do Depto de Bioestatística do IBB pela análises estatísticas dos resultados.

REFERÊNCIAS

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446–475.

Betoni JEC, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC, Fernandes Junior A 2006. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101(4): 387-390.

Carmo ES, Lima EO, Souza EL 2008. The potential of *origanum vulgare* l. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *aspergillus* species. *Braz. J. Microbiol.* 39: 362-367.

Carvalho MJ, Pimenta FC, Hayashida M, Gir E, Silva AM, Barbosa CP, Canini SRMS, Santiago S 2009. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *S. aureus* in the saliva of health professionals. *Clinics* 64(4): 295-302.

Castro C, Silva ML, Pinheiro AL, Jacovine LAG 2005. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* Cheel. *Revista Árvore* 29(2): 241-249.

Cavanagh HM and Wilkinson JM 2002. Biological activities of lavender essential oil. *Phytother Res* 16(4): 301-308.

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da tripanosomiase americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 14: 15-61.

Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility

testing; Fifteenth Information Supplement. CLSI/NCCLS document M 100-S15. Wayne, PA, 2005.

Cox SD, Mann JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmingtn JR, Wyllic SG 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J. Appl. Microbiol. 88: 170–175.

Dorman HJD and Deans SG 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88: 308–316.

Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. J Ethnopharmacol 111: 197–201.

Fischbach MA and Walsh CT 2009. Antibiotics for emerging pathogens. Science 325(5944): 1089-1093.

Fonseca P and Librand APL 2008. Evaluation of physico-chemical and phytochemical characteristics of different tinctures of barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). Brazilian Journal of Pharmaceutical 4: 271-277.

Franz CM 2010. Essential oil research: past, present and future. Flavour Fragrance Journal 25: 112-113.

Gobbo-Neto L and Lopes N P 2008. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quim Nova 30(2): 374-381.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86(6): 985-990.

Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine 15: 639-652.

Houghton P J, Howes M J, Lee C C, Steventon G 2007. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol* 110: 391-400.

Jawetz E, Melnick J, Aldelberg E 2005. *Microbiologia médica: um livro médico Lange*. Tradução Patrícia Lydie Volux. 22.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil.

Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods* 81: 121–126.

López P, Sánchez C, Batlle R, Nerín C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J Agric Food Chem* 53: 6939-6946.

Mazutti M, Beledelli B, Mossi AJ, Cansian RL, Dariva C, Oliveira J V, Paroul N 2006. Caracterização química de extratos de *ocimum basilicum* L. obtidos através de extração com CO₂ a altas pressões. *Quim Nova* 29(6): 1198-1202.

Mendes SS, Bomfim RR, Jesus HCR, Alves P B, Blank AF, Estevam CS, Antonioli AR, Thomazzi SM 2010. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *J Ethnopharmacol* 129(3): 391-397.

Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues S, Antonioli A R, Santos PO, Barbosa Júnior AM, Trindade RC 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn* 17(1): 108-113.

Okoh OO, Sadimenko AP, Afolayan AJ 2010. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chem* 120: 308-312.

Pereira RS, Sumita TC, Furlan MR, Jorge AOC, Ueno M 2004. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. Rev Saude Publica 38(2): 326-328.

Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complement Altern Med 6(39): 1-8.

Pupo MT, Gallo MBC, Vieira PC 2007. Biologia química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. Quim Nova 30(6): 1446-1455.

Qiu J, Feng H, Lu J, Xiang H, Wang D, Dong J, Wang J, Wang X, Liu J, Deng X 2010. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. 76(17): 5846-5851.

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

Silva AR 1998. Tudo sobre aromaterapia. São Paulo: Roca, 624 pp.

Silva NCC and Fernandes Junior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 16(3): 402-413.

Silva SL, Chaar JS, Figueiredo PMS, Yano T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. Acta Amazonica 38(1): 107-112.

Stevensen CJ 1998. Aromatherapy in dermatology. Clin. Dermatol. 16: 689-694.

Veiga Junior VF and Pinto AC 2005. Plantas medicinais: cura segura? Quim Nova 28(3): 519-528.

Wannes WA, Mhamdi B, Sriti J, Jemia MB, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME, Marzou B 2010. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle(*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem. Toxicol.* 48: 1362-1370.

Xiao JB, Chen JW, Xu M 2007. Supercritical fluid CO₂ extraction of essential oil from *Marchantia convoluta*: global yields and extract chemical composition. *Electronic Journal of Biotechnology* 10(1): 141-148.

CAPÍTULO II

*Escrito segundo normas da revista *Water Research*

Capítulo II-

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais usados em aromaterapia diluídos em água e salina para simular banho de imersão

Bruna Fernanda Murbach Teles Machado^{a*}, Isabella da Silva Probst^a, Lidiane Nunes

Barbosa^a, Julio Toshimi Doyama^b, Ary Fernandes Junior^a

^aDepartamento de Microbiologia e Imunologia, ^bDepartamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, campus de Botucatu, SP, Brasil, CEP 18618-970 Telefone 55 14 38116058

*Autor correspondente: e-mail: brunatura@ibb.unesp.br

Resumo

Os óleos essenciais compreendem misturas de compostos geralmente ativos que são provenientes do metabolismo secundário de plantas em geral, constituídos especialmente por terpenos, compostos com inúmeras propriedades biológicas, e são amplamente utilizados nas indústrias e em procedimentos na aromaterapia. A aromaterapia é uma terapia natural que se utiliza das propriedades terapêuticas dos óleos essenciais em benefício da saúde humana, sendo que dentre as modalidades utilizadas destacam-se as inalações, as massagens e os banhos. No caso dos banhos, destaca-se o fato que existem microorganismos que sobrevivem na água podendo resultar em prejuízos à saúde das pessoas. Desta forma, objetivamos analisar a ação antimicrobiana de óleos essenciais diluídos em água e salina visando redução na contagem de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em função do tempo quando adicionados os óleos essenciais de Cravo (*Syzygium aromaticum*), Gerânio (*Pelargonium graveolens*), Lavanda (*Lavandula angustifolia*), Palmarosa (*Cymbopogon martini*) e Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*). Foram realizados ensaios controles sem adição dos óleos essenciais e tratamentos contendo 0,5% v/v de cada um dos óleos. A metodologia para contagem bacteriana foi o do plaqueamento tendo iniciado os ensaios com uma contagem bacteriana próxima de 10^5 UFC/mL. Comparando-se os resultados, tanto para os ensaios em água quanto salina, observou-se que o perfil de sensibilidade das linhagens bacterianas aos óleos essenciais foram próximos entre si, porém significativamente distintos quanto aos ensaios controles. Os óleos essenciais demonstraram o potencial antibacteriano sobre as três bactérias, sendo que as Gram negativas apresentaram maior susceptibilidade do que a bactéria Gram positiva. Neste caso, verificamos ser possível o controle microbiano na água de banhos de imersão quando os óleos essenciais são adicionados o que é um aspecto positivo durante a utilização deste tipo de prática em aromaterapia.

Palavras chaves: óleos essenciais; água; atividade antimicrobiana; aromaterapia.

Antimicrobial activity of essential oils used in aromatherapy diluted in water and saline solution to simulate an immersion bath

Bruna Fernanda Murbach Teles Machado^{a*}, Isabella da Silva Probst^a, Lidiane Nunes Barbosa^a, Julio Toshimi Doyama^b, Ary Fernandes Junior^a

^a Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, ^b Department Chemistry and Biochemistry, Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, campus de Botucatu, SP, Brazil, CEP 18618-970 Tel 55 14 38116058

*Corresponding author: e-mail: brunatura@ibb.unesp.br

Abstract:

Essential oils are mixtures of active compounds from the secondary metabolism of plants and consisting especially of terpenes, which are compounds with numerous biological properties. They are widely used in industry and also in procedures in aromatherapy. Aromatherapy is a natural therapy that uses the therapeutic properties of essential oils for human health. Inhalation, immersion baths and massages are the main procedures. In the bath, microorganisms can survive which may have a negative impact on the health of people. We aimed to analyse the antimicrobial activity of essential oils diluted in water and saline in order to reduce the count of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* when the essential oils of Clove (*Syzygium aromaticum*), Geranium (*Pelargonium graveolens*), Lavender (*Lavandula angustifolia*), Palmarosa (*Cymbopogon martini*) and Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) were added. We performed control assays without essential oils and treatment assays with 0.5% v/v of each of the oils. The bacterial count method was performed by plating, which demonstrated an initial count around of 10^5 CFU/mL. According to the results of both tests using water and saline, we observed that the sensitivity of bacterial strains to essential oils were similar but significantly different when compared to control assays. The essential oils showed antimicrobial activity against all three bacteria, and the Gram negative strains were more susceptible than the Gram positive bacteria. This study established the possibility of microbial control in water immersion baths when essential oils are added, which is a positive aspect for this aromatherapy procedure.

Keywords: essential oils, water, antimicrobial activity, aromatherapy.

1. Introdução

Os organismos vivos produzem milhares de diferentes compostos orgânicos de baixo peso molecular, sendo que muitos destes não têm nenhuma função aparente nos processos básicos de crescimento e desenvolvimento e por isto, têm sido historicamente designados como produtos naturais ou metabólitos secundários. A importância dos produtos naturais na medicina, agricultura e indústria tem estimulado a realização de estudos sobre a biossíntese e atividades biológicas dessas substâncias (Gershenzon e Dudareva, 2007).

Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis e complexos caracterizados por um forte odor sendo sintetizados por plantas aromáticas durante o metabolismo secundário e normalmente extraídos de plantas encontradas em países de clima quentes como as do mediterrâneo e dos trópicos, onde são considerados parte importante da farmacopéia tradicional (Bakkali et al., 2008).

Após descobrimento e elucidação das centenas de componentes dos óleos essenciais nas últimas décadas, pode se entender a complexidade e a enorme diversidade que existe neste grupo de produtos naturais, o qual consiste normalmente de mono (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}), fenilpropenos além de outros componentes voláteis (Franz, 2010). Os terpenos são substâncias presentes tanto em plantas como em animais, são descritos como possuidores de uma diversidade considerável de propriedades biológicas (Paduch et al., 2007). Os monoterpenos, importantes constituintes dos óleos essenciais, são altamente voláteis e com isto são facilmente arrastados pelo vapor de água livres de outros componentes e são frequentemente utilizados em função das suas características organolépticas marcantes (Bandoni e Czepak, 2008).

Considerando como sendo a maior classe de produtos naturais, os terpenos apresentam ainda uma variedade de papéis na mediação de interações antagônicas e benéfica entre os organismos e o ambiente. Eles defendem muitas espécies de plantas, animais e microorganismos contra predadores, patógenos e competidores, estão envolvidos na transmissão de mensagens quanto à presença de alimento, companheiros e inimigos. Apesar da diversidade de terpenos conhecidos, é surpreendente como organismos filogeneticamente distantes têm utilizado estruturas semelhantes (Gershenzon e Dudareva, 2007)

De forma geral, os óleos essenciais apresentam diferentes propriedades biológicas, como a ação larvicida (Rajkumar et al., 2010), atividade antioxidante (Wannes et al., 2010), ação analgésica e anti-inflamatória (Mendes et al., 2010), fungicida (Carmo et al., 2008), atividade antitumoral (Silva, 2008) e ação antimicrobiana (Bakkali et al., 2008; Barbosa et al., 2009). Quanto à propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais, estes apresentam ação sobre fungos e bactérias, sendo que normalmente as bactérias Gram positivas são mais susceptíveis que as Gram negativas e que baixos valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) inibem o crescimento destes organismos (Hammer, 1999).

São freqüentes os relatos sobre os mecanismos de ação antimicrobiana dos óleos, sendo que alguns casos foram parcialmente elucidados como, por exemplo, para o óleo essencial de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) que causa lise e perda da integridade da membrana, devido à saída de íons e inibição da respiração celular (Carson et al., 2006).

De maneira geral, a ação antimicrobiana é considerada de grande interesse para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas desde que o uso de aditivos naturais ganhou importância como tendência na substituição de conservantes sintéticos artificiais (Okoh et al., 2010). A maior parte da produção de óleos essenciais é utilizada pela indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética e uma pequena parte da produção utilizada na aromaterapia (Price, 1999). Esta crescente utilização e conseqüente aumento na demanda de produtos naturais em todo o mundo é conseqüência dos problemas que são atribuídos a inúmeros produtos sintéticos sobre a saúde humana e ao ambiente (Bandoni e Czepak, 2008).

Quanto às terapias naturais, nas últimas décadas houve aumento significativo do interesse (Silveira et al., 2008) tendo expandido globalmente sua popularidade tanto nos países em desenvolvimento como também naqueles onde a medicina convencional é predominante nos sistemas públicos de saúde (WHO, 2000).

Aromaterapia é a terapia que utiliza óleos essenciais para a promoção e manutenção da saúde e parece agir através do sistema límbico, especialmente sobre a amígdala e o hipocampo (Cavanagh e Wilkinson, 2002). Assim, a aromaterapia pode ser utilizada não somente pelos efeitos antimicrobianos, antivirais e antiinflamatórios dos óleos essenciais (Bakkali et al., 2008) mas também pelos seus efeitos sobre os estados emocionais e mentais nos indivíduos (Cannard, 2006).

A inalação, a aplicação dérmica e o banho são os principais métodos de aplicação para que o óleo essencial seja absorvido pelo organismo durante os procedimentos na aromaterapia. Para aliviar o estresse e a ansiedade, a lavanda é um dos óleos essenciais mais utilizados em banhos, a preparação desta modalidade é realizada utilizando-se pequenas quantidades de óleo essencial, neste caso são 8 gotas do óleo em uma banheira (Price, 1999).

Por outro lado, banheiras e ôfuros foram mencionados como locais potenciais para aquisição de *Pseudomonas aeruginosa*, resultando em diversas patologias, como urosepse e foliculite (Dulabon et al., 2009; Yu et al., 2007).

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria com ampla distribuição no solo e na água, produz pigmentos hidrossolúveis. É um patógeno hospitalar que se desenvolve em áreas úmidas como pias, banheiras e chuveiros, tendo como temperatura de melhor crescimento entre 37 á 42°C, bactéria resistente que não deve ser tratada com monoterapia (Jawetz et al., 2005).

De acordo com a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010), em água mineral não podem ser constatadas as presenças de *E. coli* ou coliformes (fecais) termotolerantes ou coliformes totais, enterococos, *P. aeruginosa* e/ou clostrídios sulfito redutores, em quantidade superior a 2 UFC/mL. *S. aureus* é um dos principais agentes responsáveis por infecções (Carvalho et al.,2009), frequentemente encontrado na pele (Jawetz et al.,2005) e por isso com capacidade de contaminar a água e alimentos através de seus manipuladores.

Desta maneira, analisar a ação antimicrobiana de óleos essenciais quando diluídos na água possibilitará a obtenção de informações para o controle e a desinfecção neste meio e em locais úmidos como banheiras e ofurôs, bem como possibilita a elucidação da propriedade antimicrobiana destes óleos essenciais na água podendo, desta forma, auxiliar com estudos para a criação de novas modalidades terapêuticas bem como possibilitar uma melhor prática na aromaterapia, por isso objetivamos verificar ação antimicrobiana dos óleos essenciais de Cravo (*Syzygium aromaticum*), Gerânio (*Perlagonium graveolens*), Lavanda (*Lavandula angustifolia*), Palmarosa (*Cymbopogon martini*) e Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) sobre linhagens padrões ATCC de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* quando colocados em contato numa situação de banho de imersão; determinar a Concentração Inibitória Mínima 90% (CIM90%) dos cinco óleos essenciais frente a diferentes linhagens das

espécies bacterianas em estudo e comparar o perfil de sobrevivência das linhagens bacterianas quando submetidas à ação dos óleos essenciais em meio de água destilada e em solução salina.

2. Materiais e Métodos

2.1 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais foram selecionados para este estudo em função da utilização nas várias terapias naturais bem com pela disponibilidade dos mesmos na forma comercializada por empresas do setor. Desta forma, foram obtidas amostras dos óleos essenciais de Cravo (*Syzygium aromaticum*), Gerânio (*Perlagonium graveolens*), Lavanda (*Lavandula angustifolia*), Palmarosa (*Cymbopogon martini*) e Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) diretamente da empresa *By Samia Aromaterapia* (São Paulo-SP, Brasil) em frascos de vidro âmbar com capacidade para 10 mL na forma comercializada pela referida empresa e mantidos em temperatura ambiente. Segundo informações da empresa, os óleos foram produzidos com uso da metodologia do arraste pelo vapor na origem. Para cada óleo estudado foram determinados os valores de densidade, tendo sido adaptada a metodologia de Fonseca e Librand (2008) em tubos tipo *ependorfs*, sendo estes pesados (P_1) em balança analítica e depois adicionado 1 mL (V) do óleo sendo pesado novamente (P_2). A densidade (D) foi calculada utilizando fórmula abaixo.

$$D = \frac{P_2 - P_1}{V} = \frac{mg}{mL}$$

2.2. Teste de sensibilidade pela metodologia de diluição em ágar e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

2.2.1. Linhagens Bacterianas

Utilizou-se linhagens bacterianas isoladas de casos clínicos humanos sendo 9 cepas da espécie *Escherichia coli*, 10 cepas da espécie *Staphylococcus aureus* e 10 cepas da espécie *Pseudomonas aeruginosa* e uma linhagem bacteriana padrão American Type Culture Collection (ATCC) das espécies *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), mantidas em estoque no Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu-SP. O projeto desenvolvido obteve autorização do comitê de ética em experimentação da Faculdade de medicina de Botucatu/UNESP, protocolo número CEP 3163-2009, para uso das linhagens isoladas de casos clínicos humanos, tendo recebido parecer favorável em 04 de maio de 2009.

