



Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
Campus de Botucatu



Priscila Martins Leal

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS
PRESENTES EM ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BACTÉRIAS
CAUSADORAS DE INFECÇÕES HOSPITALARES**

Monografia apresentada ao
Departamento de Microbiologia e
Imunologia do Instituto de
Biociências – UNESP – Campus de
Botucatu, como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas.

Botucatu - SP

2013

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
Campus de Botucatu

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS
PRESENTES EM ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BACTÉRIAS
CAUSADORAS DE INFECÇÕES HOSPITALARES**

Autora: Priscila Martins Leal

Orientador: Prof. Adjunto Ary Fernandes Júnior

Monografia apresentada ao
Departamento de Microbiologia e
Imunologia do Instituto de
Biotecnologia – UNESP – Campus de
Botucatu, como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas.

Botucatu – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Leal, Priscila Martins.

Ação antimicrobiana de compostos majoritários presentes em óleos essenciais sobre bactérias causadoras de infecções hospitalares / Priscila Martins Leal. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ary Fernandes Júnior

Capes: 21202010

1. Infecção hospitalar – Pesquisa.
2. Produtos de ação antimicrobiana.
3. Essências e óleos essenciais – Uso terapêutico.
4. Bactérias.

Palavras-chave: Ação antimicrobiana; Bactérias; Compostos majoritários; Infecções hospitalares; Óleos essenciais.

Agradecimentos

Aos meus queridos pais e irmã que guiaram todos os meus passos até eu poder andar por conta própria. Que sempre apoiaram minhas decisões, compreendendo e tendo paciência com minhas dúvidas e me oferecendo todo o carinho e amor.

Às minhas colegas de apartamento e melhores amigas, Mayara Caldeira Dias (Coli) e Priscila Luiza Mello – confidentes, conselheiras e irmãs – com quem dividi, além de paredes, importantes partes de minha vida e espero dividir ainda muitos momentos.

Ao meu namorado Ariel Peter van Oene (Minerva), que me ensinou a perseguir meus sonhos, mesmo quando estes me parecem impossíveis.

Ao meu orientador e mestre Ary Fernandes Júnior por todos os ensinamentos e atenção. Por sempre ter um tempo para mim, entre todos seus afazeres e responsabilidades, demonstrando o verdadeiro significado de ser um “orientador”.

Às minhas colegas de laboratório Lidianne Nunes Barbosa e Bruna Fernanda Murbach Teles Andrade pela presença experiente e auxílio em meus ensaios. E à Fernanda Cristina Bérghamo Alves e Mariana Albano, que além de colegas de laboratório, tornaram-se amigas e conselheiras para os desabafos e risadas.

Aos funcionários do departamento de Microbiologia: Luiz Severino dos Santos (Lula) e Luiz Henrique Alquati, sempre muito atenciosos, pela prontidão em retirar dúvidas e pelo auxílio na esterilização e preparo de meio de cultura.

Às professoras Maria de Lourdes Ribeiro de Souza e Cunha, Vera Lúcia Mores Rall, e Teruê Sadatsune pelo auxílio e atenção na obtenção das linhagens

bacterianas, colocando essa ajuda sempre como prioridade, mesmo em meio aos seus afazeres.

Ao professor Luciano Barbosa do Departamento de Bioestatística pela prontidão e atenção ao me ajudar na análise estatística de meu estudo.

À FAPESP pelo auxílio na forma de bolsa de Iniciação Científica para a realização deste projeto.

A todos, o meu “muito obrigada” por participarem de um dos meus sonhos e, de alguma forma, contribuírem para este tornar-se realidade, garantindo enorme realização pessoal e profissional em minha vida.

Sumário

Resumo	1
Abstract	3
1. Introdução	5
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo Geral	11
2.2. Objetivos Específicos	11
3. Materiais e Métodos	12
3.1. Linhagens bacterianas	12
3.1.1. Coloração de Gram	13
3.1.2. Meios de Cultura	14
3.2. Compostos antimicrobianos	14
3.3. Testes de sensibilidade para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	15
3.4. Ensaio sobre Curva de Sobrevivência	16
3.5. Análise Estatística	17
4. Resultados	18
5. Discussão	29
6. Conclusão	35
7. Referências Bibliográficas	36

ANEXO I 40

ANEXO II 41

Resumo

Infecções hospitalares são frequentemente relacionadas aos indivíduos internados ou expostos a rápidas passagens nos hospitais, com ocorrência de procedimentos invasivos. Os agentes etiológicos destas patologias são, comumente, bactérias resistentes ou multirresistentes aos antimicrobianos convencionais. Assim, tem recebido destaque pesquisas que buscam novos compostos antimicrobianos, dentre eles produtos naturais obtidos a partir de plantas medicinais, como óleos essenciais ou extratos, bem como compostos majoritários isolados a partir destes. Esses compostos são, por vezes, os responsáveis pelas propriedades biológicas e antimicrobianas dos óleos essenciais. O estudo proposto teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de seis compostos majoritários (carvacrol, eugenol, geraniol, terpineol e timol) de óleos essenciais, sobre as bactérias causadoras de infecções hospitalares: *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* Sensível à Meticilina (MSSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. Para isso, foi realizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando a metodologia da diluição dos compostos antimicrobianos em Agar Müller-Hinton (MHA). De acordo com os resultados obtidos nestes testes de sensibilidade, verificou-se que os compostos testados apresentam atividade antimicrobiana sobre as bactérias em estudo, sendo o caráter de inibição maior nas amostras de *S. aureus* e menor sobre as cepas de *P. aeruginosa*. Visando determinar se os valores de CIM obtidos referiam-se a ação bactericida ou bacteriostática dos compostos, foram então realizados ensaios para obtenção das curvas de sobrevivência de cada uma das bactérias sob ação dos antimicrobianos testados, através da contagem de colônias viáveis em função do

tempo. Dessa forma, para as linhagens de *E. faecalis*, o geraniol foi o composto majoritário mais eficiente. Para *E. coli*, foi o carvacrol; Para MRSA e MSSA, timol; E para *P. aeruginosa*, carvacrol, eugenol e timol foram os compostos mais eficientes. Os resultados obtidos permitiram concluir que os compostos majoritários testados possuem atividade antimicrobiana e apresentam caráter bactericida e bacteriostático – sendo essas ações variáveis de acordo com o composto e bactéria testadas. Assim, embora exista a necessidade de outros estudos visando aprofundar os conhecimentos, especialmente sobre a toxicologia dos compostos, é possível inferir que estes tem potencial na elaboração de agentes antimicrobianos como fitoterápicos.

Palavras-chave: Ação antimicrobiana, bactérias, compostos majoritários, infecções hospitalares, óleos essenciais.

Abstract

Nosocomial diseases are frequently associated with hospitalized patients or people exposed to invasive procedures at hospitals. The etiologic agents of these diseases are commonly represented by resistant or multi resistant bacteria samples. This way, the search for new antimicrobial compounds is important, including essential oils or extracts of medicinal plants and its major compounds. These compounds are often responsible for the biological and antimicrobial properties of the essential oils. The aim of this study was to evaluate the inhibitory effects of six major compounds (carvacrol, eugenol, geraniol, terpineol and thymol) from different plants over the nosocomial bacterias: *Staphylococcus aureus* Methicillin Resistant (MRSA), *Staphylococcus aureus* Methicillin Sensible (MSSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. Therefore it was determined determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by using the dilution method of antimicrobial compounds in Mueller-Hinton Agar (MHA). According to the results obtained by these sensitivity tests, the tested compounds exhibit antimicrobial activity against those bacterias. The inhibition character found was higher in *S. aureus* samples and lower in *P. aeruginosa* strains. In order to determine if the MIC values obtained for these compounds refers to bactericidal or bacteriostatic actions, assays were then performed to obtain the survival curves of each bacteria under each antimicrobial compound action, by counting viable colonies over time. Thus, to *E. faecalis*, geraniol was the most effective compound; For *E. coli*, it was carvacrol; For MRSA and MSSA, thymol was the most effective one. And for *P. aeruginosa*, carvacrol, eugenol and thymol were the most effective antimicrobial compounds. These results allows to conclude that the major compounds tested has antimicrobial

properties and presents bactericidal or bacteriostatic actions, depending on the bacteria and the compound tested. Thus, although further studies are needed to improve knowledge, especially about the compound's toxicology, it's possible to infer that they may have potencial on the preparation for antimicrobial agents as phytotherapeutics.

Keywords: Antimicrobial activity, bacterias, essential oils, major compounds, nosocomial diseases.