As linhagens encontravam-se estocadas a -80°C em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) adicionado de 1% de glicerol, e previamente a utilização nos ensaios foram semeadas em ágar sangue para verificação de viabilidade e pureza, e novamente mantida em ágar nutriente pra uso nas várias etapas do estudo. Por ocasião dos experimentos, as linhagens eram inoculadas em Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 35°C /18-24 horas, sendo que a partir destas culturas foram preparadas suspensões em soluções salinas estéreis (0,85%) utilizando a escala de 0,5 de MacFarland, para obtenção de concentração bacteriana ao redor de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

2.2.2. Ensaio para verificação da ação antimicrobiana através da metodologia de diluição em ágar e determinação de CIM

Os testes de sensibilidade para determinação da CIM dos óleos essenciais foram realizados segundo a metodologia da diluição em ágar (CLSI, 2005), sendo os óleos essenciais diluídos em Mueller Hinton Agar (MHA) que após semeadura das linhagens e incubação realiza-se a leitura dos valores de CIM para cada linhagem bacteriana testada. O MHA foi esterilizado adicionado de Tween 80 na proporção de 0,5%, e mantido na temperatura de aproximadamente 45°C , foram feitas as respectivas misturas

dos óleos essenciais e obtenção das concentrações nas placas de Petri equivalentes a 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 %v/v, num volume total de 20 mL em cada placa. A inoculação das 32 linhagens foi feita a partir de culturas em BHI (37°C/18-24 horas) de cada linhagem com uso de multiinoculador de Sterr. Inicialmente foram preparadas suspensões na escala 0,5 de MacFarland em salina estéril, seguida de diluição 1:20 em BHI visando obter concentração bacteriana ao redor de 10^5 a 10^6 UFC/mL. As 32 linhagens foram semeadas nas placas com uso do multiinoculador, tomando-se o cuidado para não haver mistura das linhagens na placa, e incubadas a 35°C/18-24 horas, seguida de leitura para verificação de crescimento bacteriano através da formação de colônias das respectivas linhagens e anotação dos valores de CIM para cada linhagem. Após coleta dos resultados realizamos as transformações dos valores em %v/v para mg/mL utilizando dados referentes a densidade de cada óleo e o cálculo das respectivas CIM 90% das linhagens bacterianas testadas.

2.3. Teste de sensibilidade bacteriana aos óleos essenciais em água e salina

2.3.1. Linhagens bacterianas

Foram utilizadas linhagens bacterianas padrões American Type Culture Collection (ATCC) para as espécies *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), mantidas em estoque no Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu-SP.

As linhagens encontravam-se estocadas a -80°C em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) mais glicerol, previamente a utilização nos ensaios foram semeadas em ágar sangue para verificação de viabilidade e pureza, sendo novamente inoculadas em ágar nutriente. Por ocasião dos experimentos, as linhagens eram inoculadas em Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 35°C/18-24 horas. A partir destas culturas foram preparadas suspensões em soluções salinas estéreis (0,85%) utilizando a escala de 0,5 de MacFarland, para obtenção de concentração bacteriana ao redor de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

2.3.2. Ensaio para verificação de sobrevivência das linhagens na presença de concentrações dos óleos essenciais

Os ensaios foram realizados utilizando valores de concentrações próximas dos preconizados em banhos quentes aromáticos, ou seja, concentrações abaixo de 1% v/v. Foram realizados dois tipos de ensaios, visando simular um banho de imersão (tipo ofurô), onde as bactérias foram colocadas em contato com os respectivos óleos essenciais dissolvidos em água e salina (0,85%) estéreis e alíquotas destas suspensões foram semeadas em placas com meio de cultura para contagem de células viáveis.

Foram preparados frascos erlenmeyer contendo volumes de 40 mL de água destilada ou salina, ambas estéreis e acrescidas de 0,5% de Tween 80, e adicionados de volumes dos óleos para obtenção da concentração de 0,5 %v/v para cada um dos óleos em estudo (cravo, gerânio, lavanda, palmarosa e tea tree). No tempo zero, cada um dos frascos recebeu 25µL das suspensões bacterianas padronizadas previamente visando obter concentrações bacterianas ao redor de 10^5 e 10^6 UFC/mL em cada frasco tratamento. Foram preparados frascos controles para as linhagens bacterianas sem adição dos óleos essenciais bem como os ensaios foram realizados em duplicata.

Os frascos controles e tratamentos foram mantidos em banho de água com temperatura de 37°C, alíquotas de 10µL de cada frasco foram semeadas em placas de Petri contendo Mueller Hinton Ágar (MHA) utilizando alças calibradas estéreis descartáveis de 10µl nos tempos 0, 10, 20 e 30 minutos, 1, 2, 4, 8 e 24 horas (0,15; 0,3; 0,5; 1, 2, 4, 8 e 24 h), sendo na seqüência incubadas em estufa a 35°C/24 horas. Após período de incubação, foram realizadas contagens das colônias, utilizando o contador de colônias, marca Phoenix, modelo CP-600, para obtenção dos valores de UFC/mL, seguido do cálculo de log de UFC/mL, para os respectivos ensaios controles e tratamentos. Este tipo de procedimento foi uma adaptação da técnica utilizada na realização de uroculturas, segundo os padrões descritos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010) para semeadura com alça calibrada, sendo esta introduzida em uma amostra bem homogênea, fazendo-se movimentos para baixo e para cima no sentido vertical. A alça carregada é então utilizada para inocular o meio de cultura, fazendo-se, inicialmente, uma linha reta no centro da placa e completando-se o espalhamento com uma série de passagens em um ângulo de 90°, através da linha

original. Importante item de controle de qualidade é utilizar alças calibradas descartáveis.

2.4. Análise dos óleos essenciais:

A análise química foi realizada no Departamento de Química e Bioquímica no campus da UNESP-Botucatu-SP, através de espectrômetro de massas acoplado a cromatógrafo gasoso (GCMS), da marca SHIMAZU, modelo QP5050A, utilizando coluna capilar, CBP-5, de 50m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25mm e 0,25µm de espessura do filme. A temperatura do injetor foi de 250°C, a temperatura da interface de 250°C, detector operado em modo EI a 70eV e utilizou-se He como gás de arraste.

2.5. Análise estatística dos resultados:

Para os testes de sensibilidade em ágar utilizamos para confrontar três ou mais tratamentos independentes o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Se a análise for significativa ($p \leq 0,001$), será aplicado teste de comparações múltiplas entre os tratamentos, o teste de Student-Newman-Keuls. Foi utilizada, para os testes de sensibilidade na água e em salina, a Análise de Variância complementado com o teste de Tukey. Se $p > 0,05$; não existe diferença significativa entre os grupos. Foi utilizado o software estatístico SAS versão 9.0, licenciado por UNESP, 2009.

3. Resultados e Discussão:

Os valores obtidos de CIM90% nos testes de sensibilidade pelo método de diluição em ágar estão apresentados na Tabela 1. Considerando que o valor máximo testado foi de 3% v/v, e embora tenha sido feita a transformação para mg/mL utilizando a densidade dos óleos essenciais, verifica-se que para alguns óleos e bactérias os valores de CIM foram superiores a maior concentração testada.

Tabela 1. Valores das concentrações inibitórias mínimas 90% (CIM90%) em %v/v e mg/mL

Óleos essenciais	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	%v/v	mg/mL	%v/v	mg/mL	%v/v	mg/mL
<i>S. aromaticum</i> (Cravo da Índia)	0,84	8,29 ^a	0,12	1,20 ^c	0,20	1,90 ^a
<i>M. alternifolia</i> (Tea tree)	>3,00	>25,74 ^b	0,02	0,20 ^a	0,50	4,30 ^b
<i>C. Martini</i> (Palmarosa)	>3,00	>26,22 ^b	0,07	0,60 ^d	0,24	2,10 ^{bd}
<i>L. angustifolia</i> (Lavanda)	>3,00	>25,59 ^b	0,50	4,30 ^e	>3,00	>25,59 ^e
<i>P. graveolens</i> (Gerânio)	>3,00	>25,40 ^b	0,04	0,31 ^b	0,50	4,24 ^{bc}

Letras diferentes nas colunas representam diferenças estatísticas entre as medianas de atividade antibacteriana entre os óleos essenciais (mg/mL) quando $p \leq 0,001$.

Segundo os resultados obtidos para as cepas testadas, verifica-se maior resistência da *P. aeruginosa* frente aos cinco óleos essenciais, sendo que apenas o cravo apresentou atividade significativa para esta bactéria. Quanto ao *S. aureus*, verifica-se que todos os óleos essenciais foram efetivos enquanto que para *E. coli* quatro óleos essenciais apresentaram atividade exceto o óleo de lavanda. Quando foi possível o cálculo da CIM90%, verifica-se que estes valores não ultrapassam 1%v/v.

Quanto aos ensaios para verificação da sensibilidade das linhagens bacterianas em meio líquido, tanto em substrato de água destilada como em solução salina, estes foram realizados com finalidade de comparação dos resultados através da exclusão dos efeitos da osmolaridade do meio, ou seja, propiciar as bactérias um meio isotônico no caso da salina.

Os perfis de variação no número de bactérias viáveis, expressos como Logaritmo de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (log UFC/mL), são apresentados nas

Figuras de 1 a 6. De maneira geral verificou-se redução acentuada nos valores de log UFC/mL para todos os tratamentos e com quedas mais expressivas que as verificadas para os respectivos controles durante as 24 horas de experimentação. Foi considerado que quando não eram visualizadas colônias na superfície das placas, esta contagem significava valores não detectados de UFC/mL pela metodologia utilizada.

Em relação a *P. aeruginosa* e experimento utilizando água (Figura 1) verificou-se diferença significativa dos resultados obtidos entre ensaios controle e tratamento, mas sem diferença quando comparado os óleos testados entre si. Além disto, no ensaio controle, o numero de células viáveis de *P. aeruginosa* manteve até 4 h após o início do experimento, enquanto que para os ensaios tratamentos não havia mais UFC já em 0,15 h (10 minutos) de experimentação.

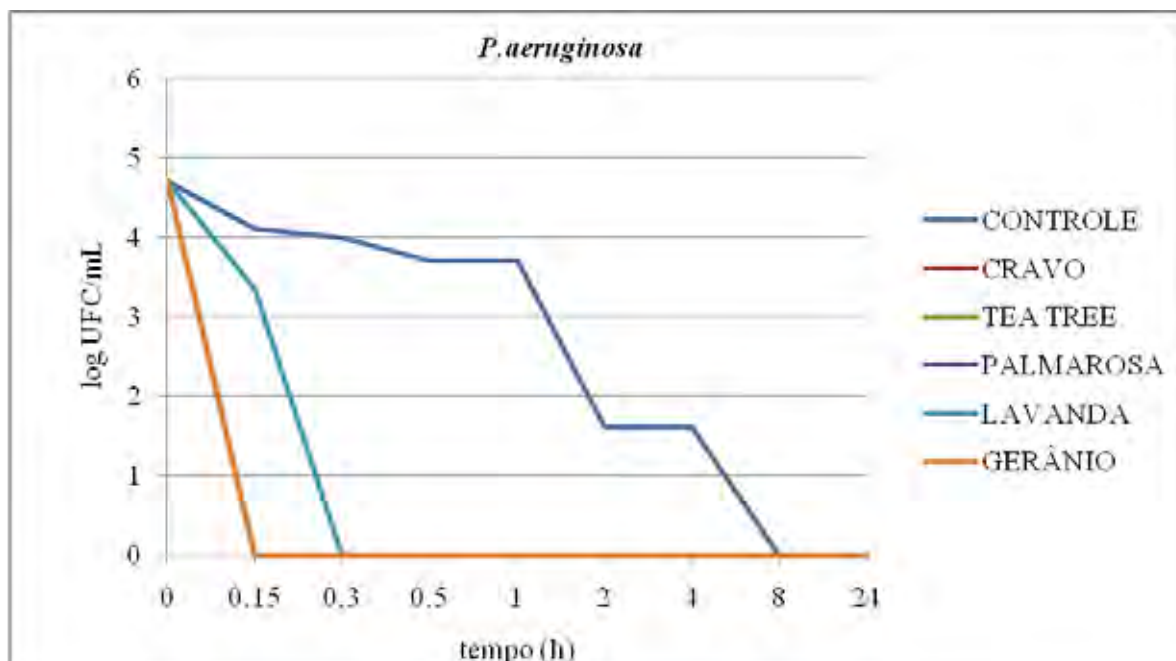


Figura 1. Curvas de sobrevivência dos tratamentos com óleos essenciais e controle em água de *P. aeruginosa* ao longo do tempo

Em relação ao controle com a bactéria *E. coli* em água, o resultado obtido diferenciou-se dos tratamentos com os óleos de palmarosa, gerânio e tea tree, porém sendo estes igualmente eficientes quando comparados entre si (Figura 2), sendo que não foram detectadas células viáveis em 0,15 h (10 minutos) nestes tratamentos. Por outro lado, os resultados com os tratamentos com óleos de cravo e lavanda não foram significativamente diferentes do controle.

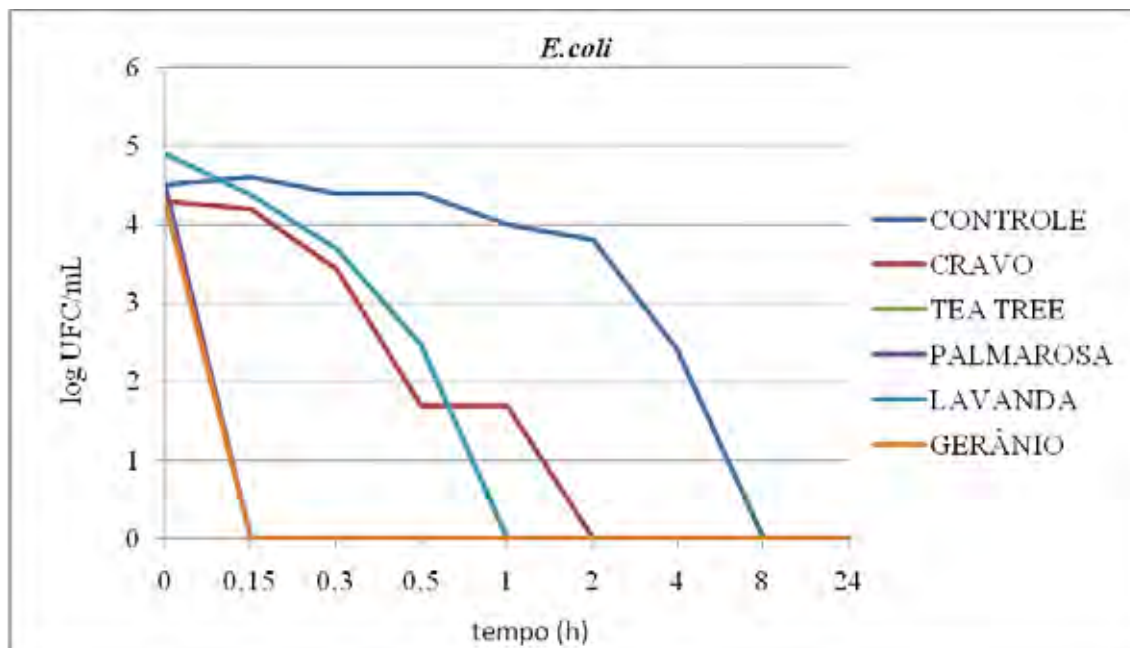


Figura 2. Curvas de sobrevivência dos tratamentos com óleos essenciais e controle em água de *E. coli* ao longo do tempo

Para a linhagem de *S. aureus*, somente os resultados obtidos para óleos essenciais de palmarosa e cravo foram estatisticamente diferentes aos do controle no experimento em água (Figura 3), sendo que este manteve contagens de células viáveis após 4 horas de experimentação enquanto os ensaios com palmarosa e cravo mantiveram contagem bacteriana até o período de tempo de 0,15 h (10 minutos).

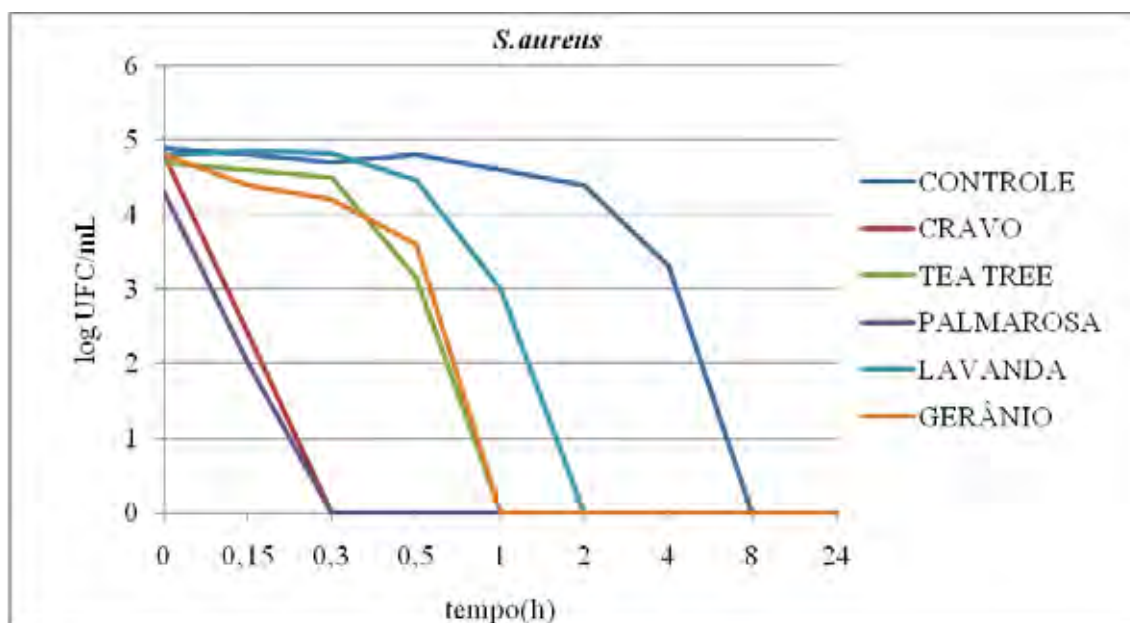


Figura 3. Curvas de sobrevivência dos tratamentos com óleos essenciais e controle em água de *S. aureus* ao longo do tempo

Os ensaios com os tratamentos com tea tree, lavanda e gerânio mantiveram células viáveis acima de 0,5 h.

Nos ensaios utilizando solução salina estéril (0,85%) (Figuras 4 a 6) e posteriormente contaminada com as respectivas bactérias, verifica-se um perfil semelhante ao obtido nos ensaios utilizando água destilada estéril. O objetivo de utilizar salina, embora não seja uma pratica no caso de banhos por imersão, pretendeu-se dar maior capacidade de sobrevivência das bactérias por tornar o meio isotônico.

Em relação a *P. aeruginosa* (Figura 4) no ensaio controle com salina, verifica-se que houve contagem bacteriana durante um tempo maior de experimentação quando comparado aos ensaios com água, sendo verificado presença da bactéria num tempo acima de 8 horas, e não sendo detectável contagem apenas em 24 horas de experimentação. Por outro lado, os óleos essenciais reduziram as contagens para níveis não detectáveis após 0,15h, além do que a eficiência inibitória dos óleos essenciais foi praticamente a mesma verificada nos ensaios com água destilada.

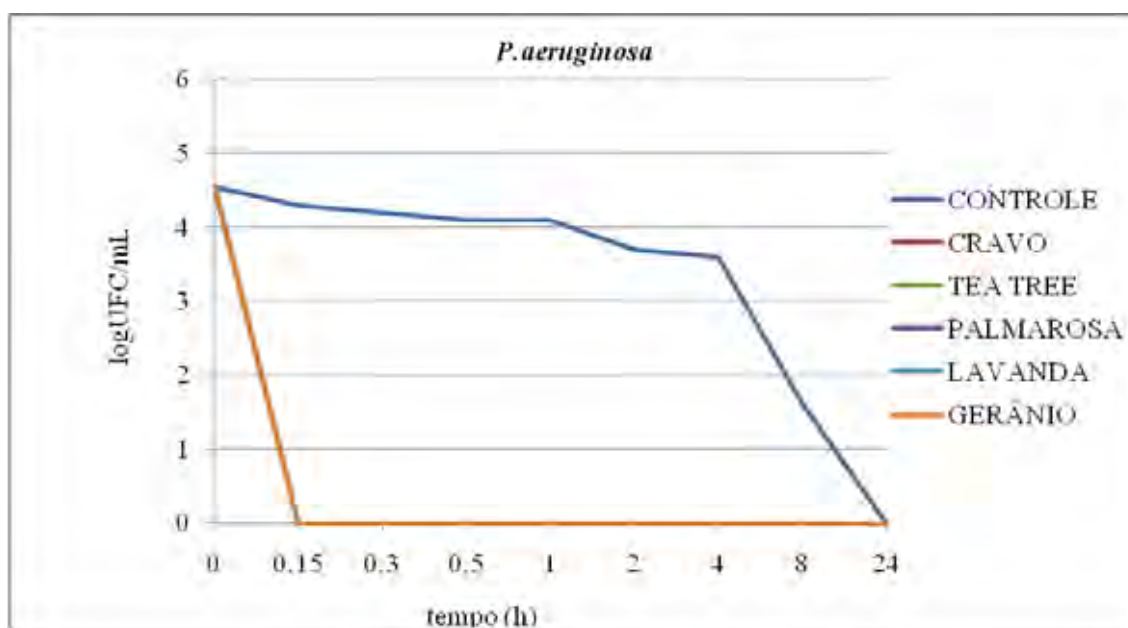


Figura 4. Curvas de sobrevivência dos tratamentos com óleos essenciais e controle em salina de *P. aeruginosa* ao longo do tempo

Quanto a *E. coli* nos ensaios em salina (Figura 5), houve diferença significativa entre controle e os 5 óleos essenciais, sendo que o óleo essencial de palmarosa diferenciou-se somente de lavanda quando comparados os óleos entre si, conforme verificado nos perfis de redução na contagem bacteriana para ambos óleos essenciais. Neste caso em particular de comparação entre resultados, o ensaio de *E. coli* em salina

foi o único caso em que não houve redução total na contagem do controle no período de tempo de 24 horas de experimentação, embora a redução tenha ocorrido em aproximadamente 3 logs.

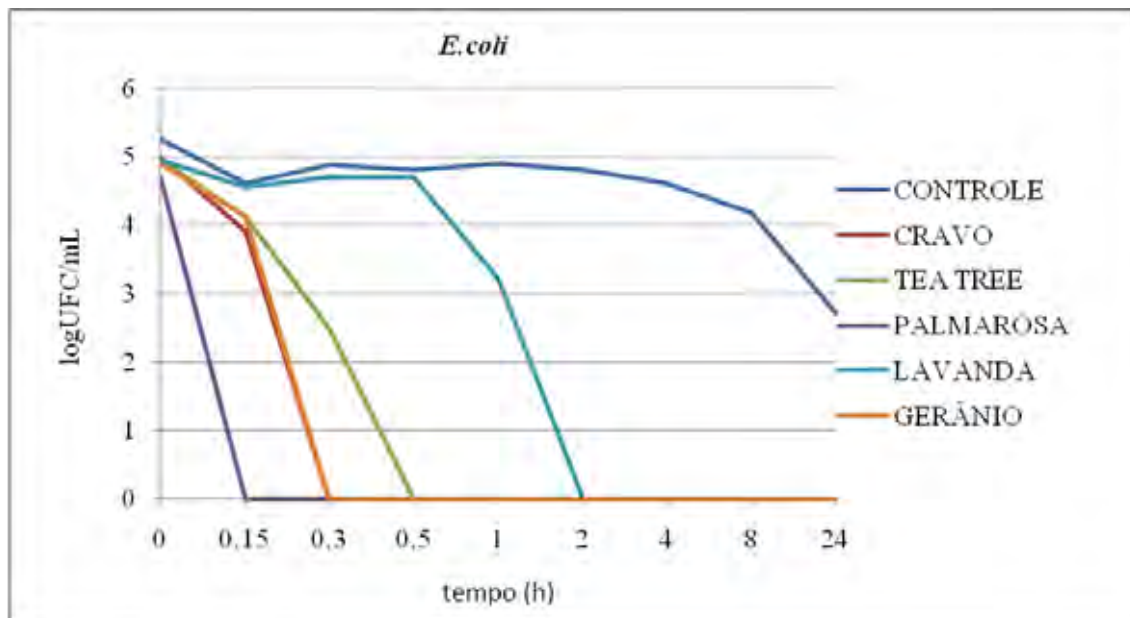


Figura 5. Curvas de sobrevivência dos tratamentos com óleos essenciais e controle em salina de *E. coli* ao longo do tempo

Na Figura 6 são apresentados os valores obtidos para redução de *S. aureus* nos ensaios em solução salina, e verifica-se que os tratamentos com óleos essenciais de cravo, palmarosa e tea tree apresentaram perfis de redução que diferenciaram do controle, enquanto os demais, ou seja, lavanda e gerânio, não se mostraram estatisticamente diferentes aos resultados obtidos no ensaio controle. No geral, percebe-se que todos os óleos essenciais mostraram uma tendência de redução na contagem para níveis não detectáveis num perfil diferente das duas outras bactérias, ocorrendo em período de 2 horas ou mais para o contato bactéria e óleos essenciais.

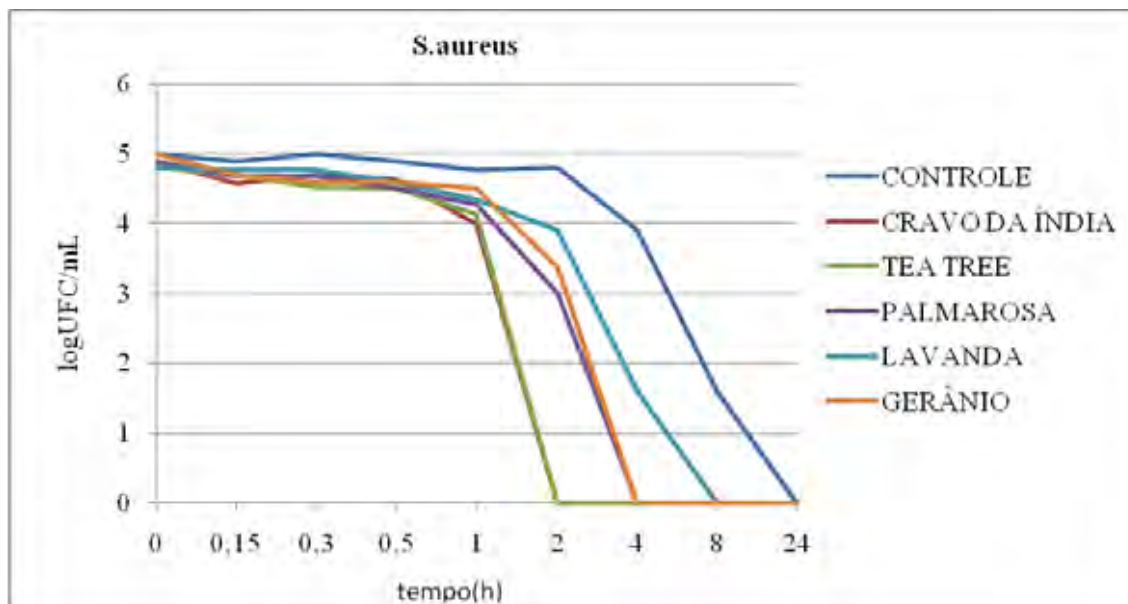


Figura 6. Curvas de sobrevivência dos tratamentos com óleos essenciais e controle em salina de *S. aureus* ao longo do tempo.

Assim, comparando-se os óleos essenciais entre si, observou-se que o óleo essencial de palmarosa foi o único que apresentou resultados estatisticamente diferentes de todos os controles frente às três diferentes cepas, mostrando assim um potencial maior quando objetiva-se diminuir a contagem destas bactérias na água em função do tempo. De acordo com os resultados obtidos na análise química dos óleos essenciais (Tabela 2), o óleo essencial de palmarosa tem como composto majoritário o geraniol.

O geraniol é um terpeno comercialmente importante que ocorre nos óleos essenciais de várias plantas aromáticas, é uma das moléculas mais importantes como flavorizantes e na indústria de perfumaria, sendo um ingrediente comum em produtos de consumo produzidos por essas indústrias. Por ter um odor agradável, geraniol é conhecido por apresentar propriedades inseticidas e repelentes e usado como um agente de controle natural de pragas exibindo baixa toxicidade. Geraniol foi sugerido para representar uma nova classe de agentes quimiopreventivos contra o câncer. Outras atividades biológicas, tais como antibióticos, anti-oxidante, anti-inflamatórios e alguns efeitos vasculares também foram investigados (Chen and Viljoen, 2010). Desta forma e por apresentar atividade antibiótica, este composto encontrado em maior porcentagem no óleo essencial de palmarosa, tenha proporcionado os melhores resultados.

Houghton et al. (2007) descreveram que pela análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais não é possível afirmar que o componente majoritário é o que realiza

a atividade biológica em estudo. Assim, o efeito pode ser atribuído a um constituinte em menor proporção ou de um sinergismo entre os compostos existentes no óleo.

Tabela 2. Densidade e Componentes químicos dos óleos essenciais determinados através de Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massa (GC-MS)

Óleo essencial	Nome Popular	Densidade (mg/mL)	Nome dos Compostos (%)
<i>Syzygium aromaticum</i>	Cravo	988	Eugenol (83,63); ceta-Cariofileno (12,39); alfa-Humuleno (3,05); eugenol acetato (0,93)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Tea Tree	858	1-Terpinen-4-ol (53,40); p-cimeno (8,09); Gama-terpineno (5,34); 1,8 cineol (3,18); alfa-pineno (1,40); terpinoleno (1,05); limoneno (0,70)
<i>Cymbopogon martini</i>	Palmarosa	874	Geraniol (57,49); Acetato de Geranila (13,56); Linalol (1,71); beta-Cariofileno (1,07); Ocimeno (0,27)
<i>Lavandula angustifolia</i>	Lavanda	853	1,8 cineol (45,97); p-cimeno (4,19); 1-terpinen-4-ol (2,30); alfa-pineno (1,48); limoneno (1,46); Gama-terpineno (1,17); terpinoleno (1,04)
<i>Pelargonium graveolens</i>	Gerânio	848	citronelol (31,58); geraniol (25,47); feriato de citronelita (12,74); feriato de geranila (6,71); linalol (6,33); isomenthone (4,35); rose oxide (0,89); acetato de citronelita (0,48)

Apesar disto, existem estudos realizados com componentes isolados dos óleos essenciais, Qiu et al. (2010) reportaram que o eugenol, componente de óleos essenciais de plantas, tem demonstrado atividade contra bactérias Gram positivas e negativas, este componente foi identificado no óleo de cravo utilizado nos experimentos, o tratamento com este óleo essencial diferenciou-se da maioria dos controles exceto da *E.coli* na água, no teste de sensibilidade em meio de cultura sólido o cravo foi o único óleo essencial que apresentou ação antimicrobiana frente as 32 linhagens das 3 diferentes espécies testadas.

Segundo Edberg et al.(2000) a *E. coli* sobrevive na água potável, entre 4 e 12 semanas, dependendo das condições ambientais (temperatura, microflora, etc.), sendo que em sistemas de distribuição de água ela apresenta uma sobrevivência maior que as demais bactérias e é utilizada como indicador biológico de segurança de tratamento de água, talvez por isso tenha sido a única bactéria a manter células viáveis no controle em salina após 24h de experimentação.

De acordo com Carson et al. (2006), o óleo essencial de tea tree está se tornando cada vez mais popular como um agente natural antimicrobiano, porém não apresentou atividade diferenciada ao do controle de *S.aureus* na água apesar de ter demonstrado a menor CIM90% (0,025% v/v), frente a esta bactéria quando testado em ágar, um de seus componentes majoritários, o 1-Terpinen-4-ol, apresentou no estudo dos autores atividade antimicrobiana contra *E.coli*, *S.aureus* e *P.aeruginosa*. Apesar de apresentar atividade antimicrobiana contra estas cepas e ser descrito como um anti-séptico (Price, 1999), a cepa Gram positiva demonstrou resistência a este óleo na água.

Na aromaterapia, um procedimento comum, é o de diluir óleo essencial em óleo vegetal, por exemplo, o de lavanda com semente de uva e adicioná-los a um banho quente para relaxar (Morris, 2002). O óleo essencial de lavanda apesar de ser um dos óleos mais utilizados em banhos de imersão para relaxamento e diminuição de stress, não apresentou resultados diferentes dos ensaios controles em três situações, frente a *E.coli* na água e frente a *S.aureus* na água e em salina, além do que em 5 dos 6 ensaios o óleo essencial de lavanda demonstrou redução nas contagens bacterianas de forma mais tardia quando comparado aos demais óleos.

A presença de *P. aeruginosa* em ofurô foi causa de prostatite e urosepses, sendo sua aquisição em ofurô foi confirmada através de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) sendo que a cepa encontrada no ofurô era a mesma detectada nos exames

clínicos do paciente (Dulabon et al.,2009). Segundo os autores, a temperatura do banho diminuiu os níveis de cloração da água ao longo do tempo, o que facilitou a multiplicação de bactérias. Além disto, segundo Yu et al. (2007), a *P. aeruginosa* é frequentemente descrita como causa de surtos de foliculite associada à uso de banheiras de hidromassagem, piscinas e saunas. Desta forma, e por esta bactéria apresentar características que conferem maior resistência em ambientes úmidos (Jawetz, 2005), seu controle nestes ambientes e na água é de grande importância, pois pode causar infecções nas vias urinárias, mucosas, otite externa entre outras patologias.