1. Introdução

Bactérias são microrganismos unicelulares e procariotos presentes tanto no ambiente (água, ar, solo) quanto na microbiota normal do ser humano e de animais, participando da nutrição destes e/ou garantindo-lhes proteção contra patógenos. Entretanto, algumas bactérias podem ser consideradas os próprios agentes patogênicos ao interagirem com o sistema imune dos seres humanos, o que ocorre principalmente quando estes já se encontram sob um estado de imunossupressão (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Em ambientes hospitalares, essas bactérias patogênicas são uma das principais causas de infecções em pacientes internados em leitos ou em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) e submetidos a procedimentos invasivos (uso de cateteres, sondas, intubação traqueal), ao uso contínuo e prolongado de ventilação mecânica, ou também em pacientes que apresentam queimaduras, e feridas profundas ou de sítio cirúrgico (TEIXEIRA, et al., 2004; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Infecções hospitalares (IH) são definidas como qualquer infecção relacionada à hospitalização com manifestação clínica após período de 72 horas da admissão do paciente (parâmetro adotado pelo CDC: *Center for Disease Control and Prevention*) ou após 48 horas caso haja ocorrência de procedimentos invasivos. As IH representam um importante problema de saúde pública visto que causam elevadas taxas de morbidade e mortalidade, e aumentam o tempo de internação e custo de tratamento dos pacientes (MITKA, 2000). Assim, faz-se necessária tomada de medidas profiláticas e quanto ao tratamento dos doentes, visando evitar surtos, uma vez que os microrganismos causadores dessas infecções nosocomiais são facilmente disseminados.

As IH ocasionadas por bactérias patogênicas tem causas multifatoriais, mas muitas vezes relacionam-se a resistência desses microrganismos a antibióticos, aos quais os pacientes são comumente submetidos em tratamento (SANTOS, 2004). Isso se deve, além da prescrição indiscriminada do fármaco, ao rápido desenvolvimento e adaptação ao ambiente destes microrganismos, o que faz com que eles sejam submetidos a um processo de seleção natural, no qual sobrevivem as bactérias mais resistentes (RIDLEY, 2006).

Neste estudo, foram selecionados alguns dos principais agentes patogênicos causadores de IH: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Quanto a *S. aureus*, foram selecionadas cepas resistentes e sensíveis à oxacilina (metilicina). Pesquisa realizada com pacientes internados em UTIs, demonstrou isolamento de *E. coli* em 7,8% dos casos, de *P. aeruginosa* em 21,9%, *S. aureus* Metilicina Resistente (MRSA) em 14,7% e de *E. faecalis* em 8,2% (OLIVEIRA; KOVNER; SILVA, 2010). Em outro estudo, *E. coli* foi isolada em 10% dos casos de IH identificados em um hospital universitário de Fortaleza - CE; enquanto *S. aureus* foi isolada em 20% e *P. aeruginosa* em 14% deles (NOGUEIRA et al., 2009). Em hemoculturas de pacientes de UTIs, esses microrganismos também já foram identificados: *S. aureus* em 13%, *P. aeruginosa* em 12,2% e *E. coli* e *E. faecalis* em 0,8% dos casos (ALVES et al., 2012). Outros agentes etiológicos importantes nas IH são: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp*, *Acinetobacter sp*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida sp* (OLIVEIRA; KOVNER; SILVA, 2010; NOGUEIRA et al., 2009; ALVES et al., 2012).

Infecção nosocomial causada por *P. aeruginosa* normalmente está associada a elevado índice de mortalidade, independentemente da terapia antimicrobiana adotada. Geralmente é responsável pelas pneumonias hospitalares, mas também

pode causar Infecções do Trato Urinário (ITUs), infectando o paciente através de sondas, feridas cirúrgicas ou queimaduras (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). As opções de tratamento para infecções de *P. aeruginosa* são geralmente escassas devido a sua capacidade em adquirir resistência a muitas classes de drogas (LIVERMORE, 2002).

E. faecalis normalmente se dissemina em locais originalmente estéreis, como cateteres urinários ou intravenosos e termômetros retais, podendo causar ITUs ou infecções no trato biliar, bacteremias e até mesmo abscessos intra-abdominais quando o indivíduo encontra-se em estado imunocomprometido (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

E. coli, por sua vez, é uma bactéria constituinte da microbiota intestinal normal do indivíduo, mas que, quando contamina água e alimentos, e estes são ingeridos por indivíduos com baixa resistência imunológica, pode causar: diarreias aquosas, sanguinolentas ou hemorrágicas; colite hemorrágica e, também, ITUs. Segundo dados obtidos por Bouza et al., (2001), *Enterococcus sp.* são responsáveis por 15,8% das ITUs, enquanto *E.coli*, por 35,6% delas.

S. aureus faz parte da microbiota normal da pele e das mucosas, mas pode causar infecção em diversos órgãos e tecidos quando em contato com feridas, podendo resultar em abscesso ou infecções cutâneas e até mesmo pneumonias e septicemias (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). É uma bactéria que costuma apresentar resistência a antibióticos, sendo, portanto, considerada um dos mais importantes microrganismos no quadro das IH, uma vez que a resistência dificulta o tratamento do doente (MITKA, 2000). Assim, o paciente não tratado continua a transmitir o microrganismo a outros indivíduos, sendo disseminado através das mucosas nasais colonizadas de pessoas saudáveis (KLUYTMANS; WERTHEIM, 2005).

Segundo pesquisas, as taxas de infecção por *S. aureus* vem aumentando durante as últimas décadas, relatando bacteremias associadas a taxas de mortalidade entre 15 e 60%. Além disso, relatou também que a resistência à meticilina entre os isolados de *S. aureus* (MRSA) tem sido um problema crescente, atingindo 52,3% das infecções hospitalares em pacientes de UTIs. (COSGROVE; KARCHMER; CARMELI, 2003).

Oxacilina é um antibiótico comumente receitado em casos de IH e ao qual *S. aureus* também comumente apresenta resistência. É pertencente ao grupo das penicilinas, antibióticos β -lactâmicos. A resistência de *S. aureus* deve-se à produção, pela bactéria, de β -lactamases que quebram o anel β -lactâmico do antibiótico; ou à produção de variações nas proteínas de fixação de penicilinas do microrganismo, impedindo sua ação (UENO; JORGE, 2001).

Assim considerado, atualmente são frequentes e de grande importância pesquisas que visam melhor compreensão sobre as causas e medidas profiláticas ou tratamento das IH. Neste quadro, a procura por novos compostos antimicrobianos tem recebido destaque, e os óleos essenciais (OEs) se mostram potencialmente viáveis como princípios ativos na elaboração de fitoterápicos (BERTINI et al., 2005).

Os OEs são obtidos a partir de plantas e constituídos por substâncias voláteis. Em diversos estudos, extratos e OEs mostraram-se eficazes sobre bactérias patogênicas, demonstrando caráter antimicrobiano ao inibir o crescimento desses microrganismos (PEREIRA et al., 2004; FERRONATO et al., 2007).

Na natureza, os OEs desempenham um papel fisiológico importante para as plantas, atuando como uma linguagem para comunicação e interação entre elas e o ambiente circundante. Um total de 1700 compostos voláteis já foram isolados de mais de 90 famílias de plantas. Estes compostos, liberados a partir de folhas, flores

e frutas na atmosfera; e de raízes, no solo, são mecanismos de defesa contra herbívoros e patógenos; e fornecem uma vantagem reprodutiva, atraindo polinizadores e dispersores de sementes. De maneira geral, os compostos voláteis constituem cerca de 1% dos metabólitos secundários das plantas (DUDAREVA et al., 2006).

A composição química destes produtos vegetais é bastante variada e inclui diversas classes de compostos, tais como saponinas, flavonóides, tiosulfatos, glucosinolatos (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010), taninos, quinonas, alcalóides e ácidos orgânicos (TAN et al., 2007). Pesquisas recentes tem relacionado à atividade antimicrobiana de fontes naturais, a presença de uma classe de compostos abundante em espécies vegetais: os chamados compostos fenólicos (EL-MASSRY et al., 2009; MAIER et al., 2009).

Segundo Nascimento et al. (2007) e Martos et al. (2010), os OEs apresentam mais de 100 componentes, principalmente os polifenóis, terpenos, monoterpenos e sesquiterpenos, sendo que alguns podem representar mais de 85% de seu conteúdo total.

Considerando, portanto, que os OEs não são substâncias puras, este estudo testou a atividade antimicrobiana de compostos majoritários presentes em alguns óleos essenciais: carvacrol, timol, eugenol, geraniol e terpineol; já com alguns relatos sobre suas atividades antibacterianas (NOSTRO et al., 2007).

Timol e Carvacrol são compostos fenólicos encontrados no OE de orégano (*Origanum vulgare*) (CIC e ENPOS, 2008). Estudos realizados com este óleo mostraram sua eficiência até mesmo como conservantes de alimentos, justificada pelo alto potencial antimicrobiano, principalmente, do carvacrol (SOUZA, 2006), e inibidor no crescimento de *Salmonella enteritidis* – também devido ao componente

carvacrol (SILVA et al., 2010) – e de *Streptococcus mutans* – com atividade tanto do carvacrol quanto do timol (BARROSO, 2010). Este OE (do orégano) também já se mostrou eficiente na inibição do crescimento de *S. aureus* Meticilina Resistente (NOSTRO et al., 2004).

O eugenol é um composto encontrado no OE do cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) e demonstrou em estudo, junto com o timol, ação antimicrobiana ao inibir o crescimento de cepas das seguintes bactérias: *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* e *L. monocytogenes* (TIPPAYATUM; CHONHENCHOB, 2007).