Obtivemos os melhores resultados para esta cepa, os cinco óleos essenciais testados foram efetivos tanto em salina quanto na água, além disto apresentou maiores reduções nas contagens de log UFC/mL em menor tempo.

Conforme relatado por Wilkinson e Cavanagh (2005) e frente aos resultados obtidos, quando verificou-se a ação antimicrobiana de óleos essenciais em meio de cultura sólido, a *P. aeruginosa* foi uma das bactérias que apresentou maior resistência à alguns produtos naturais, enquanto o *S. aureus* demonstrou maior susceptibilidade a uma maior variedade destes produtos. Neste sentido, verificamos no presente estudo a ocorrência de resultados contrários quando testou-se esta sensibilidade em água e salina, embora seja notório que se trata de metodologias distintas para a realização dos desafios bacterianos frente aos óleos essenciais.

Assim, considerando os objetivos do estudo em simular as condições reais de banhos de imersão em ofurô e banheiras, e considerando que existe redução também na contagem bacteriana nos ensaios controles, os óleos essenciais estimularam a redução das contagens bacterianas e estes resultados são importantes uma vez que é freqüente a adição de óleos essenciais na água durante banhos de imersão visando as propriedades terapêuticas dos óleos essenciais. Assim sendo, e pelo fato dos resultados terem demonstrado a capacidade destes produtos naturais em reduzir de forma acentuada a contagem bacteriana, a utilização de óleos essenciais poderá ser considerado uma nova alternativa para o controle e desinfecção destas bactérias na água ou mesmo em outras áreas úmidas de uso nos procedimentos da aromaterapia.

4. Conclusões

Os óleos essenciais testados apresentaram potencial antibacteriano para as três espécies testadas, tendo as Gram negativas demonstrado maior susceptibilidade aos óleos essenciais quando testados em água e salina, do que a bactéria Gram positiva;

Verificou-se maior permanência da bactéria *E. coli* quando os ensaios foram realizados com salina em vez de água destilada.

O óleo essencial de Palmarosa demonstrou ação antibacteriana tanto na água quanto na salina frente às três cepas testadas.

Dentre as cepas testadas a *P. aeruginosa* foi a que apresentou maior susceptibilidade aos óleos essenciais tanto na água como na salina mesmo sendo uma bactéria comum na água e em locais úmidos.

5. Agradecimentos

A empresa BySamia Aromaterapia, na pessoa da proprietária Dra. Samia Maluf, por fornecer gentilmente os óleos essenciais utilizados neste estudo; a Professora Margarida Juri Saeki por disponibilizar o equipamento para a caracterização química dos óleos essenciais.

6. Referências

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

Bandoni, A. L. and Czepak, M. P. (2008) Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitória: Edufes, 624p.

Barbosa, L. N. ; Rall, V. L. M.; Fernandes, A. A. H.; Ushimaru, P. I.; Probst, S.; Fernandes Júnior, A. (2009) Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease* 6(6), 725-728.

BRASÍLIA: ANVISA, s.d. (2010) Apostila: Principais síndromes infecciosas: Módulo I. Disponível em: < <http://www.scribd.com/doc/4128884/Biologia-Apostila-ANVISA-Modulo-01> >. Acesso em: 14 set.2010.

Cavanagh, H. M. and Wilkinson, J. M. (2002) Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy Research* 16(4), 301-308.

Cannard, G. (1996) The effect of aromatherapy in promoting relaxation and stress reduction in a general hospital. *Complementary Therapies in Nursing and Midwifery* 2, 38-10.

Carmo, E. S.; Lima, E.O.; Souza, E. L. (2008) The potential of *origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 362-367.

Carson, C. F.; Hammer, K. A.; Riley, T. V. (2006) *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a Review of antimicrobial and on the medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews* 19(1), 50-62.

Carvalho, M. J.; Pimenta, F. C.; Hayashida, M.; Gir, E.; Silva, A. M.; Barbosa, C. P.; Canini, S. R. M. S.; Santiago, S. (2009) Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *S. aureus* in the saliva of health professionals. *Clinics* 64(4), 295-302.

Chen, W.; Viljoen, A. M. (2010) Geraniol: A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany* 76(44), 643-651.

Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS) (2005) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth Information Supplement. CLSI/NCCLS document M 100-S15. Wayne, PA.

Dulabon, L. M.; Laspina, M.; Riddell, S. W.; Kiska, D. L.; Cynamon, M. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* acute prostatitis and urosepsis after sexual relations in a hot tub. *Journal of Clinical Microbiology* 47(5), 1067-1608.

Edberg, S. C.; Rice, E.W.; Karlin, R. J.; Allen, M. J. (2000) *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Society for Applied Microbiology Symposium Series* 29, 106-116.

Franz, C. M. (2010) Essential oil research: past, present and future. *Flavour Fragrance Journal* 25, 112-113.

Fonseca, P.; Librand, A. P. L. (2008) Evaluation of physico-chemical and phytochemical characteristics of different tinctures of barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 4, 271-277.

Gershenzon, J.; Dudareva, N. (2007) The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3(7), 408-414.

Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86(6), 985-90.

Houghton, P. J.; Howes, M. -J.; Lee, C. C.; Steventon, G. (2007) Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 391-400.

Jawetz, E.; Melnick, J.; Aldelberg, E. (2005) *Microbiologia médica: um livro médico Lange*. Tradução Patrícia Lydie Volux. 22.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil.

Mendes, S. S.; Bomfim, R. R.; Jesus, H. C. R.; Alves, P. B.; Blank, A. F.; Estevam, C. S.; Antonioli, A. R.; Thomazzi, S. M. (2010) Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 129(3), 391-397.

Morris, N. (2002) The effects of lavender (*Lavendula angustifolium*) baths on psychological well-being: two exploratory randomized control trials. *Complementary Therapies in Medicine* 10, 223-228.

Okoh, O. O.; Sadimenko, A. P.; Afolayan, A. J. (2010) Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry* 120, 308-312.

Paduch, R.; Szerszeń, M. K.; Trytek, M.; Fiedurek, J. (2007) Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 55(5), 315-327.

Price, P. (1999) *Aromaterapia: para doenças comuns*. 1.ed. São Paulo: Manole.

Qiu, J.; Feng, H.; Lu, J.; Xiang, H.; Wang, D.; Dong, J.; Wang, J.; Wang, X.; Liu, J.; Deng, X. (2010) Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(17), 5846-5851.

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

Silva, S. L.; Chaar, J. S.; Figueiredo, P. M. S.; Yano, T. (2008) Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amazonica* 38(1), 107-112.

Silveira, P. F.; Bandeirani, A. M.; Arrais, P. S. D. (2008) Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 4(18), 618-626.

Wannes, W. A.; Mhamdi, B.; Sriti, J.; Jemia, M. B.; Ouchikh, O.; Hamdaoui, G.; Kchouk, M. E.; Marzou, B. (2010) Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology* 48, 1362-1370.

Wilkinson, J. M. and Cavanagh, H. M. A. (2005) Antibacterial Activity of Essential Oils from Australian Native Plants. *Phytotherapy Research* 19, 643-646.

World Health Organization (2000) National policy on traditional medicine and complementary/alternative medicine: general guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva, 24 p.

Yu, Y.; Cheng, A. S.; Wang, L.; Dunne, W. M.; Bayliss, S. J. (2007) Hot tub folliculitis or hot hand/foot syndrome caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Academy of Dermatology* 57(4), 596-600.

Capítulo III

*Escrito segundo normas da revista *Phytomedicine*

Capítulo III

Influência do uso de óleos essenciais sobre a microbiota da pele humana

Bruna Fernanda Murbach Teles Machado^a, Lidiane Nunes Barbosa^a, Isabella da Silva Probst^a, Ary Fernandes Junior^a

^aDepartamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, Brasil. Tel. 55 14 38116058

Autor correspondente: e-mail: brunatura@ibb.unesp.br

Resumo

A propriedade antimicrobiana de óleos essenciais *in vitro* tem sido investigada por serem estes produtos naturais muito utilizados nas terapias naturais, especialmente na aromaterapia, como em banhos de imersão e massagens aromáticas, o que leva a um contato direto destes produtos com a pele humana e conseqüentemente com a sua microbiota. Assim sendo, objetivamos verificar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de Cravo (*Syzygium aromaticum*), Gerânio (*Perlagonium graveolens*), Lavanda (*Lavandula angustifolia*), Palmarosa (*Cymbopogon martini*) e Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) sobre a microbiota da pele humana. Os ensaios consistiram de aplicações de preparados individuais dos óleos essenciais em óleo de semente de uva na concentração de 2% em áreas do braço e antebraço de 15 voluntários, seguido de obtenção de amostras da microbiota destas áreas utilizando placas contendo meios de cultura (MacConkey Ágar, Manitol Salt Ágar e Plate Count Ágar) pela metodologia de contato (Rodac-Plate). De acordo com os resultados obtidos, verificamos que a aplicação dos óleos essenciais na concentração de 2% não foram capazes de reduzir as contagens bacterianas pertencentes à microbiota da pele humana. Desta maneira, estes resultados caracterizaram que o uso destes produtos vegetais segundo esta finalidade não interferiu de forma significativa na microbiota da pele.

Palavras chaves: microbiota; pele; óleos essenciais; antimicrobiana; aromaterapia

Influence of the use of essential oils on human skin microbiota

Bruna Fernanda Murbach Teles Machado^a, Lidiane Nunes Barbosa^a, Isabella da Silva Probst^a, Ary Fernandes Junior^a

^aDepartamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, Brasil. Tel. 55 14 38116058

Corresponding author: e-mail: brunatura@ibb.unesp.br

Abstract

The antimicrobial property of essential oils in vitro has been investigated because they are natural products widely used in natural therapies, especially in aromatherapy, for example, during immersion baths and aromatherapy massage, which leads with a direct contact between these products and the human skin, thus with the microflora. Therefore, we verified the antimicrobial activity of essential oils of Clove (*Syzygium aromaticum*), Geranium (*Perlagonium graveolens*), Lavender (*Lavandula angustifolia*), Palmarosa (*Cymbopogon martini*) and Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) on the human skin microflora. The tests consisted of applications of individual preparations of the essential oils with grape seed oil at a concentration of 2% in areas of the arm and forearm of 15 volunteers, followed by obtaining samples of the flora of these areas using plates with culture media (MacConkey Agar Mannitol Salt Agar and Plate Count Agar) by the method of contact (Rodac-Plate). According to the results, we found that the application of essential oils at a concentration of 2% were unable to reduce bacterial counts belonging to the human skin microbiota. Thus, these results characterize the use of these plant products according to this purpose does not interfere significantly in the microflora of the skin.

Key words: microbiota; skin, essential oil, antimicrobial, aromatherapy

Introdução:

A sudorese, bem como alguns processos de higiene pessoal como a lavagem e o banho, não são capazes de eliminar a microbiota residente da pele humana (Jawetz et al. 2005). Incontáveis microrganismos fazem parte da microbiota normal do corpo humano, sendo em sua maioria bactérias, que mantêm a pele saudável. Por outro lado, os desequilíbrios nesta microbiota, como por exemplo a diminuição dos microrganismos residentes (inofensivos) e aumento no número de microrganismos transitórios (contaminantes) pode levar a quadros patológicos (Stein e Picoli 2006).

Ao albergar o agente potencialmente infectante, o organismo pode comportar-se de duas maneiras fundamentais, ou seja, de maneira sintomática onde o contaminante é revelado através de sinais e sintomas da moléstia clinicamente diagnosticáveis e outra assintomática, genericamente conhecido como portador, quando no momento do exame não é percebida a sintomatologia, apesar de estar colonizado (Santos 2000, Gao et al. 2010).

A distinção entre o que consideramos ser um agente inofensivo ou um patogênico da microbiota reside na capacidade da pele em resistir à infecção e não apenas nas propriedades inerentes ao microorganismo. A defesa cutânea ocorre através da ação combinada de uma variedade de sistemas complementares que incluem barreiras físicas, um ambiente hostil aos microrganismos, especialmente quanto ao pH na superfície, e a síntese ativa de moléculas de defesa como por exemplo os peptídeos antimicrobianos, proteases, lisozimas, citocinas e quimiocinas que servem como ativadores da resposta celular e imune adaptativa. Os fatores de virulência expressos por um microorganismo podem inibir a ação do sistema de defesa do hospedeiro, mas em última análise é a efetividade da soma destas respostas de acolhimento que determinam se um microorganismo é um organismo comensal ou um agente patogênico perigoso para o indivíduo (Cogen et al. 2008).

A pele é a principal interface entre o hospedeiro e os microrganismos ambientais, assim uma resposta imune a esses diversos microrganismos ambientais, além de outros riscos possíveis, é fundamental para a sobrevivência dos seres vivos, mas controlar a extensão e a duração da resposta é igualmente importante para a saúde. Estudos recentes revelaram que bactérias comensais da pele desempenham um papel importante no equilíbrio da resposta do sistema imunológico, pois parece agir

beneficiando o tecido que fornece um nicho para o seu crescimento. Portanto, é importante reconhecer que comensais da pele participam de sua proteção e fornecem elementos essenciais que nos protegem de possíveis infecções e inflamações descontroladas (Lai e Gallo 2010).

A microbiota residente na pele inclui bactérias, vírus e muitos tipos de fungos (Cogen et al. 2008). Na microbiota normal da pele há um conjunto de organismos que compõem a maior parte desta microbiota, mas diferentes taxas compreendem o equilíbrio da população e diferem significativamente entre os indivíduos e entre as épocas de amostragem; especificamente a microbiota encontrada no antebraço, pode diferir substancialmente entre os indivíduos, apesar disso quatro gêneros foram significativamente mais freqüentes, *Propionibacteria*, *Corynebacteria*, *Staphylococcus* e *Acinetobacter* (Gao et al. 2007).

Estudos com biologia molecular utilizando marcadores moleculares baseado no 16S rRNA além de sondas gênero específicas para *Propionibacteria*, *Corynebacteria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e para *Malassezia*, reportaram que quatro gêneros de bactérias foram responsáveis por 31% a 59% do total de bactérias, sendo que estes percentuais foram sempre maiores na axila e os mais baixos no antebraço. O gênero *Streptococcus* foi o mais freqüentemente verificado na testa e atrás da orelha. *Corynebacterium* spp. foi predominante na axila. Estes resultados fornecem a primeira quantificação do local e as especificidades de acolhimento de grandes populações de bactérias e fungos na pele (Gao et al. 2010).

Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis e complexos caracterizados por um forte odor sendo sintetizados por plantas aromáticas durante o metabolismo secundário (Bakkali et al. 2008).

Schmitt et al. (2010) mencionam que os óleos essenciais são amplamente utilizados associados com óleos vegetais durante os procedimentos da aromaterapia, como por exemplo massagens, e reportaram que há maior permeabilidade dos componentes através da pele humana quando utilizados no seu estado natural como óleo essencial bruto do que quando utilizados na forma de compostos isolados, sugerindo uma interação cooperativa entre os componentes dos óleos no que se diz respeito a sua permeabilidade.

Aromaterapia é uma prática terapêutica que se utiliza de óleos essenciais para a promoção e manutenção da saúde e ao que parece age através do sistema límbico,

especialmente sobre a amígdala e o hipocampo (Cavanagh e Wilkinson 2002), mostrando assim os seus efeitos sobre os estados emocionais e mentais nos indivíduos (Cannard 2006).

Componentes de óleos essenciais podem entrar na corrente sanguínea, passar a barreira hematoencefálica e chegar ao sistema nervoso central através de várias vias, sendo alguns exemplos a inalação (Bagetta et al. 2010), a aplicação dérmica (Brooker et al. 1997), injeções subcutâneas ou por vias intraperitoneais e administração oral (Orafidiya et al. 2005).

A utilização de óleos essenciais na pele é um procedimento muito utilizado nas terapias naturais como em massagens e banhos aromáticos bem como os seus componentes isolados são utilizados pela indústria farmacêutica e alimentícia (Schmitt et al. 2010). Diariamente estes compostos entram em contato com nossa pele e a manutenção de uma microbiota equilibrada permite que esta barreira natural permaneça isenta de infecções.

Além disto, a aromaterapia pode ser utilizada visando os efeitos antimicrobianos, antivirais e antiinflamatórios dos derivados vegetais utilizados (Bakkali et al. 2008), sendo que as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais são consideradas de grande interesse para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas desde que o uso de aditivos naturais ganhou importância como tendência na substituição de conservantes sintéticos artificiais (Okoh et al. 2010).

Jäger et al. (1992) relataram que o óleo de lavanda pode ser utilizado em inalações e banhos nos casos de tensão nervosa, reumatismo e para diversas doenças da pele como eczemas e dermatites. Este óleo essencial é utilizado também na aromaterapia como relaxante geral, bem como conhecido por suas propriedades carminativas e um sedativo natural utilizado via inalatória (Lis-Balchin e Hart 1999) e quando utilizado em banho quente demonstrou potencial terapêutico na melhora do humor, diminuindo tensões e o pessimismo em relação ao futuro (Morris 2002).

Um único óleo pode ser utilizado em variadas modalidades para diferentes finalidades como é o caso do gerânio, que conforme relatado por Jalali-Heravi et al. (2006) tem sido utilizado para tratamento de problemas da pele, respiratórios e hormonais.

A absorção percutânea do óleo essencial de lavanda foi verificada em ensaios com seres humanos através de massagem (aplicação na pele) a partir de preparados a

base de óleo vegetal de amendoim acrescido de 2% do óleo essencial de lavanda (Jäger et al. 1992). Relatam os autores que após cinco minutos da massagem, traços de linalol e de linalil acetato, que são os componentes majoritários do óleo de lavanda, puderam ser detectados no sangue, sendo que após vinte minutos foram percebidas as concentrações máximas destes constituintes no plasma, ou seja, 100 ng/ml de linalil acetato e 121 ng/ml de linalol. Verificou-se também que após noventa minutos de experimentação, a maioria dos constituintes do óleo de lavanda havia sido eliminada da corrente sanguínea. Concluíram os autores que os efeitos sedativos e relaxantes do óleo essencial de lavanda após uma massagem podem ocorrer por dois diferentes meios de incorporação, sendo tanto pela inalação das moléculas aromáticas como também pela penetração através da pele (Jäger et al. 1992).

O uso de óleos essenciais em dermatologia está se desenvolvendo rapidamente em todo o mundo e o potencial da aromaterapia nesta área reside na capacidade da maioria dos óleos essenciais apresentarem propriedades anti-infecciosas devido aos compostos alcoólicos dos óleos, pois é o nível e o equilíbrio entre os componentes de cada óleo que ajuda a determinar a extensão das suas propriedades terapêuticas individuais; a aromaterapia não é capaz somente de oferecer auxílio aos sintomas físicos, mas também com a melhora da qualidade de vida, auto-estima e bem-estar geral para os portadores de afecções cutâneas crônicas (Stevensen 1998).

Desta forma estudar a ação dos óleos essenciais sobre a microbiota da pele humana pode proporcionar respaldo científico e maior segurança para os que os utilizam. Com isto, objetivamos verificar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de Cravo (*Syzygium aromaticum*), Gerânio (*Perlagonium graveolens*), Lavanda (*Lavandula angustifolia*), Palmarosa (*Cymbopogon martini*) e Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) sobre a contagem de bactérias pertencentes a microbiota da pele humana através da contagem total, bactérias Gram negativas e *Staphylococcus* sp.

Materiais e Métodos

Óleos Essenciais

Os óleos essenciais foram selecionados para este estudo em função da utilização nas várias terapias naturais bem com pela disponibilidade dos mesmos na forma comercializada por empresas do setor. Desta forma, foram obtidas amostras dos óleos essenciais de Cravo (*Syzygium aromaticum*), Gerânio (*Perlagonium graveolens*), Lavanda (*Lavandula angustifolia*), Palmarosa (*Cymbopogon martini*) e Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) diretamente da empresa *By Samia Aromaterapia* (São Paulo-SP, Brasil) em frascos de vidro âmbar com capacidade para 10 mL na forma comercializada pela referida empresa e mantidos em temperatura ambiente. Segundo informações da empresa, os óleos foram produzidos com uso da metodologia do arraste pelo vapor na origem. Para cada óleo estudado foram determinados os valores de densidade, adaptada metodologia de Fonseca e Librand (2008), em tubos tipo *ependorfs*, sendo estes pesados (P_1) em balança analítica e depois foi adicionado 1 mL (V) do óleo sendo pesado novamente (P_2). A densidade (D) foi calculada utilizando fórmula abaixo.

$$D = \frac{P_2 - P_1}{V} = \frac{mg}{mL}$$

Análise dos óleos essenciais

A análise química foi realizada no Departamento de Química e Bioquímica no campus da UNESP-Botucatu-SP, através de espectrômetro de massas acoplado a cromatógrafo gasoso (GCMS), da marca SHIMAZU, modelo QP5050A, utilizando coluna capilar, CBP-5, de 50m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25mm e 0,25 μ m de espessura do filme. A temperatura do injetor foi de 250°C, a temperatura da interface de 250°C, detector operado em modo EI a 70eV e utilizou-se He como gás de arraste.

Ensaio para verificação de efeitos dos óleos essenciais sobre microbiota da pele de humanos

Para verificação dos efeitos antimicrobianos dos óleos sobre a microbiota da pele foram realizados ensaios com participação de 15 voluntários, de ambos os sexos, que assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1) sobre a pesquisa e foram informados sobre a mesma de acordo com exigência do Comitê de Ética na Pesquisa da FMB, UNESP, Botucatu, processo número 3163-2009.

Os procedimentos foram agendados previamente com os voluntários e no momento das coletas foram delimitadas áreas de aproximadamente 16 cm² de pele em regiões do braço e antebraço dos voluntários. Nestas áreas foram realizadas coletas inicialmente para controle normal da microbiota, ou seja, sem aplicação de qualquer produto, e nas demais áreas foram feitas coletas tendo sido aplicado previamente tanto o diluente dos óleos essenciais, no caso o óleo vegetal de semente de uva, obtido junto a empresa *By Samia Aromaterapia* (São Paulo-SP, Brasil), como também este mesmo óleo contendo isoladamente os respectivos óleos na concentração de 2%. Para aplicação, tanto do óleo vegetal como as misturas óleo vegetal e óleos essenciais, foram utilizadas alças calibradas descartáveis e estéreis de 10µL. Após o tempo de 10 minutos para contato entre os produtos aplicados a pele e microbiota residente, a coleta das bactérias da pele foi realizada com o uso de placas de contato ou Rodac-Plate (*Replicate Organisms Direct Agar Plates* - RODAC) que segundo Andrade et al.(2000) têm sido recomendadas em estudos para quantificar a contaminação microbiana de superfícies, como chão, parede, mesa, cama e pele humana. O método de aplicação é simples, rápido e ideal para mensurar a contaminação de grandes áreas onde muitas amostras são necessárias para validação estatística (Hall e Harnett 1964). Foram utilizados tanto para os ensaios controles como tratamentos, placas contendo meio de MacConkey Ágar (para bactérias Gram negativas), Manitol Salt Ágar (para *Staphylococcus* sp) e Plate Count Ágar (meio não seletivo para contagem total), visando separação por grupos os membros da microbiota da pele. As placas de contato foram pressionadas sobre a pele por um período de 15 segundos na área escolhida para coleta.

Todas as coletas foram realizadas em laboratório preparado para tal finalidade no Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB/UNESP- Botucatu-SP. Após coletas, as placas foram incubadas em estufa a 35°C/24 horas, sendo que após este

período de incubação foram realizadas contagens das colônias, utilizando o contador de colônias, marca Phoenix, modelo CP-600, para obtenção dos valores de UFC/cm² (Unidades Formadoras de Colônias). Com a finalidade de verificar a esterilidade do óleo de semente de uva, foram feitas semeaduras de amostras deste óleo a partir do frasco-embalagem fornecido pela empresa By Samia Aromaterapia em placas contendo os meios de cultura Plate Count Agar (PCA) e Agar Sangue e incubadas a 35°C/24 horas. Após este período foram realizadas leituras para visualização de formação de colônias.

Análise estatística

Utilizamos o teste de Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks para confrontar os tratamentos com os óleos essenciais e controle para cada voluntário.

Resultados e Discussão

Considerando a presença de microbiota natural na pele humana e sendo os óleos essenciais produtos terapêuticos utilizados na aromaterapia e em procedimentos combinados com a massoterapia, serão apresentados a seguir os resultados obtidos com a utilização de preparado a base de óleo vegetal de semente de uva adicionado de 2% de cada um dos óleos essenciais testados.

Inúmeros estudos mostraram que a composição química dos óleos essenciais são passíveis de variações em função de características climáticas distintas bem como condições de coleta das plantas e método de extração (Gobbo Neto e Lopes 2008). Assim, a análise química e a densidade estão apresentadas na Tabela 1. Verifica-se que o óleo de cravo da índia foi o que apresentou maior densidade, ao redor de 1mg/ml, o que corresponde ao valor verificado por Santos (2010). Tal valor é esperado, considerando que este óleo quando obtido por destilação pelo arraste com vapor d' água acumula-se no fundo do frasco para separação do óleo e o hidrolato. Embora não tenha sido possível medir a produtividade do óleo essencial a partir da matéria prima do cravo da índia, Rodrigues et al. (2009), relatam que foi possível uma produtividade ao redor de 0,5 %, enquanto Guan et al. (2007) relataram a produtividade ao redor de 10% pela metodologia da destilação pelo arraste com vapor d' água.

Tabela 1. Densidade e Componentes químicos dos óleos essenciais segundo metodologia de GC-MS.

Óleo essencial	Nome Popular	Densidade (mg/mL)	Nome dos Compostos (%)
<i>Syzygium aromaticum</i>	Cravo	988	eugenol (83,63); ceta-cariofileno (12,39); alfa-humuleno (3,05); eugenol acetato (0,93)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Tea Tree	858	1-terpinen-4-ol (53,40); p-cimeno (8,09); gama-terpineno (5,34); 1,8 cineol (3,18); alfa-pineno (1,40); terpinoleno (1,05); limoneno (0,70)
<i>Cymbopogon martini</i>	Palmarosa	874	geraniol (57,49); acetato de geranila (13,56); linalol (1,71); beta-cariofileno (1,07); ocimeno (0,27)
<i>Lavandula angustifolia</i>	Lavanda	853	1,8 cineol (45,97); p-cimeno (4,19); 1-terpinen-4-ol (2,30); alfa-pineno (1,48); limoneno (1,46); gama-terpineno (1,17); terpinoleno (1,04)
<i>Pelargonium graveolens</i>	Gerânio	848	citronelol (31,58); geraniol (25,47); feriato de citronelita (12,74); feriato de geranila (6,71); linalol (6,33); isomenthone (4,35); rose oxide (0,89); acetato de citronelita (0,48)

As contagens obtidas para unidades formadoras de colônia (UFC) para amostras coletadas da pele dos voluntários estão apresentadas na Tabela 2 através de UFC/cm² de pele frente aos tratamentos com os óleos essenciais, controle da microbiota sem tratamento e controle do óleo vegetal.

Tabela 2. Valores de UFC/cm² para contagem bacteriana da microbiota da pele de braço e antebraço após aplicação de misturas de cada óleo essencial com o óleo de semente de uva e controles sem aplicação dos produtos vegetais e com aplicação do óleo de semente de uva.

Voluntários	Meio de cultura	Controle	Óleo vegetal Semente de Uva	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	<i>Cymbopogon martini</i>	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Melaleuca alternifolia</i>
1	PCA	11	56	36	18	21	21	7
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	13	11	6	3	3	3	2
2	PCA	50	56	60	80	69	50	30
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	2	6	6	17	60	20	1
3	PCA	15	30	11	11	4	21	10
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	47	10	14	11	4	3	10
4	PCA	1	3	3	3	2	3	2
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	1	1	0	3	1	1	1
5	PCA	2	2	1	8	12	1	1
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	1	0	0	7	6	3	3
6	PCA	3	5	4	5	16	2	11
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	3	0	0	1	0	0	0
7	PCA	1	1	0	0	1	1	1
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	0	0	0	0	1	0	0
8	PCA	3	4	1	2	2	3	3
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	2	1	1	2	4	1	1

Voluntários	Meio de cultura	Controle	Óleo vegetal Semente de Uva	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	<i>Cymbopogon martini</i>	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Melaleuca alternifolia</i>
9	PCA	4	3	1	1	2	0	4
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	4	2	0	1	1	1	2
10	PCA	1	1	2	0	3	2	2
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	1	1	4	1	2	0	1
11	PCA	1	2	2	2	6	3	3
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	1	1	2	4	1	3	3
12	PCA	2	1	1	1	3	3	3
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	1	1	1	0	0	0	0
13	PCA	2	2	1	1	1	1	1
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	2	1	1	1	1	1	1
14	PCA	1	1	3	2	2	1	2
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	1	1	3	2	1	1	2
15	PCA	1	1	0	1	1	1	1
	MACCONKEY	0	0	0	0	0	0	0
	MANITOL	1	0	1	0	1	0	1

Apesar dos relatos sobre a ação efetiva antimicrobiana dos óleos essenciais utilizados neste estudo (Hammer et al. 1996) e de compostos isolados destes óleos (Qiu et al. 2010), não houve diferença estatística entre os tratamentos e os controles para $p < 0,05$ para cada voluntário nestes experimentos. O valor máximo encontrado nas

contagens totais em PCA foi de 80 UFC/cm², enquanto que para todos os voluntários não foram verificadas contagens nas placas de MacConkey, cujo objetivo era quantificar a população de bactérias Gram negativas. Nas placas contendo Manitol ágar as contagens variaram entre 0 e 60 UFC/cm².

Percebe-se que, especialmente para os 3 primeiros voluntários, houve um aumento, embora não significativo, para as contagens obtidas nos ensaios controles da microbiota sem aplicação dos produtos vegetais e com aplicação do óleo vegetal de semente de uva. Desta forma, é possível mencionar a possibilidade, que por ter sido obtido amostras em áreas diferentes na pele do braço de cada voluntário, tal variação pode ter ocorrido de forma arbitrária, sendo esta uma variação normal na contagem. Gao et al. (2007) afirma que a contagem bacteriana entre indivíduos diferem substancialmente. Tal afirmação pode ser reforçada pelo fato que não foram verificadas formação de colônias quando foram feitas sementeiras com amostra do óleo de uva em placas de Plate Count Ágar (PCA) e Ágar Sangue e incubação a 35°C/24 horas visando verificar a esterilidade deste óleo.

Embora sejam poucos os relatos de pesquisas clínicas sobre o efeitos de óleos essenciais e sua utilização na aromaterapia, a maioria dos ensaios clínicos controlados de óleos essenciais investigou os efeitos antimicrobianos da *Melaleuca alternifolia* (tea tree) em preparações de óleo aplicados topicamente em condições patológicas como a acne (Barnes 2003). Assim sendo, são importantes os estudos para verificação da ação destes produtos naturais na microbiota de uma pele saudável ou assintomática.

Segundo Hammer et al. (1996) existe um potencial para o óleo essencial de tea tree ser utilizado em desinfecção higiênica uma vez que atualmente é incorporado em um grande número de produtos hidratantes revelando um outro benefício dos produtos naturais. Além disto, a capacidade deste óleo para penetrar nas camadas externas da pele pode aumentar a sua atividade antimicrobiana sobre a microbiota transitória por meio de um efeito residual que não foi observado neste estudo.

Observamos que a pele dos voluntários apresentava uma aparência saudável, sem feridas, inflamações ou infecções aparentes. Hammer et al.(1996) sugerem que o óleo essencial de tea tree pode ser útil na remoção da microbiota transitória da pele enquanto a residente é mantida. Assim, esta informação pode esclarecer em partes a ausência de significância entre os resultados obtidos com controle e tratamentos com os

óleos essenciais utilizados, pois as amostras poderiam conter apenas cepas da microbiota residente.

As complexas interações entre microrganismos que existem na superfície da pele humana mostram que a microbiota tem um papel benéfico, muito parecido com o da microflora intestinal. Um excesso de antibióticos pode perturbar o delicado equilíbrio da microbiota cutânea deixando a pele susceptível a patógenos anteriormente mantidos na microbiota residente para proteção imunológica do hospedeiro (Cogen et al. 2008).

Os resultados demonstram que apesar dos óleos essenciais apresentarem ação antimicrobiana, a aplicação destes produtos naturais diluídos em óleos vegetais da maneira como é utilizado em procedimentos da aromaterapia parece não interferir na integridade da microbiota residente da pele, sendo este fato importante para a segurança do uso de óleos essenciais sobre a pele com manutenção da sua proteção natural.

Desta maneira, consideramos que este estudo tem um caráter preliminar e há necessidade do aprofundamento quanto ao número de voluntários, bem como os meios de culturas utilizados e forma de aplicação dos derivados vegetais sobre a pele dos voluntários. Foi possível concluir que a aplicação destes derivados vegetais não mostrou o potencial antimicrobiano sobre a microbiota da pele dos voluntários ou mesmo que o veículo diluente para os óleos essenciais protegeu a microbiota contra a ação inibidora dos óleos essenciais. Além disso, observamos que a microbiota, possivelmente a residente e saudável, foi mantida com o uso dos óleos essenciais na forma utilizada nestes experimentos.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a empresa By Samia Aromaterapia pela doação dos produtos vegetais utilizados na pesquisa. Agradecem também os professores doutores Luciano Barbosa pelas análises estatísticas e Julio Doyama Toshimi pela análise cromatográfica dos óleos essenciais.

Referências:

Andrade, D., Angerami, E.L.S, Padovani, C.R., 2000. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. Rev Saude Publica 34, 163-169.

Bagetta, G., Morrone, L.A., Rombolà, L., Amantea, D., Russo, R., Berliocchi, L., Sakurada, S., Sakurada, T., Rotiroti, D., Corasaniti, M.T., 2010. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. Fitoterapia 1-9.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food Chem. Toxicol. 46, 446–475.

Barnes, J., 2003. Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part II: Efficacy and safety. Br J Clin Pharmacol. 55, 331–340.

Brooker, D.J., Snape, M., Johnson, E., Ward, D., Payne, M., 1997. Single case evaluation of the effects of aromatherapy and massage on disturbed behaviour in severe dementia. Braz J Clin Psychol 236, 187-96.

Cannard, G., 1996. The effect of aromatherapy in promoting relaxation and stress education in a general hospital. Complement Ther Nurs Midwifery 2, 38-10.