Geraniol é encontrado no OE de capim citronela (*Cymbopogon winterianus*). Em pesquisa, juntamente com o carvacrol, mostrou-se eficiente na inibição de *Salmonella* Typhimurium e cepas resistentes, desta mesma bactéria, à rifampicina (KIM et al., 1995).

Finalmente, o terpineol, encontrado especialmente na Tea tree (*Melaleuca alternifolia*), cujo OE demonstra atividade antimicrobiana sobre bactérias *S. aureus* (CARSON et al., 2002), e na planta *Lithraea molleoides*; demonstrou amplo espectro de ação sobre bactérias Gram positivas (SHIMIZU et al., 2006).

Assim, nesta pesquisa objetivou-se determinar as propriedades inibitórias de alguns compostos fenólicos, considerados majoritários de OEs, sobre bactérias causadoras de IH, com finalidade também de aprofundar os conhecimentos sobre estes produtos como possíveis antimicrobianos e para o desenvolvimento de novos fitoterápicos de baixo custo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação inibidora de compostos majoritários de óleos essenciais sobre amostras de bactérias causadoras de infecções hospitalares.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos compostos timol, carvacrol, geraniol, eugenol e terpineol sobre: *S. aureus* Meticilina Resistentes (MRSA) e Sensíveis (MSSA), *P. aeruginosa* e *E. faecalis* e cepas padrão ATCC para cada uma das espécies bacterianas;
- Obter as curvas de sobrevivência de cada bactéria utilizando os valores de CIM_{90%} previamente definidos para os compostos, comparando-as às curvas obtidas para ensaios-controle de crescimento normal para cada espécie bacteriana.

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens bacterianas

Foram selecionadas, 15 amostras MRSA, 15 MSSA, 15 de *P. aeruginosa*, 15 de *E. faecalis* e 15 de *E. coli*, e uma linhagem padrão ATCC (American Type Culture Collection) para cada uma das espécies bacterianas (*S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 10100, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 43895) para serem armazenadas em estoque ágar nutriente inclinado para uso nos ensaios microbiológicos. Essas amostras foram isoladas de materiais biológicos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMB (Faculdade de Medicina de Botucatu) / UNESP e estavam sendo mantidas em caldo com glicerol a 10% e a -20°C na bacterioteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu. Alíquotas das culturas congeladas foram transferidas para Caldo BHI (Brain Heart Infusion) e então mantidas em estufa a 37°C por 24 horas para verificar crescimento bacteriano. Após isso, visando analisar a pureza das cepas, cada amostra foi corada pela técnica de Gram para análise em microscópio óptico, e – a partir do Caldo BHI, e semeada em meios de cultura (Enterococci Confirmatory Agar para *E. faecalis*, Mannitol Salt Agar para MRSA e MSSA, Agar MacConkey para *P. aeruginosa* e *E. coli* e BHI Agar para essas e as demais bactérias testadas). Amostras de *S. aureus* foram também submetidas ao teste de catalase. Colônias características de cada amostra foram então semeadas em um tubo de BHI Agar inclinado e mantido na estufa a 37°C por 24h para crescimento bacteriano, e para, em seguida, ser devidamente tamponado com rolha estéril e armazenado em geladeira (4 a 6°C).

As amostras congeladas foram devidamente isoladas e submetidas a testes bioquímicos para correta identificação do microrganismo, antes de serem

armazenadas sob refrigeração, dispensando a repetição destes por este estudo. Os testes neste realizados visaram apenas confirmar a pureza das linhagens, já anteriormente triadas e especificadas.

A utilização das cepas isoladas dos casos clínicos nos ensaios foi aprovada em 06 de agosto de 2012, junto ao Comitê de Ética na Pesquisa, da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, tendo recebido o número CEP 4312/2012.

3.1.1. Coloração de Gram

A Coloração de Gram é um método simples, rápido e eficaz para identificação e confirmação bacteriológica, sendo realizado da seguinte maneira: em uma lâmina estéril, com auxílio da alça de platina, coloca-se uma gota de salina estéril e uma alíquota da amostra que deseja-se analisar, misturando-as. Este material deve ser fixado na lâmina, passando-a na chama do bico de Bunsen três vezes. Em seguida é deixada em descanso por 1 minuto sob ação do Violeta de Genciana. Após escorrido este material, é deixada 1 minuto sob ação de Lugol (fixador), então também escorrido para lavagem da lâmina com álcool (para descoloração) e em seguida com água corrente para a parte final da coloração, mantendo a lâmina sob ação de Fucsina por 30 segundos. A Fucsina é também escorrida, a lâmina lavada com água corrente e então secada, cuidadosamente, com papel filtro para finalmente ser observada ao microscópio óptico na objetiva de 100x com auxílio do óleo de imersão.

3.1.2. Meios de Cultura

Os meios utilizados para verificar a pureza das cepas do estudo foram: ME (Meio para Enterococos – Enterococci Confirmatory Agar), Mannitol Salt Agar e Agar MacConkey.

O Agar MacConkey é um meio seletivo, onde crescem apenas bactérias Gram negativas, e diferencial (diferencia bactérias Lactose positivas e negativas). Foi utilizado para verificar crescimento das linhagens de *P. aeruginosa* (bactéria Gram negativa).

Manitol também é um meio seletivo, no qual não crescem microrganismos Gram negativos nem estreptococos Gram positivos, e diferencial (diferencia bactérias que fermentam manitol das que não fermentam). Foi utilizado no estudo para verificar crescimento de *S. aureus*, que fermenta manitol mudando o indicador vermelho de fenol do meio, fazendo com que este passe de sua coloração original avermelhada para amarelo.

Por último, ME: também é um meio seletivo, no qual crescem apenas enterococos, cujas colônias, neste meio, apresentam-se avermelhadas. Foi, portanto, utilizado para confirmação de *E. faecalis*.

3.2. Compostos antimicrobianos

Os compostos carvacrol, eugenol, geraniol, terpineol e timol foram obtidos da empresa Sigma Aldrich do Brasil sendo cada composto contido em frasco âmbar nas quantidades de 10mL, 100mL, 100mL, 1000mL e 100g, respectivamente.

Timol foi fornecido na forma de um sal, sendo necessária diluição em solução filtrada 1:1 de DMSO (Dimetilsulfóxido) e água MilliQ; e agitação antes do uso. A

solução preparada pode ser conservada em temperatura de geladeira (4 a 6°C) por até dois meses.

3.3. Testes de sensibilidade para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foram preparadas placas de Petri com 20mL de volume final, constituído pela concentração do composto a ser testado e o meio de cultura: Agar Müeller-Hinton (MHA) + Tween 80 a 0,5%. Foram também preparadas placas de Petri contendo apenas o meio de cultura para controle do crescimento normal das amostras bacterianas. O Tween 80 é um agente dispersante cuja função é solubilizar compostos apolares, como os compostos antimicrobianos testados no estudo, facilitando a mistura destes ao meio de cultura.

Os ensaios foram realizados em triplicata e a concentração considerada de cada amostra para calcular a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (CLSI, 2008) foi tomada como a média dos três resultados obtidos em cada uma das repetições. As concentrações testadas variaram de 125 a 20.000 µg/mL (125, 250, 500, 1.000, 2.000, 4.000, 8.000, 12.000, 15.000 e 20.000 µg/mL). Para *P. aeruginosa* e *E. coli*, foram testadas também concentrações de 22.000 a 40.000 µg/mL (22.000, 24.000, 26.000, 28.000, 30.000, 35.000 e 40.000 µg/mL).

O preparo dos inóculos foi feito a partir do tubo estoque de cada cepa bacteriana, em tubos de BHI Caldo mantidos na estufa a 37°C por 24 horas e posteriormente padronizados, em salina estéril, na escala 0,5 de Mac Farland. De cada tubo contendo a suspensão bacteriana padronizada transferiu-se 200µL para novos tubos com BHI Caldo e, após agitação, 500µL de cada tubo foram transferidos para cada um dos 32 poços da base do multiinoculador de Steer, de modo que cada

poço recebeu uma cepa diferente. Em seguida, as placas preparadas com diferentes concentrações dos compostos, foram inoculadas com as 32 amostras contidas no multiinoculador. Após absorção das alíquotas dos inóculos, pelo meio de cultura, realizou-se incubação das placas em estufa a 37°C por 24 horas e posterior leitura dos resultados.

A Concentração Inibitória Mínima foi considerada como o valor da concentração do composto contida na placa em que não era verificado crescimento bacteriano, ou seja, formação de colônias. As leituras também foram realizadas para as placas de controle, verificando correta semeadura e crescimento normal das amostras em todos os ensaios.

3.4. Ensaios sobre Curva de Sobrevivência

A escolha das linhagem bacterianas para os ensaios das curvas de sobrevivência foi feita de acordo com os valores de CIM_{90%}, e utilizou-se exatamente os valores de CIM_{90%} obtidos previamente para os respectivos grupos bacterianos, nestes ensaios. Além dos testes realizados com essas linhagens, foram também realizados ensaios utilizando as cepas padrão ATCC de cada espécie bacteriana.