Cavanagh, H.M. and Wilkinson, J.M., 2002. Biological activities of lavender essential oil. Phytother Res 16, 301-308.

Cogen, A.L., Nizet, V., Gallo, R.L., 2008. Skin microbiota: a source of disease or defence? Br. J. Dermatol. 158, 442–455.

Fonseca, P., Librand, A.P.L., 2008. Evaluation of physico-chemical and phytochemical characteristics of different tinctures of barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). Braz J Pharm Sci 4, 271-277.

Gao, Z., Guillermo, I., Perez-Perez, G., Yu Chen, Y., Blaser, M.J., 2010. Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. *J. Clin. Microbiol.*, 48, 575-3581.

Gobbo-Neto, L. and Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* 30, 374-381.

Guan, W., Shufen Li, S., Yan, R., Tang, S., Quan, C., 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chem* 101, 1558-1564.

Hall, L.B. and Harnett, M.J., 1964. Measurement of the bacterial contamination on surfaces in hospitals. *Public Health Rep Wash.* 79, 1021-1024.

Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1996. Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Am J Infect Control.* 24, 186-189.

Hemaiswarya, S.; Kruthiventi, A.K.; Doble, M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 15, 639-652.

Jäger, W.; Buchbauerl, G., Jirovetz, L., Fritzer, M., 1992. Percutaneous absorption of lavender oil from a massage oil. *J Soc Cosmet Chem* 43, 49-54.

Jalali-Heravi, M., Zekavat, B., Sereshti, H., 2006. Characterization of essential oil components of Iranian *geranium oil* using gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometric resolution techniques. *J Chromatogr A* 1114, 154-163.

Jawetz, E., Melnick, J., Aldelberg, E., 2005. *Microbiologia médica: um livro médico Lange*. Tradução Patrícia Lydie Volux. 22.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil.

Lai, Y. and Gallo, R.L., 2010. Commensal skin bacteria as the probiotic of the cutaneous immune response. *Expert Rev Dermatol.* 5, 251–253.

Lis-Balchin, M., Deans, S.G., 1997. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 82, 759-762.

Morris, N., 2002. The effects of lavender (*Lavendula angustifolium*) baths on psychological well-being: two exploratory randomized control trials. *Complement Ther Med* 10, 223-228.

Okoh, O.O., Sadimenko, A.P., Afolayan, A.J., 2010. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chem* 120 308-312.

Orafidiya, L.O., Agbani, E.O., Iwalewa, E.O., Adelusola, K. A., Oyedapo, O.O., 2004. Studies on the acute and sub-chronic toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. leaf. *Phytomedicine* 11, 1-76.

Qiu, J., Feng, H., Lu, J., Xiang, H., Wang, D., Dong, J., Wang, J., Wang, X., Liu, J., Deng, X., 2010. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ. Microbiol.* 76, 5846-5851.

Rodrigues, T.G., Fernandes Jr, Ar., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Sforcin, J.M., 2009. In vitro and in vivo effects of clove on pro-inflammatory cytokines production by Macrophages. *Nat. Prod. Res.* 23, 319–326.

Santos, A.L., 2010. Preparação e caracterização de uma mistura eutética baseado em um derivado de óleo essencial extraído do *Syzygium aromaticum* L. Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos. Obtenção de título em doutor em Ciências (Química Analítica), 134 p.


Santos, B.M. de O., 2000. Monitoramento da colonização pelo *Staphylococcus aureus* em alunos de um curso de auxiliar de enfermagem durante a formação profissional. Rev Lat Am Enfermagem 8, 67-73.

Schimitt, S., Schaefer, U., Sporer, F., Reichling, J., 2010. Comparative study on the in vitro human skin permeation of monoterpenes and phenylpropanoids applied in rose oil and in form of neat single compounds. Pharmazie, 65, 102-105.


Stein, S. and Picoli, S. U., 2006. Avaliação do nível de contaminação da pele após assepsia para coleta sanguínea. NewsLab, ed. 78, p. 92-98.

Stevensen, C. J., 1998. Aromatherapy in dermatology. Clin Dermatol 16, 689-694.

Apêndice 1

unesp  **Universidade Estadual Paulista**
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Ética © Unesp/Imunologia

Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 04 de maio de 2.009 OF. 137/2009-CEP

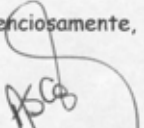
Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Ary Fernandes Júnior
Departamento de Micro/Imuno do
Instituto de Biociências de Botucatu.

Prezado Prof. Ary Fernandes,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto:
(Protocolo CEP 3163-2009) - "Óleos essenciais: Verificação da ação antimicrobiana in vitro, na água e sobre a microbiota da pele humana", a ser conduzido por Bruna Fernanda M. T. Machado, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 04-05-2009.

Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,



Alberto Santos Capellupi
Secretário do CEP.

Apêndice 2**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Prezado Voluntário:**

Convidamos o voluntário(a) Sr.(a) _____, portador do RG _____ a participar da pesquisa do projeto de mestrado intitulado Óleos Essenciais: verificação da ação antimicrobiana *in vitro*, na água e sobre a microbiota da pele humana, uma vez que este tem a liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem penalização. Durante a pesquisa, será necessário que o voluntário compareça três vezes ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu, com o intervalo de uma semana. Serão coletadas do braço e antebraço amostras com placas de contato na superfície da pele, antes e após aplicação de creme com cinco diferentes óleos essenciais, que são produtos naturais de plantas medicinais. Os cremes serão aplicados com espátula descartável. Serão oferecidas folhas de papel descartável, caso queira retirar o excesso de creme da pele e local para higienização das mãos com sabonete. Importante informar que o procedimento não oferece risco à saúde. É garantido sigilo e privacidade.

Voluntário

Pesquisador

Mestranda: Bruna Fernanda Murbach Teles Machado. End. Av. Camilo Mazoni 1055 apto. B14.Jd Paraíso. Botucatu. Tel: 14 3882 23-46. e-mail: brunatura@hotmail.com
Orientador: Prof. Dr. Ary Fernandes Junior. Rua Emilio Cani, 520. Vila Assunção. Botucatu. Tel. 14 38822108. e-mail: ary@ibb.unesp.br

Apêndice 3- Water Research Submission

Elsevier Editorial System(tm) for Water Research

Manuscript Draft

Manuscript Number: WR16558

Title: Antimicrobial activity of essential oils used in aromatherapy diluted in water and saline solution to simulate an immersion bath

Article Type: Research Paper

Keywords: essential oils, water, antimicrobial activity, aromatherapy.

Corresponding Author: Dr. Ary Fernandes Junior, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Universidade Estadual paulista/Instituto de Biociências

First Author: Bruna Fernanda Murbach T Machado, student

Order of Authors: Bruna Fernanda Murbach T Machado, student; Isabella S Probst, student; Lidiane N Barbosa, student; Julio T Doyama, ph.D; Ary Fernandes Junior, Ph.D

Antimicrobial activity of essential oils used in aromatherapy diluted in water and saline solution to simulate an immersion bath

Bruna Fernanda Murbach Teles Machado^{a*}, Isabella da Silva Probst^a, Lidiane Nunes Barbosa^a, Julio Toshimi Doyama^b, Ary Fernandes Junior^a

^aDepartamento de Microbiologia e Imunologia, ^bDepartamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, campus de Botucatu, SP, Brazil, CEP 18618-970 Tel 55 14 38116058

Corresponding author: E.mail: ary@ibb.unesp.br

Abstract

Essential oils are mixtures of active compounds from the secondary metabolism of plants and consisting especially of terpenes, which are compounds with numerous biological properties. They are widely used in industry and also in procedures in aromatherapy. Aromatherapy is a natural therapy that uses the therapeutic properties of essential oils for human health. Inhalation, immersion baths and massages are the main procedures. In the bath, microorganisms can survive which may have a negative impact on the health of people. We aimed to analyse the antimicrobial activity of essential oils diluted in water and saline in order to reduce the count of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* when the essential oils of Clove (*Syzygium aromaticum*), Geranium (*Pelargonium graveolens*), Lavender (*Lavandula angustifolia*), Palmarosa (*Cymbopogon martini*) and Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) were added. We performed control assays without essential oils and treatment assays with 0.5% v/v of each of the oils. The bacterial count method was performed by plating, which demonstrated an initial count around of 10⁵ CFU/mL. According to the results of both tests using water and saline, we observed that the sensitivity of bacterial strains to essential oils were similar but significantly different when compared to control assays. The essential oils showed antimicrobial activity against all three bacteria, and the Gram negative strains were more susceptible than the Gram positive bacteria. This study established the possibility of microbial control in water immersion baths when essential oils are added, which is a positive aspect for this aromatherapy procedure.

Keywords: essential oils, water, antimicrobial activity, aromatherapy.

1. Introduction

Living organisms produce thousands of different organic compounds of low molecular weight, many of which have no apparent function in basic processes like growth and development and therefore have historically been designated as natural products or secondary metabolites. The importance of natural products in medicine, agriculture and industry has stimulated studies on the biosynthesis and biological activities of these substances (Gershenzon and Dudareva, 2007).

Essential oils are volatile and complex natural compounds characterised by a strong odour and are synthesised by aromatic plants during secondary metabolism. They are usually extracted from plants from climates like the Mediterranean and the tropics, where they are considered an important part of the traditional pharmacopeia (Bakkali et al., 2008).

After the recent discovery and elucidation of hundreds components of essential oils, the complexity and the enormous diversity that exists in this group of natural products was understood. These compounds usually consist of mono (C_{10}) and sesquiterpenes (C_{15}), phenylpropenes and other volatile components (Franz, 2010). The terpenes are substances found in plants and animals, and have been described as having considerable diversity of biological properties (Paduch et al., 2007). The monoterpenes are important constituents of essential oils, are highly volatile and, consequently, are easily carried away by water vapour free of other components, so they are often used for their strong organoleptic properties (Bandoni and Czepak, 2008).

Considering that the terpenes are the largest class of natural products, these compounds play a variety of roles in antagonistic interactions and beneficial interactions between organisms and the environment. They protect plants, animals and microorganisms against predators, pathogens and competitors, and are involved in transmitting messages for the presence of food, mates and enemies. Despite the diversity of known terpenes, it is striking how phylogenetically distant organisms have used similar structures (Gershenzon and Dudareva, 2007)

Essential oils have different biological properties, such as larvicidal (Rajkumar et al., 2010), antioxidant (Wannes et al., 2010), analgesic and anti-inflammatory (Mendes et al., 2010), fungicidal (Carmo et al., 2008), antitumour (Smith, 2008) and antimicrobial (Bakkali et al., 2008, Barbosa et al., 2009) activities. As for the

antimicrobial properties of essential oils, they have effects on fungi and bacteria. Gram-positive bacteria are usually more susceptible than Gram negative bacteria and require lower concentrations to achieve the minimum inhibitory concentration (MIC) which inhibits the growth of these organisms (Hammer, 1999).

There are frequent reports on the mechanisms of the antimicrobial action of these oils, and some cases have been partly elucidated. For example, tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia*) causes lysis and loss of membrane integrity due to the output ions and inhibition of cell respiration (Carson et al., 2006).

In general, antimicrobial activity is considered to be of great interest to the food, pharmaceutical and cosmetic industries since the use of natural additives has gained importance as a trend in the replacement of artificial synthetic preservatives (Okoh et al., 2010). Most essential oil production is used by the pharmaceutical, food and cosmetics industries and a small part of production is used in aromatherapy (Price, 1999). This increased application and the consequent increase in demand for natural product worldwide is the result of problems that have been attributed to many synthetic products on human health and the environment (Bandoni and Czepak, 2008).

There has been a significant increase in interest for natural therapies in recent decades (Silveira et al., 2008). These therapies have expanded globally and increased in popularity in developed countries and also where conventional medicine is predominant in the public health system (WHO, 2000).

In aromatherapy procedures, essential oils are used to promote and maintain health and appear to act through the limbic system, especially the amygdala and hippocampus (Cavanagh and Wilkinson, 2002). Thus, aromatherapy can be used not only because of the antimicrobial, antiviral and anti-inflammatory effects of essential oils (Bakkali et al., 2008) but also due to its effects on the mental and emotional states of individuals (Cannard, 2006).

Inhalation, dermal application and bathing are the main methods of application so that the essential oil is absorbed by the body during procedures in aromatherapy. To relieve stress and anxiety, lavender is one of the most widely used essential oils in bath water. The preparation of this therapy is performed using small amounts of the essential oil, such as eight drops of oil into a bathtub (Price, 1999).

Moreover, tubs and hot tub have been mentioned as potential locales for the acquisition of *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in several diseases such as urosepsis and folliculitis (Dulabon et al., 2009; Yu et al., 2007).

Pseudomonas aeruginosa is a bacterium which is widely distributed in soil and water and produces water-soluble pigments. It is a hospital pathogen that develops in humid areas such as sinks, bathtubs and showers, with the best growth temperature between 37°C and 42°C. Resistant bacteria should not be treated with monotherapy (Jawetz et al., 2005).

According to the Surveillance Agency (ANVISA, 2010), the presence of *E. coli* or faecal (stool) or thermotolerant coliforms, enterococci, *P. aeruginosa* and/or sulphite reducing clostridia cannot be detected in mineral water in excess of 2 CFU/mL. *S. aureus* is one of the main agents responsible for infections (Carvalho et al., 2009), is often found in the skin (Jawetz et al., 2005) and therefore is capable of contaminating water and food through handling.

Therefore, we analysed the antimicrobial activity of essential oils diluted in water to obtain information for the control and disinfection in this medium and in humid places like baths and hot tubs, as well as to elucidate the antimicrobial property of essential oils in water. As this may help with studies for the creation of new therapeutic modalities and provide a best practice in aromatherapy, so we aimed to verify the antimicrobial action of essential oils of Clove (*Syzygium aromaticum*), Geranium (*Pelargonium graveolens*), Lavender (*Lavandula angustifolia*), Palmarosa (*Cymbopogon martini*) and Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) on standard ATCC strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* by contact when placed in an immersion bath. We aimed to determine the minimum inhibitory concentration 90% (MIC 90%) of the five essential oils on the different bacterial strains species under study and to compare the survival profile of these bacteria when subjected to the action of essential oils in a medium of distilled water and saline.

3. Material and methods

3.1 Essential Oils

The essential oils were selected for this study based on their use in various natural therapies and with the availability of such as marketed by companies. Thus, samples of the essential oils of Clove (*Syzygium aromaticum*), Geranium (*Pelargonium graveolens*), Lavender (*Lavandula angustifolia*), Palmarosa (*Cymbopogon martini*) and Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) were obtained directly from the company By Samia Aromatherapy (São Paulo, SP, Brazil) in glass bottles with a capacity of 10 mL and kept at room temperature. These oils were produced using a methodology of drag by steam rise, and density values from each studied oil were performed using methodology recommended by Fonseca and Librandi (2008) in Eppendorf tubes which were weighed (P1) on an analytical balance and then weighed again (P2) after the addition of 1 mL (V) of oil. The density (D) was calculated using the formula below.

$$D = \frac{P_2 - P_1}{V} = \frac{mg}{mL}$$

6.2. Susceptibility assays by the agar dilution method and determination of minimal inhibitory concentration (MIC)

6.2.1. Bacterial strains

Nine strains of *Escherichia coli*, 10 *Staphylococcus aureus* and 10 *Pseudomonas aeruginosa* were all isolated from human specimens and one standard bacterial strain from the American Type Culture Collection (ATCC) of each species *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) were used. These strains were kept at -80°C at the Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute of UNESP, Botucatu-SP. The project was authorised by the experimentation ethics committee of the Faculty of Medicine of Botucatu/UNESP (CEP protocol number 3163-2009) for the use of strains isolated from human clinical cases which received assent on May 4, 2009.

Prior to use, the strains were plated on blood agar to check viability and purity, and were maintained on nutrient agar for use in various study stages. During the experiments, the strains were inoculated in Brain Heart Infusion (BHI) and incubated at 35°C for 18-24 hours. Cultures from these suspensions were prepared in sterile saline (0.85%) using scale 0.5 of MacFarland to obtain a bacterial concentration about 1.5×10^8 CFU/mL.

6.2.2. Antimicrobial activity of essential oils by the agar dilution method and Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

Susceptibility tests for determining the MIC of essential oils were carried out following the method of agar dilution method (CLSI, 2005). Essential oils were diluted in Mueller Hinton Agar (MHA) after seeding strains and incubation continued until reading the MIC for each bacterial strain tested. The MHA was supplemented with Tween 80 at 0.5% and kept at about 45°C. The essential oils were diluted in MHA plus Tween 80 in Petri dishes and equivalent concentrations of 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0% v/v were established. The inoculation of 32 strains was performed from cultures in BHI (37°C/18-24 hours) for each strain with the use of a Sterr multi-inoculator using suspensions standardised at 0.5 MacFarland in sterile saline and a bacterial concentration of 10^5 to 10^6 colony forming units/mL (CFU/mL) was achieved. After seeding, the bacteria were incubated at 35°C for 18-24 hours, followed by a check for bacterial growth and recording of the MIC values for each strain. After collecting the results, we performed the transformation of values in % v/v to mg/mL using the density values of each oil and a calculation of the respective MIC 90% of the tested bacterial strains.

6.3. Antimicrobial activity of essential oils carried out in water and saline

6.3.1. Bacterial strains

ATCC standard bacterial strains were used (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

During the experiments, the strains were inoculated in Brain Heart Infusion (BHI) and incubated at 35°C for 18-24 hours. Standardised (0.5 MacFarland scale) suspensions were from overnight cultures prepared in sterile saline (0.85%).

6.3.2. Time-kill curve assays of essential oils against bacterial strains

Tests were conducted using concentrations close to the values suggested in hot aromatic baths with concentrations below 1% v/v. We performed two types of tests, aiming to simulate a bath (like a hot tub), where the bacteria were placed in contact with the respective essential oils in water and saline (0.85%) and sterile aliquots of these suspensions were plated with culture medium for viable cell counts. Erlenmeyer flasks were prepared containing 40 mL volumes of distilled water or saline, both sterile and plus 0.5% Tween 80, and the oils were added to obtain a concentration of 0.5% v/v for each oil studied (clove, geranium, lavender, palmarosa and tea tree). At time zero, each bottle received 25µL of the bacterial suspensions previously standardised to obtain bacterial concentrations of about 10^5 and 10^6 CFU/mL in each bottle treatment. Bottles were prepared for control bacterial strains without the addition of essential oils and all tests were conducted in duplicate. The control and treatment bottles were kept in a water bath at 37°C, and 10µL aliquots of each vial were sown onto Mueller Hinton Agar (MHA) Petri dishes using sterile disposable calibrated loops 10µl at 0, 10, 20 and 30 minutes, 1, 2, 4, 8 and 24 hours (0.15, 0.3, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24 h), and incubation at 35°C for 24 hours. The colony counts were performed using a colony counter (Phoenix, model CP-600) and the log CFU/mL were found for control and treatment assays. This procedure was an adaptation of the technique used for performing urine cultures, according to the standards outlined by the National Health Surveillance Agency (ANVISA, 2010).

6.4. Chemical analysis of essential oils: gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

These analyses were performed at the Department of Chemistry and Biochemistry at the campus of UNESP-Botucatu-SP, using mass spectrometry coupled

to a gas chromatograph (GCMS) (Shimadzu, model QP5050A), using a capillary column (CBP-5, 50 m long, with an intermodal diameter of 0.25 mm and a 0.25 mm thick film). The injector temperature was 250°C, the interface temperature was 250°C and the detector operated in EI mode at 70eV with He used as the carrier gas.

6.5. Statistical analysis

For sensitivity testing, three or more independent treatments were tested using the nonparametric Kruskal-Wallis test. If the analysis was significant ($p \leq 0.001$), the Student-Newman-Keuls test was applied for multiple comparisons between treatments. For susceptibility testing in water and saline, ANOVA was used with the Tukey post hoc test. If $p > 0.05$, there was no significant difference between groups. We used the SAS statistical software version 9.0, licensed by UNESP, 2009.

7. Results and Discussion

The values of MIC 90% by the agar dilution method are presented in Table 1. The maximum value tested was 3% v/v, and although it was transformed to mg/mL using the density of essential oils, it appeared that some oils and bacteria to the MIC values were higher than the highest concentration tested.

According to the results, *P. aeruginosa* was resistant to the five essential oils, except that the clove oil had significant activity against this strain. As for *S. aureus*, it appeared that all the essential oils were effective, while for *E. coli*, four essential oils were active except for the lavender oil. When it was possible to calculate the MIC 90%, it appeared that they did not exceed 1% v/v.

For the tests to check the sensitivity of bacterial strains in liquid medium, i.e. distilled water and saline solution, the assays were performed aiming to compare the results by excluding the effects of medium osmolarity, i.e. providing bacteria an isotonic medium in the case of saline.

The profiles of variation in the number of viable bacteria (log CFU/mL) are presented in Figures 1-6. Overall, there was a marked reduction in the values of log CFU/mL for all treatments and the most significant decreases were noted for the

respective controls over 24 hours of experimentation. It was considered that when the colonies were not seen on the surface of the plates, this meant that the bacteria were undetected by the methodology used. In relation to *P. aeruginosa* and the experiment with water (Figure 1), there was a significant difference in the results between the control and treatment trials, but no difference when compared with the other oils tested. Moreover, in the control test, the number of viable cells of *P. aeruginosa* was maintained until 4 hours after the start of the experiment, while for the treatment tests, there were no more visible colonies at 0.15 h (10 minutes) of testing.

Compared to control with the bacterium *E. coli* in water, the result differed from treatments with oils of palmarosa, geranium and tea tree oil, which were equally effective when compared with each other (Figure 2). No viable cells were detected at 0.15 h (10 minutes) in these treatments. Moreover, the results with the treatments with oils of clove and lavender were not significantly different from control.

For *S. aureus*, only the results obtained for the essential oils of palmarosa and clove were statistically different from those in the control experiment in water (Figure 3). Viable cell counts remained after 4 hours of testing in the other tests while palmarosa and clove oils maintained a bacterial count only until the 0.15 h (10 minutes). In the experiments with tea tree, lavender and geranium treatments, cells remained viable for over 0.5 h.

In tests using sterile saline (0.85%) (Figures 4 to 6) and subsequently infected with the respective bacteria, there was a profile similar to those obtained in experiments using sterile distilled water. The aim of using saline, although not a practice in the case of immersion baths, was to provide greater survivability of the bacteria by placing the cultures in an isotonic medium.

In relation to *P. aeruginosa* (Figure 4) in the control test with saline, it appeared that there was a viable bacteria count over a longer period of experimentation when compared to tests with water, confirmed by the presence of bacteria at 8 hours, while bacteria were not detectable after 24 hours of experimentation. Moreover, the essential oils reduced the counts to undetectable levels after 0.15 h, in addition to the inhibitory efficiency of essential oils which was almost the same as what was found in the tests with distilled water.

As for *E. coli* tests in saline (Figure 5), a significant difference was found between control and the five essential oils, while the essential oil of palmarosa differed

only from the lavender oil when compared with each other, as seen in the profiles of reduction in bacterial count for both essential oils. In this particular case of comparing results from individual oils, the testing of *E. coli* in saline was the only case in which there was no reduction in the total count of control in the 24 hour time period of experimentation, although an approximate 3 log reduction occurred.

Figure 6 shows the values obtained for the reduction of *S. aureus* for tests in saline. There was evidence that treatment with essential oils of clove, tea tree and palmarosa resulted in reduction profiles that differed from control, while the others (lavender and geranium) were not statistically different to control results. In general, we saw that all essential oils showed a trend in declining the bacterial count to undetectable levels. This profile was different from the two other bacteria which occurred within 2 hours of contact between bacteria and the essential oils.

Thus, comparing the essential oils together, we observed that the essential oil of palmarosa was the only one to show statistically different results compared to all controls in the face of three different bacterial strains, thus showing a greater potential to decrease the count of these bacteria in water over time. According to the chemical analysis of the essential oils (Table 2), the palmarosa essential oil has geraniol as the major compound. Geraniol is a commercially important terpene that occurs in the essential oils of many herbs. It is an important molecule as a flavouring and in the fragrance industry, and is a common ingredient in consumer products produced by these industries. Because of its pleasant scent, and since geraniol is known to have insecticidal properties, many repellents use geraniol as a natural control agent against pests exhibiting low toxicity. Geraniol has been suggested to represent a new class of cancer chemopreventative agents. Other biological activities, such as antibiotic, antioxidant, anti-inflammatory properties and some vascular effects have also been investigated (Chen and Viljoen, 2010). Due to these properties, this compound which is found at a high percentage in the essential oil of palmarosa has provided the best results.

Houghton et al. (2007) reported that the analysis of chemical constituents of essential oils cannot confirm that the major component is responsible for the biological activity in a study. Thus, the effect can be attributed to a constituent in a smaller proportion or a synergy between compounds in the oil.

Despite this, there are studies with isolated components of essential oils. Qiu et al. (2010) reported that eugenol, a component of plant essential oils, has shown activity

against Gram positive and Gram negative bacteria. This component was identified in the clove oil used in these experiments, an treatment with this essential oil differed from most of the controls except for *E. coli* in water. In the sensitivity test in solid medium, clove essential oil was the only one that showed antimicrobial activity against the 32 strains of three different species tested. According to Edberg et al. (2000) *E. coli* survives in drinking water for between 4 and 12 weeks, depending on the environmental conditions (temperature, microflora, etc.). In water distribution systems, this organism has a higher survival rate than other bacteria and is used as a biological indicator of the safety of treated water. It is perhaps because of this property that *E. coli* was the only bacterium able to maintain viable cells in the saline control after 24 hours of experimentation.

Tea tree essential oil is becoming increasingly popular as a natural antimicrobial agent (Carson et al., 2006), although it did not show different activity to the control for *S. aureus* in water, despite having shown the lowest MIC 90% (0.025% v/v) against this bacterium when tested on agar. One of its major components, 1-terpinen-4-ol, has presented antimicrobial activity against *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* (Carson et al., 2006). Despite showing antimicrobial activity against these strains and having been described as an antiseptic (Price, 1999), Gram positive strains were resistant to this oil in water.

In aromatherapy, a common procedure is to dilute the essential oil in vegetable oil (for example, lavender oil with grape seed oil) and add them to a warm bath to induce relaxation (Morris, 2002). The essential oil of lavender, despite being one of the oils commonly used in immersion baths for relaxation and stress reduction, did not show different results from controls in three situations, compared to *E. coli* in water and *S. aureus* in water and saline. In addition, in five of the six trials, lavender essential oil showed a reduction in bacterial counts in a more delayed manner when compared to the other oils.

The presence of *P. aeruginosa* in a hot tub has been suggested as the cause of prostatitis and urosepsis, and its acquisition in a hot tub was confirmed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), while the same strain found in the hot tub was also detected in patients (Dulabon et al., 2009). According to the authors, the bath temperature and decreased levels of chlorination of water over time facilitated the multiplication of bacteria. Moreover, according to Yu et al. (2007), *P. aeruginosa* is often described as a

cause of outbreaks of folliculitis associated with the use of hot tubs, swimming pools and saunas. Thus, this bacterium has characteristics that may confer increased resistance in humid environments (Jawetz, 2005). Control in these environments and in water is of great importance because this bacterium can cause urinary tract infections, mucous membrane irritation, otitis externa and other pathologies. We obtained the best results for this bacterium, since the five essential oils tested in this study were effective in both saline and water, and showed greater reductions in log CFU/mL with less time.

As reported by Cavanagh and Wilkinson (2005) and compared to the results obtained when there was the essential oils showed antimicrobial activity in solid medium, *P. aeruginosa* showed resistance to some natural products, while *S. aureus* showed increased susceptibility to a greater variety of these products. In this sense, we observed in this study the occurrence of contrary results when we tested sensitivity in water and saline. However, it is known that different methodologies have been used to assess the interaction between bacteria and essential oils.

Thus, considering the objectives of the study to simulate the real conditions of immersion in a hot tub, and because there was also a reduction in bacterial counts in the control experiments, essential oils stimulated the reduction of bacterial counts. These results are important as they support the frequent addition of essential oils in water during immersion baths targeting the therapeutic properties of essential oils. Therefore, because we have demonstrated the ability of these natural products to dramatically reduce bacterial counts, the use of essential oils can be considered a new alternative for the control and disinfection of these bacteria in water or other wet areas used in the procedures of aromatherapy.

8. Conclusions

The essential oils tested in this study showed antimicrobial activity for the three species tested. Gram negative bacteria demonstrated greater susceptibility to the essential oils when tested in water and saline compared to the Gram positive bacteria;

There was greater persistence of *E. coli* when the tests were performed with saline instead of distilled water.

Palmarosa essential oil showed antibacterial activity in water and saline against all strains tested.

Among the tested strains, *P. aeruginosa* showed the greatest susceptibility to essential oils in water and saline. This bacterium is common in water and wet locations.

9. Acknowledgments

The By Samia Aromaterapia (Dra.Samia Maluf) for kindly providing the essential oils used in this study; Profa. Dra. Margarida Juri Saeki by chemical characterization of essential oils (GC-MS).

10. References

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

Bandoni, A. L. and Czepak, M. P. (2008) Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitória: Edufes, 624p.

Barbosa, L. N. ; Rall, V. L. M.; Fernandes, A. A. H.; Ushimaru, P. I.; Probst, S.; Fernandes Júnior, A. (2009) Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease* 6(6), 725-728.

BRASÍLIA: ANVISA, s.d. (2010) Apostila: Principais síndromes infecciosas: Módulo I. Disponível em: < <http://www.scribd.com/doc/4128884/Biologia-Apostila-ANVISA-Modulo-01> >. Acesso em: 14 set.2010.

Cavanagh, H. M. and Wilkinson, J. M. (2002) Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy Research* 16(4), 301-308.

Cannard, G. (1996) The effect of aromatherapy in promoting relaxation and stress reduction in a general hospital. *Complementary Therapies in Nursing and Midwifery* 2, 38-10.

Carmo, E. S.; Lima, E.O.; Souza, E. L. (2008) The potential of *origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 362-367.

Carson, C. F.; Hammer, K. A.; Riley, T. V. (2006) *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a Review of antimicrobial and on the medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews* 19(1), 50-62.

Carvalho, M. J.; Pimenta, F. C.; Hayashida, M.; Gir, E.; Silva, A. M.; Barbosa, C. P.; Canini, S. R. M. S.; Santiago, S. (2009) Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *S. aureus* in the saliva of health professionals. *Clinics* 64(4), 295-302.

Chen, W.; Viljoen, A. M. (2010) Geraniol: A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany* 76(44), 643-651.

Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS) (2005) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth Information Supplement. CLSI/NCCLS document M 100-S15. Wayne, PA.

Dulabon, L. M.; Laspina, M.; Riddell, S. W.; Kiska, D. L.; Cynamon, M. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* acute prostatitis and urosepsis after sexual relations in a hot tub. *Journal of Clinical Microbiology* 47(5), 1067-1608.

Edberg, S. C.; Rice, E.W.; Karlin, R. J.; Allen, M. J. (2000) *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. Society for Applied Microbiology Symposium Series 29, 106-116.

Franz, C. M. (2010) Essential oil research: past, present and future. *Flavour Fragrance Journal* 25, 112-113.

Fonseca, P.; Librand, A. P. L. (2008) Evaluation of physico-chemical and phytochemical characteristics of different tinctures of barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 4, 271-277.

Gershenzon, J.; Dudareva, N. (2007) The function of terpene natural products in the natural world. Nature Chemical Biology 3(7), 408-414.

Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology 86(6), 985-90.

Houghton, P. J.; Howes, M. -J.; Lee, C. C.; Steventon, G. (2007) Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. Journal of Ethnopharmacology 110, 391-400.

Jawetz, E.; Melnick, J.; Aldelberg, E. (2005) Microbiologia médica: um livro médico Lange. Tradução Patrícia Lydie Volux. 22.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil.

Mendes, S. S.; Bomfim, R. R.; Jesus, H. C. R.; Alves, P. B.; Blank, A. F.; Estevam, C. S.; Antonioli, A. R.; Thomazzi, S. M. (2010) Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. Journal of Ethnopharmacology 129(3), 391-397.

Morris, N. (2002) The effects of lavender (*Lavendula angustifolium*) baths on psychological well-being: two exploratory randomized control trials. Complementary Therapies in Medicine 10, 223-228.

Okoh, O. O.; Sadimenko, A. P.; Afolayan, A. J. (2010) Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. Food Chemistry 120, 308-312.

Paduch, R.; Szerszeń, M. K.; Trytek, M.; Fiedurek, J. (2007) Terpenes: substances useful in human healthcare. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 55(5), 315-327.

Price, P. (1999) Aromaterapia: para doenças comuns. 1.ed. São Paulo: Manole.

Qiu, J.; Feng, H.; Lu, J.; Xiang, H.; Wang, D.; Dong, J.; Wang, J.; Wang, X.; Liu, J.; Deng, X. (2010) Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(17), 5846-5851.

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

Silva, S. L.; Chaar, J. S.; Figueiredo, P. M. S.; Yano, T. (2008) Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amazonica* 38(1), 107-112.

Silveira, P. F.; Bandeirani, A. M.; Arrais, P. S. D. (2008) Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 4(18), 618-626.

Wannes, W. A.; Mhamdi, B.; Sriti, J.; Jemia, M. B.; Ouchikh, O.; Hamdaoui, G.; Kchouk, M. E.; Marzou, B. (2010) Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology* 48, 1362-1370.

Wilkinson, J. M. and Cavanagh, H. M. A. (2005) Antibacterial Activity of Essential Oils from Australian Native Plants. *Phytotherapy Research* 19, 643-646.

World Health Organization (2000) National policy on traditional medicine and complementary/alternative medicine: general guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva, 24 p.

Yu, Y.; Cheng, A. S.; Wang, L.; Dunne, W. M.; Bayliss, S. J. (2007) Hot tub folliculitis or hot hand/foot syndrome caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of the American Academy of Dermatology 57(4), 596-600.

Figure Captions:

Figure 2. Time-kill curve of treatments with essential oils vs. water control against *P. aeruginosa*

Figure 3. Time-kill curve of treatments with essential oils vs. water control against *E. coli*.