Para isso, foram utilizadas placas de Elisa estéreis de 24 poços contendo meio de cultura (Müeller-Hinton Caldo + Tween 80 a 0,5%) e os volumes dos compostos majoritários referentes às respectivas CIM_{90%}, de modo a completar um volume final de 2mL em cada poço da placa. Todos os poços, inclusive o controle, foram inoculados com 2µL das cepas previamente cultivadas em Caldo BHI a 37°C por 24 horas e padronizadas na escala 0,5 de Mac Farland, totalizando um inóculo de cerca de 10⁵UFC/mL. Em seguida, foram tomadas alíquotas, por alças calibradas

descartáveis de 1 ou 10 μL , a partir dos poços, nos tempos de 0; 2; 5; 10 e 24 horas; e semeadas, diretamente, em placas contendo TSA (Triplicate Soy Agar).

Também foram feitas diluições das alíquotas em solução salina estéril nas proporções de 1:100 ou 1:1000 para as respectivas semeaduras quando o crescimento bacteriano era bastante expressivo. Após 24 horas de incubação das placas a 37°C, foram realizadas as contagens de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em contador digital marca Phoenix, seguido dos cálculos de UFC/mL, e transformação destes valores nos respectivos Logaritmos de UFC/mL. Em função dos valores de Log de UFC/mL, foram preparados gráficos para determinar os perfis de redução ou aumento nas contagens bacterianas, para visualizar se os efeitos de cada composto sobre as respectivas bactérias foram bactericidas ou bacteriostáticos, resultados estes apresentados neste trabalho.

3.5. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para confrontar tratamentos independentes. Para comparações múltiplas entre os tratamentos, fez-se o Teste de Dunn e o Teste de Student-Newman-Keuls com análise significativa $p < 0,05$ e $p < 0,001$.

4. Resultados

Os resultados obtidos referem-se aos ensaios para verificação do potencial inibidor de crescimento de alguns compostos antimicrobianos considerados majoritários na composição de determinados óleos essenciais, sobre bactérias isoladas de materiais biológicos humanos e também sobre essas respectivas bactérias padrão ATCC. Também encontram-se aqui descritos os resultados das curvas de sobrevivência para verificação dos efeitos bactericida ou bacteriostático destes compostos sobre as mesmas bactérias.

Assim, tem-se na Tabela 1 apresentados os valores obtidos nos ensaios para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM_{50%} e CIM_{90%}) das bactérias do estudo, sob ação das diferentes concentrações testadas de cada um dos produtos antimicrobianos em questão.

Todos os compostos testados apresentaram efeito inibidor sobre as bactérias utilizadas no estudo, apesar de os valores de CIM_{90%} terem sido distintos de acordo com a espécie bacteriana. Assim, o maior potencial antimicrobiano foi verificado sobre as linhagens de *S. aureus*, enquanto que o menor, sobre as cepas de *P. aeruginosa*.

Tabela 1. Valores obtidos para CIM_{50%} e CIM_{90%} (mg/mL) para as espécies bacterianas do estudo, em função dos compostos antimicrobianos testados.

	Carvacrol		Eugenol		Geraniol		Terpineol		Timol	
	CIM _{50%}	CIM _{90%}	CIM _{50%}	CIM _{90%}	CIM _{50%}	CIM _{90%}	CIM _{50%}	CIM _{90%}	CIM _{50%}	CIM _{90%}
MRSA	0,50	0,50	1,00	1,00	0,35	0,47	0,75	1,75	0,18	0,24
MSSA	0,50	0,50	0,60	0,92	0,36	0,49	1,42	1,88	0,19	0,31
<i>S. aureus</i>										
(MRSA+MSSA+ATCC)	0,50	0,50	0,63	0,95	0,37	0,49	1,24	1,89	0,19	0,25
<i>E. faecalis</i>	1,67	3,36	1,45	2,40	0,45	0,88	6,67	11,00	2,77	3,75
<i>E. coli</i>	1,00	1,00	1,27	1,68	1,57	3,70	2,00	2,00	1,27	1,85
<i>P. aeruginosa</i>	18,57	31,60	19,16	37,33	25,07	37,01	25,07	37,01	17,27	38,67

Desta forma, e considerando a análise estatística dos resultados, foi possível fazer associações entre os potenciais antimicrobianos dos compostos sobre cada uma das espécies bacterianas, colocando as ações dos compostos em ordem decrescente de eficácia, conforme Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Potencial antimicrobiano dos compostos em ordem decrescente (*) segundo as espécies estudadas.

<i>E. faecalis</i>	Geraniol > Carvacrol = Eugenol > Timol > Terpineol
<i>E. coli</i>	Carvacrol > Eugenol = Timol > Geraniol = Terpineol
MRSA	Timol > Carvacrol = Geraniol > Eugenol = Terpineol
MSSA	Timol > Carvacrol = Geraniol > Eugenol > Terpineol
<i>P. aeruginosa</i>	Carvacrol = Eugenol = Timol > Geraniol = Terpineol

*A ordem decrescente de ação dos compostos diferem entre si quando $p < 0,05$.

Quanto aos testes sobre curva de sobrevivência, nos gráficos aqui apresentados (Figuras 1 a 9), são verificados os valores de Log de UFC/mL para os compostos antimicrobianos testados no valor de CIM_{90%}, em função do tempo, de acordo com as espécies bacterianas. Dependendo da variação de Log de UFC/mL na contagem é possível verificar se o efeito do produto testado foi bactericida ou bacteriostático.

É dito ter efeito bactericida a concentração do composto que faz com que a contagem de UFC/mL chegue à zero ou que não seja detectável pelo método utilizado, concluindo, portanto, a morte da bactéria. Enquanto é dito bacteriostática a concentração do composto que faz com que a contagem de UFC mantenha-se aproximadamente constante em função do tempo, ou seja, que atua inibindo a multiplicação e o crescimento bacteriano.

De acordo com a análise estatística (onde o resultado é significativo quando $p < 0,05$) para as curvas de sobrevivência, verificamos se houve diferença significativa entre as respectivas curvas obtidas para os compostos quando comparadas ao ensaio controle, também para cada uma das bactérias do estudo.

Desta forma, para as linhagens de *E. faecalis*, timol e terpineol foram os compostos majoritários mais eficientes, tendo zerado a contagem bacteriana no tempo de 10 horas; seguidos do geraniol e carvacrol, que zeraram a contagem em 24 horas (Figura 1). Carvacrol, geraniol, terpineol e timol apresentaram efeitos bactericidas, enquanto o eugenol foi apenas bacteriostático, tendo inibido o crescimento da bactéria entre os tempos 0 e 2 horas. Porém, não houve diferença significativa para os compostos quando comparados ao controle.

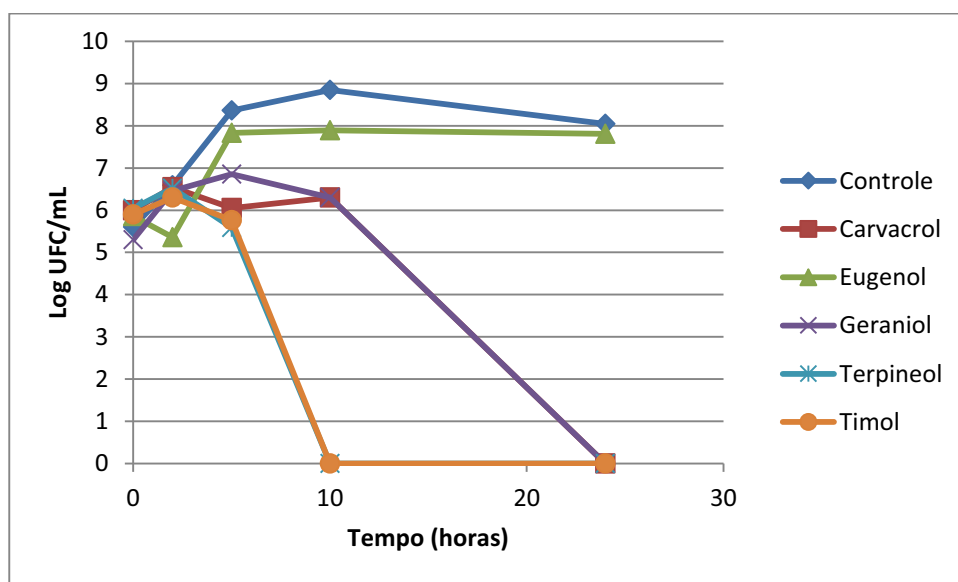


Figura 1. Log UFC/mL obtidos para a linhagem de *E. faecalis* frente aos compostos nas concentrações de CIM_{90%} em função do tempo.