Figure 4. Time-kill curve of treatments with essential oils vs. water control against *S. aureus* .

Figure 5. Time-kill curve of treatments with essential oils vs. saline control against *P. aeruginosa*.

Figure 6. Time-kill curve of treatments with essential oils vs. saline control against *E. coli*.

Figure 7. Time-kill curve of treatments with essential oils vs. saline control against *S. aureus*.

Figure

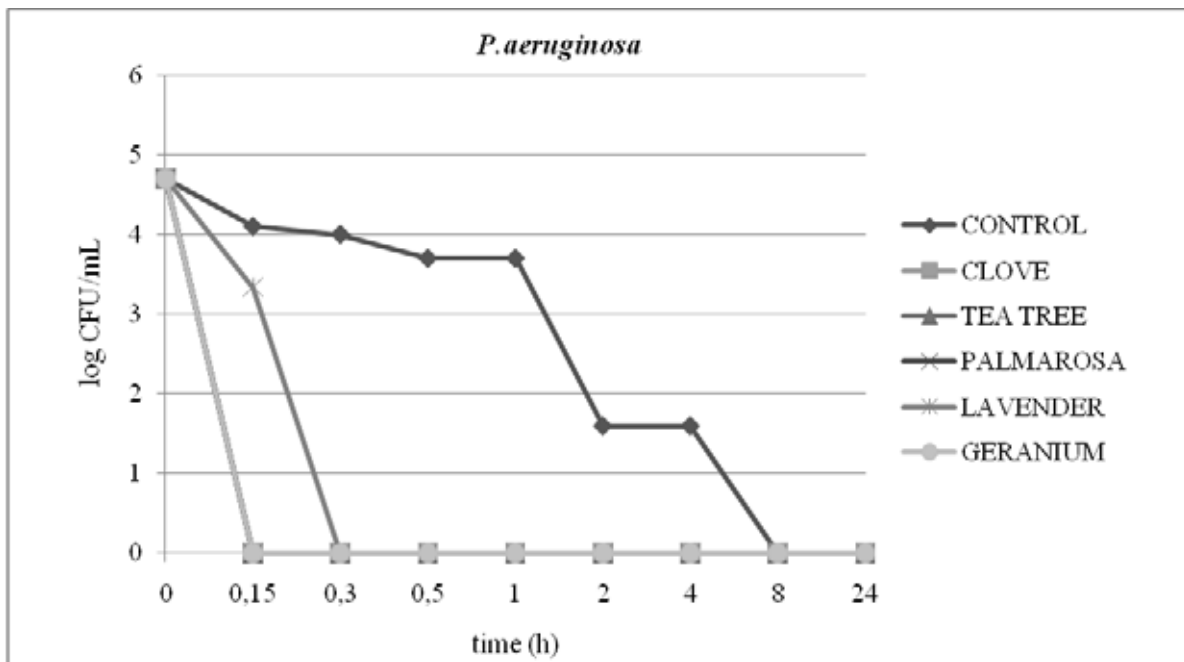


Figure 8. Time-kill curve of treatments with essential oils vs. water control against *P. aeruginosa*.

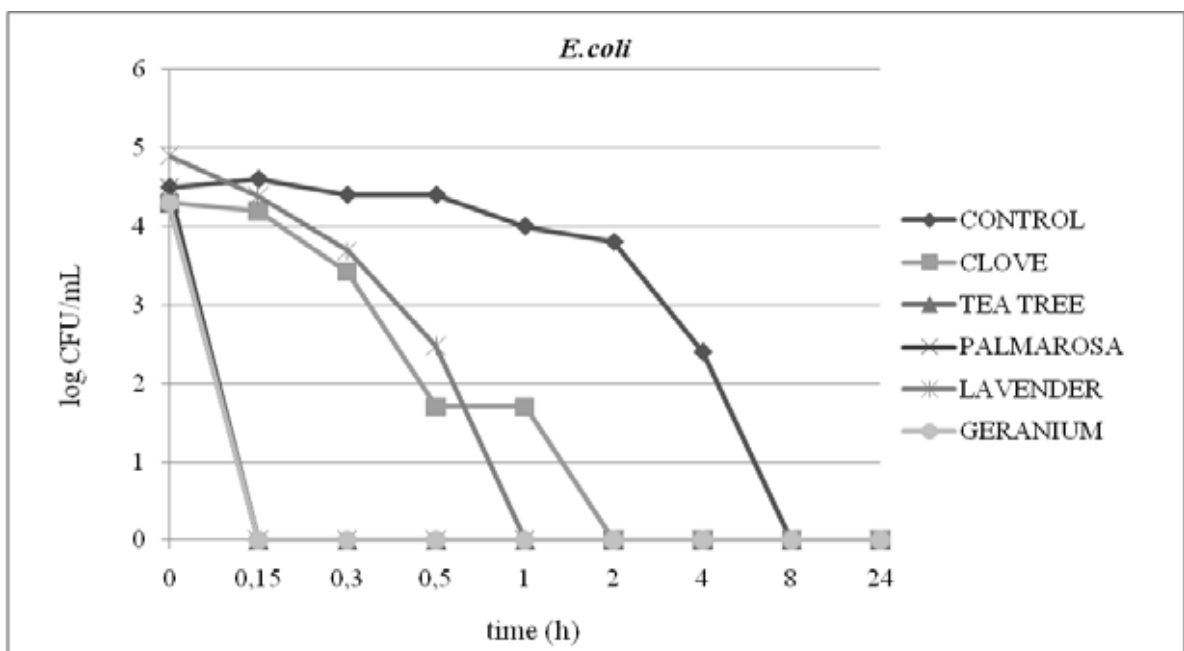


Figure 9. Time-kill curve of treatments with essential oils vs. water control against *E. coli*.

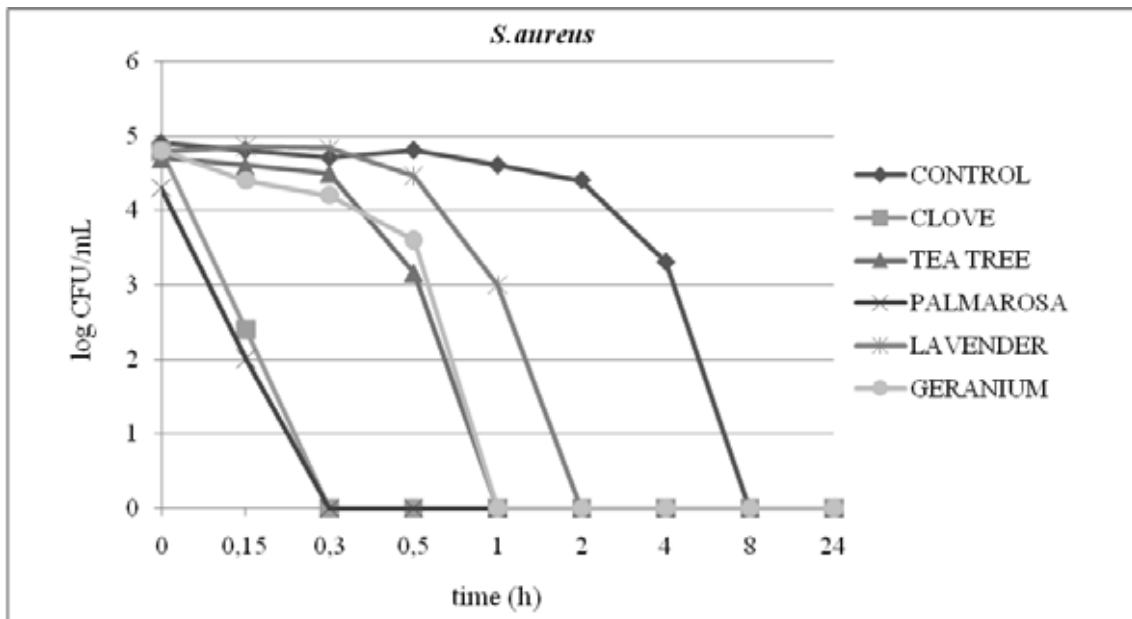


Figure 10. Time-kill curve of treatments with essential oils vs. water control against *S. aureus*.

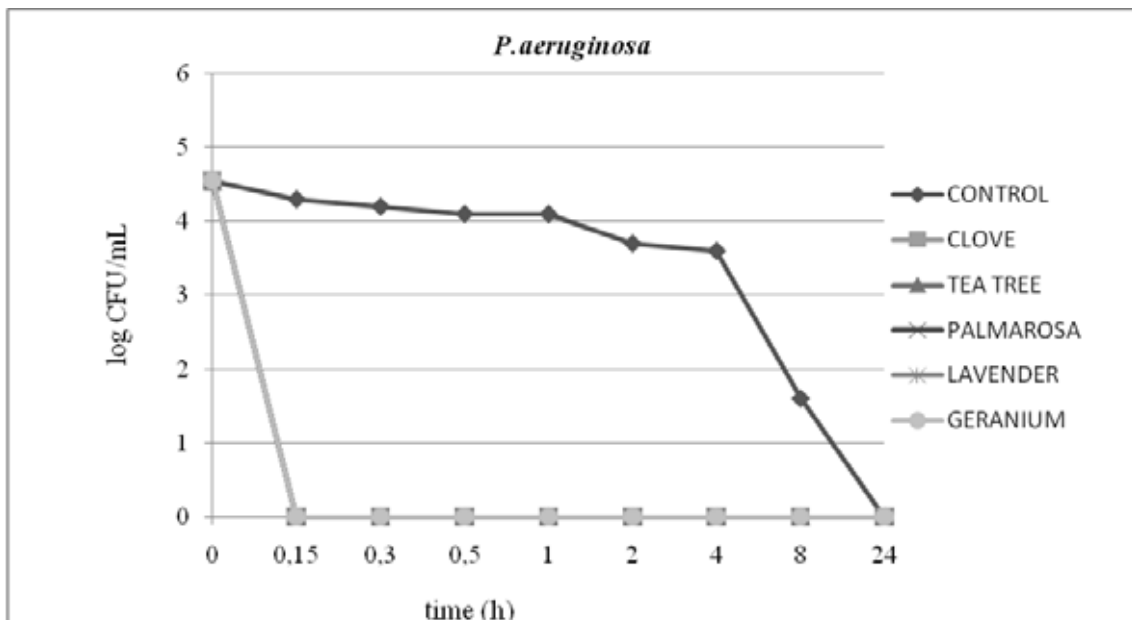


Figure 11. Time-kill curve of treatments with essential oils vs. saline control against *P. aeruginosa*.

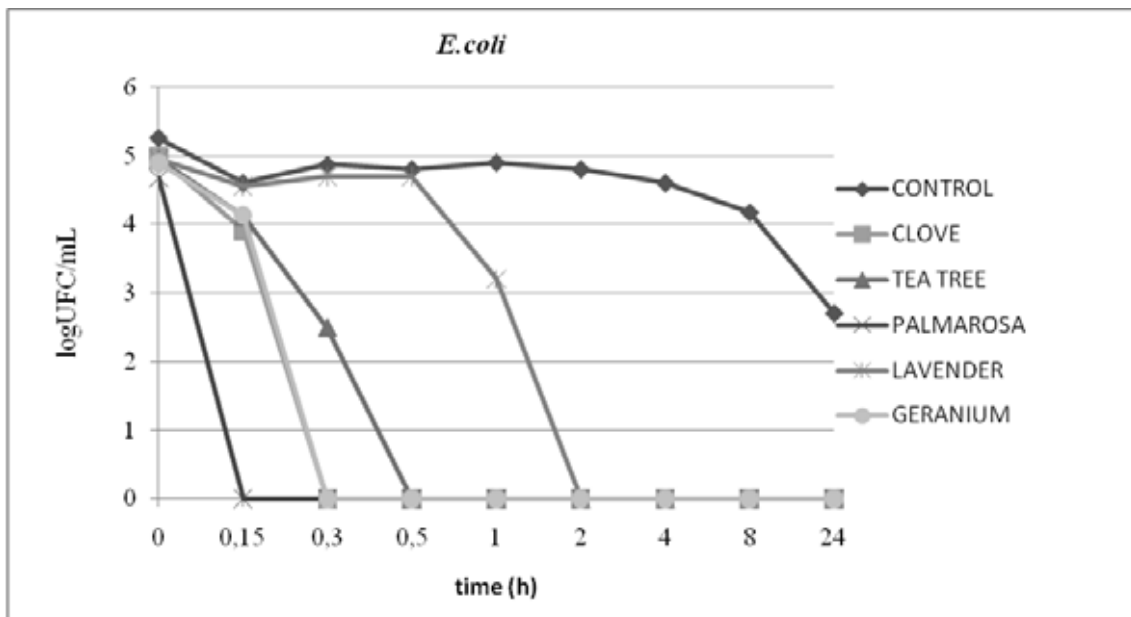


Figure 12. Time-kill curve of treatments with essential oils vs. saline control against *E. coli*.

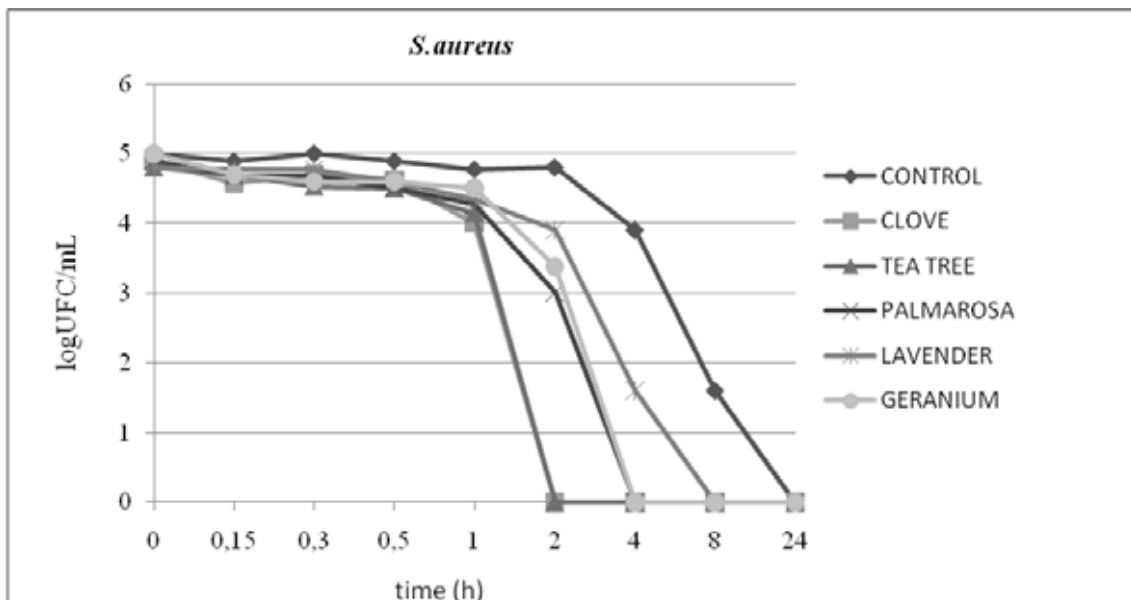


Figure 13. Time-kill curve of treatments with essential oils vs. saline control against *S. aureus*.

Table 3. Values of 90% minimum inhibitory concentrations (MIC 90%) in% v/v and mg/mL

Essential Oils	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	%v/v	mg/mL	%v/v	mg/mL	%v/v	mg/mL
Clove	0,84	0,30 ^a	0,12	1,20 ^c	0,20	1,90 ^a
Tea Tree	>3,00	>25,74 ^b	0,02	0,20 ^a	0,50	4,30 ^b
Palmarosa	>3,00	>26,22 ^b	0,07	0,60 ^d	0,24	2,10 ^{bd}
Lavender	>3,00	>25,59 ^b	0,50	4,30 ^e	>3,00	>25,59 ^e
Geranium	>3,00	>25,40 ^b	0,04	0,31 ^b	0,50	4,24 ^{bc}

Different letters in columns represent statistical differences between median antibacterial activity of essential oils (mg/mL) when $p \leq 0.001$.

Table 4. Density and chemical components of essential oils determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS)

Essential Oil	Popular Name	Density (mg/mL)	Names of Compounds (%)
<i>Syzygium aromaticum</i>	Clove	988	eugenol (83.63), ketamine-caryophyllene (12.39), alpha-humulene (3.05), eugenol acetate (0.93)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Tea Tree	858	1-terpinen-4-ol (53.40), p-cymene (8.09), gamma-terpinene (5.34), 1.8 cineole (3.18), alpha-pinene (1.40); terpinolene (1.05), limonene (0.70)
<i>Cymbopogon martini</i>	Palmarosa	874	geraniol (57.49), geranyl acetate (13.56), linalool (1.71), beta-caryophyllene (1.07); ocimene (0.27)
<i>Lavandula angustifolia</i>	Lavender	853	1.8 cineole (45.97), p-cymene (4.19), 1-terpinen-4-ol (2.30), alpha-pinene (1.48), limonene (1.46), gamma-terpinene (1.17), terpinolene (1.04)
<i>Pelargonium graveolens</i>	Geranium	848	citronellol (31.58), geraniol (25.47); ferriato of citronelita (12.74); ferriato of geranyl (6.71), linalool (6.33); isomenthone (4.35), rose oxide (0 , 89); citronelita acetate (0.48)