Quanto à linhagem ATCC de *E. faecalis* (Figura 2) testada, o efeito de todos os compostos foi apenas bacteriostático, mantendo pequena queda na contagem de UFC e menor crescimento bacteriano quando comparado ao controle, formando

linhas quase constantes. Analisando a curva de sobrevivência de todos os compostos ao longo dos tempos, houve diferença significativa apenas entre as curvas obtidas para os ensaios: controle e carvacrol, e também entre controle e terpineol.

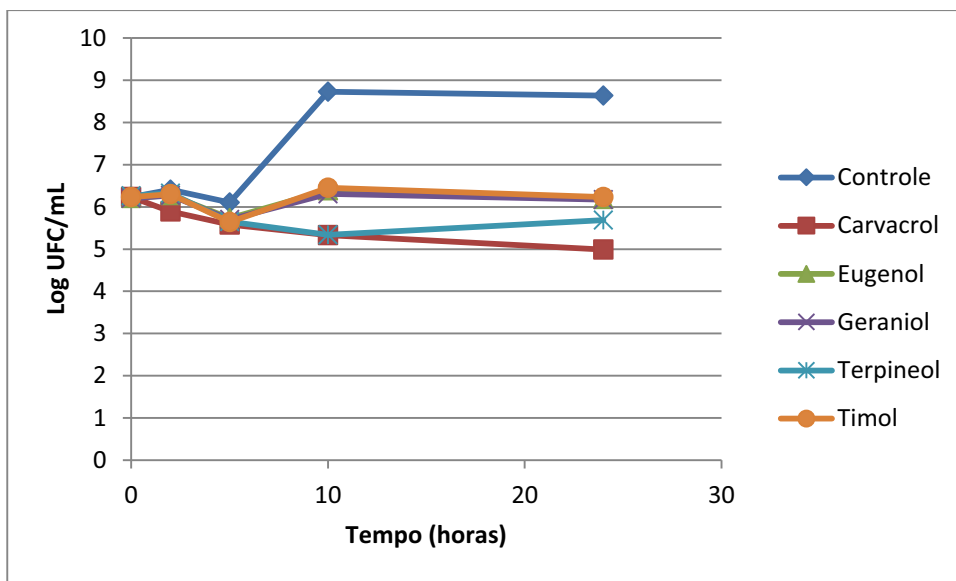


Figura 2. Log UFC/mL obtidos para a linhagem de *E. faecalis* ATCC frente aos compostos nas concentrações de CIM_{90%} em função do tempo.

Para *E. coli*, geraniol e terpineol foram os compostos mais eficientes, zerando a contagem bacteriana (Figura 3) e apresentando-se, portanto, bactericidas no tempo de 5 horas, enquanto que os demais antimicrobianos demonstraram atividade bacteriostática, mantendo crescimento bacteriano apenas menor quando comparado ao crescimento normal do controle (carvacrol e eugenol) ou apresentando uma pequena queda no crescimento bacteriano durante um período (timol, no período entre 2 e 5 horas). Porém, analisando estatisticamente as curvas, diz-se que houve diferença significativa apenas entre geraniol e: controle, carvacrol, eugenol, timol; e entre as curvas de terpineol e: controle, carvacrol, timol.

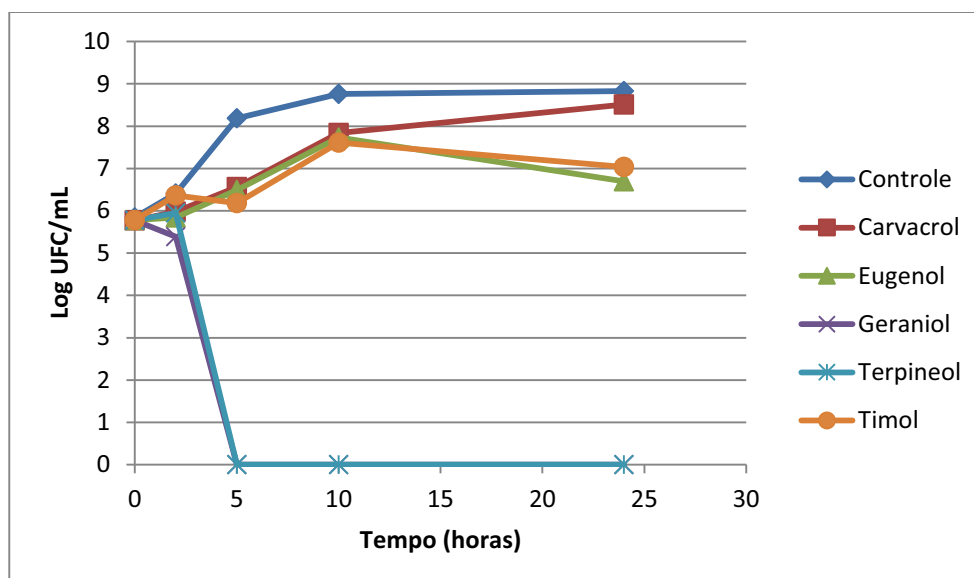


Figura 3. Log UFC/mL obtidos para a linhagem de *Escherichia coli* frente aos compostos nas concentrações de CIM_{90%} em função do tempo.

Para a amostra ATCC de *E. coli* (Figura 4) observa-se caráter bactericida apenas para o terpineol, no tempo de 5 horas; enquanto os demais compostos apresentaram caráter bacteriostático, inibindo o crescimento num determinado tempo (eugenol e geraniol entre os tempos 5 e 10 horas) ou mantendo uma constante de crescimento menor comparada ao crescimento normal do controle (carvacrol e timol). Assim, verificou-se que houve diferença significativa somente entre as curvas de terpineol e controle, e entre terpineol e todos os demais compostos testados.

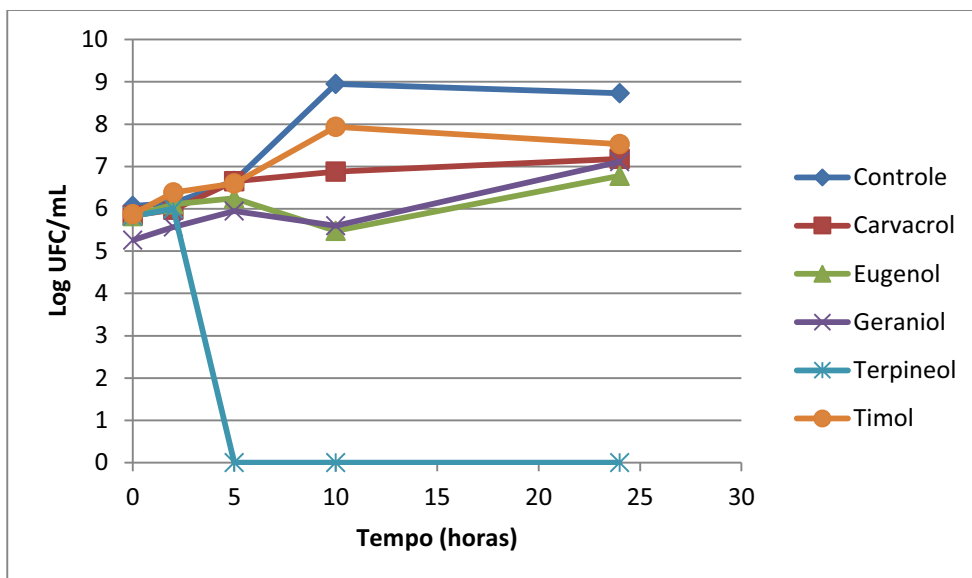


Figura 4. Log UFC/mL obtidos para a linhagem de *Escherichia coli* ATCC frente aos compostos nas concentrações de CIM_{90%} em função do tempo.

Para as linhagens MRSA, terpineol e geraniol foram os mais eficientes, tendo apresentado efeito bactericida no período de 24 horas, enquanto os demais compostos apresentaram efeito bacteriostático (Figura 5). Verificou-se diferença significativa apenas entre os ensaios de: controle e geraniol, e controle e terpineol.

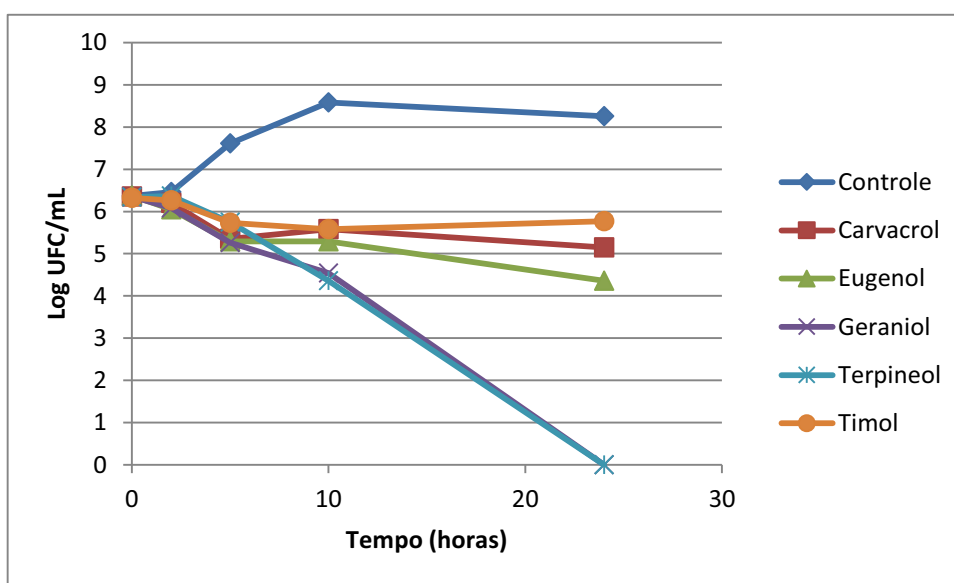


Figura 5. Log UFC/mL obtidos para a linhagem de *Staphylococcus aureus* Metilicina Resistente frente aos compostos nas concentrações de CIM_{90%} em função do tempo.

Referente as linhagens MSSA o eugenol e timol foram os mais eficazes, zerando a contagem bacteriana no tempo de 10 horas, seguidos do terpineol, que apresentou número não detectável para UFC/mL no período de 24 horas (Figura 6). Carvacrol e geraniol demonstraram caráter bacteriostático. Entretanto, estatisticamente houve diferença significativa apenas entre os ensaios de controle e timol.

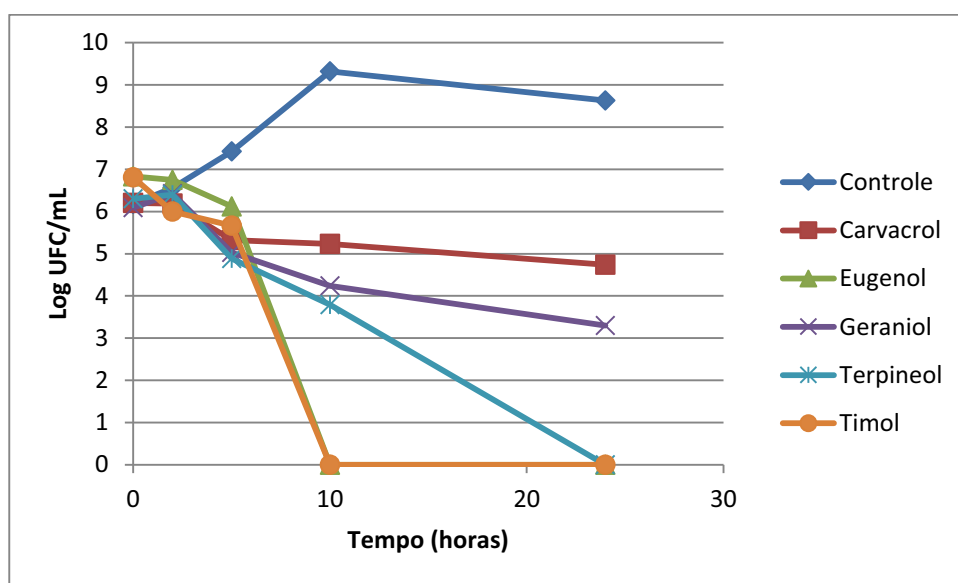


Figura 6. Log UFC/mL obtidos para a linhagem de *Staphylococcus aureus* Meticilina Sensível frente aos compostos nas concentrações de CIM_{90%} em função do tempo.

Para a cepa padrão ATCC de *S. aureus* (Figura 7), houve efeito bacteriostático frente todos os compostos majoritários testados, apenas diminuindo o crescimento bacteriano em relação ao controle. Para essa linhagem, houve diferença significativa para todas as curvas, utilizando os compostos testados, quando comparado ao ensaio controle, exceto entre as curvas de controle e timol.

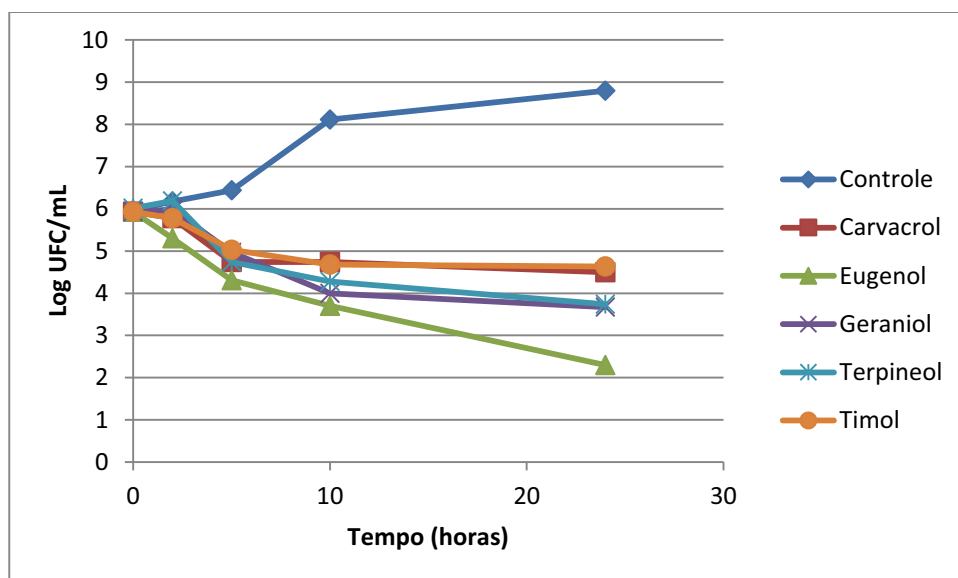


Figura 7. Log UFC/mL obtidos para a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC frente aos compostos nas concentrações de CIM_{90%} em função do tempo.

Já para *P. aeruginosa*, eugenol foi o composto majoritário mais eficiente, apresentando efeito bactericida no período de 5 horas; enquanto que os demais compostos foram apenas bacteriostáticos, mantendo constante o crescimento bacteriano, porém menor que o crescimento do controle (Figura 8). Estatisticamente, houve diferença significativa entre as curvas do controle e eugenol, bem como entre eugenol e os demais compostos testados.

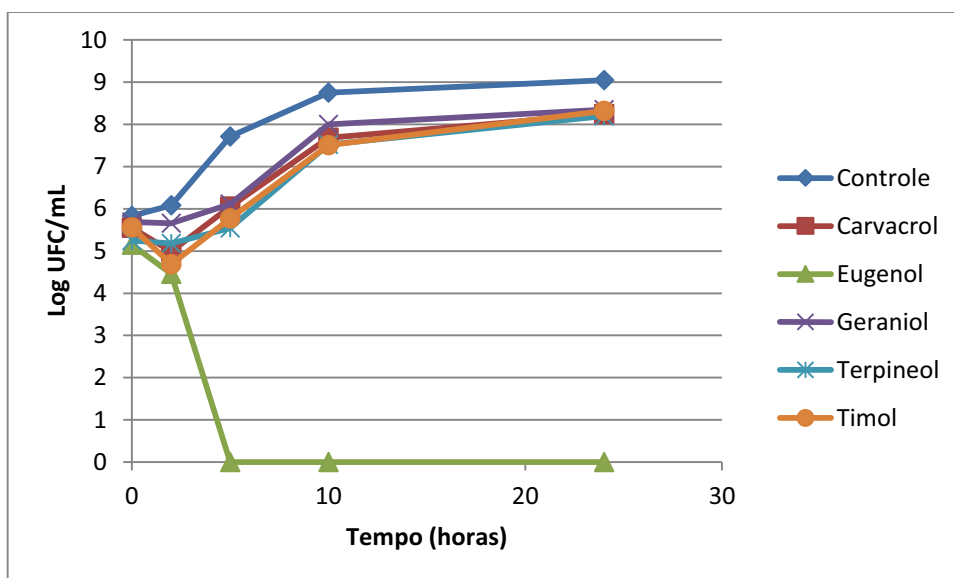


Figura 8. Log UFC/mL obtidos para a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* frente aos compostos nas concentrações de CIM_{90%} em função do tempo.

Para a linhagem ATCC de *P. aeruginosa*, os efeitos dos compostos foram similares aos da linhagem não ATCC: bacteriostático para todos os compostos, exceto para o eugenol: bactericida – dessa vez zerando a contagem bacteriana no tempo de 10 horas (Figura 9). E bem como para a linhagem não ATCC, houve diferença estatística significativa entre as curvas do controle e eugenol e entre eugenol e todos os demais compostos testados.

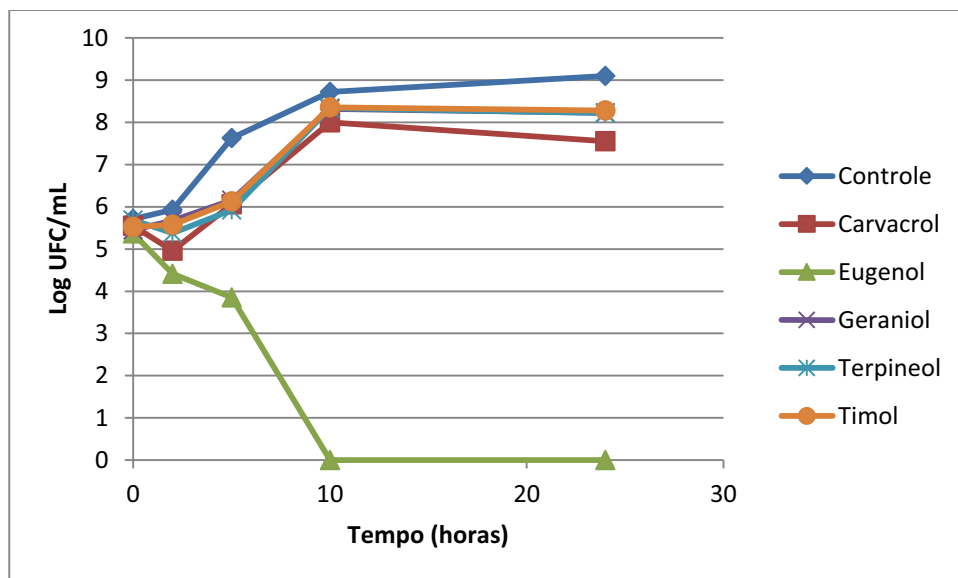


Figura 9. Log UFC/mL obtidos para a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC frente aos compostos nas concentrações de CIM_{90%} em função do tempo.

Também foram analisados os crescimentos de todas as bactérias em Log UFC/mL em função dos tempos de incubação em relação aos ensaios controle e para cada composto nas respectivas CIM_{90%}, e considerando o resultado com diferença significativa quando $p < 0,001$. Assim, para o controle, apenas não houve diferença estatística significativa entre os tempos de 0 e 2 horas, e de 10 e 24 horas. Para o carvacrol, não houve diferença significativa. Para o eugenol, os resultados foram significativos apenas entre os tempos de 0 e 10 horas e de 0 e 24 horas e apenas entre *P. aeruginosa* e: *E. faecalis*, *E. coli*, *E. faecalis* ATCC, *E. coli* ATCC; e entre *P. aeruginosa* ATCC e: *E. faecalis* e *E. coli*. Para o geraniol, houve diferença significativa apenas entre *E. coli* e: *P. aeruginosa*, *P. aeruginosa* ATCC e *E. faecalis* ATCC. Para o terpineol, os resultados foram significativos apenas entre os tempos 0 e 24 horas e 2 e 24 horas somente para *P. aeruginosa* e: *E. coli*, *E. coli* ATCC. Para o timol, houve diferença estatística significativa apenas entre *E. faecalis* e: *E. coli*, *E. coli* ATCC, *P. aeruginosa* ATCC; e entre MSSA e: *E. coli*, *E. coli* ATCC, *P. aeruginosa* ATCC.

5. Discussão

As pesquisas visando obtenção de novos compostos antimicrobianos, bem como o aprofundamento de estudos para os já conhecidos, tem recebido cada vez maiores destaque e importância, especialmente devido ao surgimento de linhagens bacterianas multirresistentes. Neste quadro, OEs e extratos de plantas apresentam-se potencialmente viáveis como princípios ativos na elaboração de fitoterápicos (BERTINI et al., 2005), demonstrado pelo seu caráter antimicrobiano, inclusive sobre bactérias patogênicas (PEREIRA et al., 2004; FERRONATTO et al., 2007). Considerando que a composição de OEs normalmente não corresponde a presença de uma única substância antimicrobiana, ou seja, não são substâncias puras, este estudo visou analisar a atividade antimicrobiana de alguns dos compostos majoritários encontrados em OEs (carvacrol, timol, eugenol, geraniol e terpineol), já com alguns relatos sobre suas respectivas propriedades antibacterianas (NOSTRO et al., 2007).

De modo geral, os resultados deste estudo permitiram concluir que os compostos majoritários testados podem ser utilizados no preparo de antimicrobianos como fitoterápicos, uma vez que revelaram caráter inibidor sobre bactérias isoladas de materiais clínicos humanos. Além disso, foi possível considerar tanto atividade bactericida como bacteriostática destes compostos sobre as espécies bacterianas utilizadas no estudo.

As diferentes ações dos compostos testados sobre cada bactéria devem-se tanto à constituição diferenciada das paredes de bactérias Gram positivas e Gram negativas, como as características químicas dos compostos majoritários testados.

Os compostos podem penetrar ou romper a camada lipídica das bactérias Gram negativas (KOYAMA et al., 1997). Essa camada é ausente na parede das Gram positivas, o que pode facilitar a penetração dos compostos nessas bactérias (BERTINI et al., 2005). Corroborando com esta informação, alguns estudos indicam que a susceptibilidade aos OEs é maior em bactérias Gram positivas comparada às Gram-negativas (BURT, 2004; HOLLEY; PATEL, 2005; SILVA, 2009). Além disso, os compostos majoritários dos OEs geralmente diferem quanto suas estruturas químicas, mecanismos e alvos no microrganismo.

Quanto à composição química dos óleos essenciais, é bastante variada e inclui diversas classes de compostos, como: saponinas, flavonóides, tiosulfatos, glucosinolatos (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010), taninos, quinonas, alcaloides e ácidos orgânicos (TAN et al., 2007), sendo os compostos fenólicos abundantes em espécies vegetais (EL-MASSRY et al., 2009; MAIER et al., 2009). Segundo Nascimento et al. (2007) e Martos et al. (2010), os óleos essenciais apresentam mais de 100 componentes, dos quais destacam-se os polifenóis, terpenos, monoterpenos e sesquiterpenos, sendo que alguns podem representar mais de 85% do conteúdo total do óleo. Quanto ao mecanismo de ação, os compostos aromáticos e fenólicos, por exemplo, atuam diretamente sobre a membrana plasmática da bactéria, alterando sua estrutura e funcionalidade (HOLLEY; PATEL, 2005).

Carvacrol e timol apresentam anéis fenólicos e ambos parecem atuar sobre a permeabilidade da membrana (LAMBERT et al., 2001), desintegrando a membrana externa presente na parede de bactérias Gram negativas, liberando os lipopolissacarídeos (LPS) de sua camada lipídica e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP (HELANDER et al., 1998). Eugenol é também um composto fenólico que demonstrou atuar na degradação da parede celular das

bactérias, provocando a sua lise celular (THOROSKI et al., 1989). Terpeneol é um terpeno e acredita-se que ele inibe a respiração oxidativa das bactérias e induz dilatação da membrana, provocando mudanças na sua permeabilidade (COX et al., 2000). Geraniol, por sua vez, é um monoterpeneo.

Pesquisas realizadas com o carvacrol já haviam reportado sua eficácia como conservante de alimentos, justificada pelo seu alto potencial antimicrobiano (SOUZA, 2006). Este composto já havia também demonstrado atividade inibitória sobre amostras de *Salmonella* Enteritidis (SILVA, et al., 2010) e de *Streptococcus mutans* (BARROSO, 2010). Em outro estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana do carvacrol e do geraniol, que mostraram inibir crescimento de *Salmonella* Typhimurium, e cepas resistentes à rifampicina desta bactéria (KIM et al., 1995).

Em nosso estudo, foi evidenciada a atividade antimicrobiana do carvacrol também sobre linhagens de *E. faecalis* ATCC e *S. aureus* ATCC quando comparadas aos ensaios controles; além de ser, entre os compostos testados, o mais eficiente sobre a linhagem de *E. coli* e *P. aeruginosa*. Além disso, o carvacrol também apresentou efeito bactericida sobre as linhagens de *E. faecalis* no final de 24 horas de experimentação. Geraniol demonstrou potencial antimicrobiano, frente às linhagens de *E. coli*, *S. aureus* ATCC e nos MRSA quando comparadas aos controles; além de ser também o composto antimicrobiano mais eficaz sobre a linhagem de *E. faecalis* ATCC. Também apresentou caráter bactericida sobre *E. faecalis* e MRSA no tempo de 24 horas e para *E. coli* após 5 horas de incubação.

Timol foi eficiente na inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* (BARROSO, 2010) e de MRSA (NOSTRO et al., 2004). No presente estudo, esse composto apresentou potencial antimicrobiano sobre a linhagem MSSA quando comparada ao controle, e mostrou-se, entre os compostos testados, ser o mais

eficiente para as linhagens de MSSA e MRSA; além de ter demonstrado potencial bactericida para *E. faecalis* e MSSA no período de 10 horas de incubação.

A atividade antimicrobiana de timol e eugenol sobre *E. coli* foi reportada por Tippayatum e Alterthum (2007); fato também verificado no presente estudo. Entretanto, neste, a *E. coli* foi inibida apenas pelo geraniol e terpineol, atingindo valor zero na contagem de UFC/mL, enquanto os demais compostos mostraram ter apenas efeito bacteriostático sobre ela. Todavia, é importante destacar que no estudo, no qual foram feitos ensaios sobre *E. coli*, foi testada apenas uma linhagem de *E. coli* ATCC (ATCC 25922), enquanto no presente estudo, foram testadas 15 amostras de *E. coli* e uma linhagem diferente de *E. coli* ATCC (*E. coli* ATCC 43895). Além disso, no estudo realizado por Tippayatum e Alterthum (2007) verificou-se apenas o valor da CIM destes compostos, não sendo calculado, portanto, o CIM_{90%} ou CIM_{50%}; nem realizados os ensaios sobre curva de sobrevivência. Entretanto, este mesmo estudo relatou efeito antimicrobiano de timol e eugenol sobre as linhagens de *S. aureus* ATCC, o que foi também verificado no presente estudo para o timol sobre essa bactéria, inclusive tendo sido utilizadas em ambas pesquisas a mesma cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Em nosso estudo, o eugenol apresentou efeito antimicrobiano também sobre as cepas de *P. aeruginosa* e *P. aeruginosa* ATCC quando comparadas aos seus respectivos controles; sendo entre os compostos testados, o mais eficiente para *P. aeruginosa*; e bactericida para MSSA e *P. aeruginosa* ATCC no período de 10 horas e para *P. aeruginosa* em 5 horas de incubação.

O terpineol já havia demonstrado seu amplo espectro de ação antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas (SHIMIZU et al., 2006). Ele é um composto encontrado na planta *Lithraea molleoides* e, especialmente na *Tea tree* (*Melaleuca*

alternifolia), cujo óleo essencial já demonstrou atividade inibitória sobre *S. aureus* (CARSON, et al., 2002). Segundo Machado (2011) o óleo essencial de Tea tree apresentou CIM90% (n=10) de 0,21mg/mL, sendo este valor considerado o melhor nos ensaios nos quais foram testados 27 óleos essenciais de uso na aromaterapia. O efeito inibidor do terpineol, composto majoritário desta planta, foi verificado também sobre as linhagens de *E. faecalis* ATCC, *E. coli*, *E. coli* ATCC, *S. aureus* ATCC e MRSA, quando comparadas aos seus respectivos controles. Além disso, terpineol demonstrou ser bactericida para *E. coli* e *E. coli* ATCC no tempo de 5 horas, para *E. faecalis* em 10 horas, e para MRSA e MSSA no tempo de 24 horas

Quanto aos valores de CIM, em estudo realizado por Probst (2012), com OE de cravo da Índia, os autores reportaram os resultados de CIM utilizando a metodologia da diluição em ágar e multiinoculador de Steer, com etapas semelhantes às realizadas nos procedimentos do presente estudo; e obteve valores a CIM_{90%} de 2,75mg/ml para *S. aureus* (MRSA+MSSA+ATCC), 2,71mg/ml para MRSA, 3,0mg/ml para MSSA e 30,03mg/ml para *P. aeruginosa* (PROBST, 2012). O eugenol é um composto encontrado no óleo essencial de cravo da Índia e obteve, no presente estudo, os seguintes valores a CIM_{90%}: 0,95mg/ml para *S. aureus* (MRSA+MSSA+ATCC), 1,00mg/ml para MRSA, 0,92mg/ml para MSSA (Tabela 3) e 37,33mg/ml para *P. aeruginosa* (Tabela 3). Os resultados obtidos para *S. aureus*, comparados aos do estudo com o OE, demonstram ser possível que o composto majoritário seja mais eficaz como produto antimicrobiano do que o OE em si. Entretanto, não se pode concluir o mesmo quando compara-se os resultados obtidos nos dois estudos para *P. aeruginosa*.

Assim, é importante destacar que as várias metodologias podem apresentar diferentes padrões de referência e adequação, e ensaios da mesma metodologia

também estão sujeitos a diferentes condições experimentais (OSTROSKY et al., 2008). Pode haver, por exemplo, diferença na sensibilidade entre as amostras bacterianas testadas em cada estudo, no número de amostras e até mesmo há a possibilidade de volatilização dos compostos majoritários, além de sua interação com a matéria orgânica presente no meio de cultura. Estes fatores podem influenciar os resultados e, portanto, não devem ser ignorados, o que evidencia a dificuldade em comparar diretamente os resultados obtidos neste estudo com outros já relatados na literatura (NASCIMENTO et al., 2007).

Apesar disso, a atividade antimicrobiana evidenciada neste estudo, pelos compostos majoritários testados, não pode ser ignorada, devendo servir de base para novas pesquisas.

6. Conclusão

Os resultados deste estudo permitem concluir que os compostos majoritários testados (carvacrol, eugenol, geraniol, terpineol e timol) são potencialmente viáveis como princípios ativos para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, uma vez que apresentaram caráter inibitório sobre as bactérias em questão (*E. faecalis*, *E. coli*, MRSA, MSSA e *P. aeruginosa*). Os compostos apresentaram diferentes respostas sobre os microrganismos analisados, demonstrando atividades bactericidas ou bacteriostáticas. Entretanto, novos estudos fazem-se necessários para o possível desenvolvimento de fitoterápicos eficazes e de baixo custo, e para aprofundar o conhecimento sobre esses compostos, especialmente relacionados à toxicidade dos mesmos.

7. Referências Bibliográficas

- ALVES, L.N.S., et al. Hemoculturas: estudo de prevalência dos microrganismos e o perfil de sensibilidade dos antibióticos utilizados em Unidade de Terapia Intensiva. **Journal of the Health Sciences Institute**, v.30, n.1, p.44-47, 2012.
- BARROSO, J.A. **Atividade do carvacrol e timol *in vivo* na inibição de *Streptococcus mutans* e experiência de cárie em crianças livres de cárie: um estudo longitudinal**, 2010. 204f Dissertação (Mestrado) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, Fortaleza, 2010.
- BERTINI, L.M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Revista Infarma**, v.17, n.314, p.80-3, 2005.
- BOUZA, E., et al. A European perspective on nosocomial urinary tract infections I. Report on the microbiology workload, etiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-003 study), 2001. **Clinical Microbiology and Infection**, v.7, n. 10, p.523-531, 2001.
- BURT, S., et al. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223-253, 2004.
- CARSON, C.F., et al. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.46, n. 6, p.1914-1920, 2002.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved Standard M100-S15. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. WAYNE, P.A., 2008.
- CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17. e ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO, 10. 2008. Pelotas – RS. Caracterização química do óleo essencial de *Origanum vulgare*: Análise da relação timol/carvacrol. **Anais**, 2008.
- COSGROVE, S.E.; KARCHMER, A.W.; CARMELI, Y. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin- Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, n.1, p.53-59, 2003.
- COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, 88, p.170–175, 2000.
- DUDAREVA, N., et al. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, p.417-440, 2006.
- EL-MASSRY, K.F., et al. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 57, p.5265-5270, 2009.

FERRONATO, R., et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.224-230, 2007.

HELANDER, I.M., et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, p.3590–3595, 1998.

HOLLEY, R. A., Patel, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oil and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, 27, p. 273-292, 2005.

KIM, J. M., et al. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. **Journal of Food Science**. v.60, n.6, p.1364-1368, 1995.

KLUYTMANS, J.A.J.W.; WERTHEIM, H.F.L. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. **Infection**, v.33, n.1, p.3-8, 2005.

KOYAMA, S., et al. A new substance (yoshinol) with an interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanese traditional tree (kiso hinoki), *Chamaecyparis obtusa*. **General Pharmacology**. v. 28, p. 797-804, 1997.

LAMBERT, R.J.W., et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, 91, p.453–462, 2001.

LIVERMORE D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p.634-40, 2002.

MACHADO, B.F.M.T. **Óleos essenciais: verificação da ação antimicrobiana in vitro, na água e sobre a microbiota da pele humana**, 2011, 111f Dissertação (Mestrado) – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, Botucatu, 2011.

MAIER, T., et al. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v.112, p.551-559, 2009.

MARTOS, M.V., et al. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour Fragrance Journal**. v. 25, p.13-19, 2010.

MITKA, M. Preventing surgical infection is more important than ever. **The Journal of the American Medical Association**. v.283, n.1, p.44-45, 2000.

NASCIMENTO, P.F.C., et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial de métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

NOGUEIRA, P.S.F., et al. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Revista de Enfermagem**, v.17, n.1, p.96-101, 2009.

NOSTRO, A., et al. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococci* to orégano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiolog Letters**, v.230, n.2, p.191-195, 2004.

NOSTRO, A., et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n.4, p.519-523, 2007.

OLIVEIRA, A.C.; KOVNER, C.T.; SILVA, R.S. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.18, n.2, p.233-239, 2010.

OSTROSKY, E.A., et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18. n.2, p.301-307, 2008.

PEREIRA, R.S., et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista Saúde Pública**, v. 38, n.2, p.326-328, 2004.

PERIAGO, P.M.; PALOP, A.; FERNANDEZ, P.S. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. **Food Science and Technology International**, v.7, n.6, p.487-492, 2001.

PROBST, I.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**, 2012. 102 f. Tese (Mestrado) – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, Botucatu, 2012.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3ª ed. Porto Alegre. Editora Artmed, 2006. 752p.

SANTOS, N.Q. **A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar**. Texto e Contexto Enfermagem – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA [s.n.]. v.13, p.64-70, 2004.

SHIMIZU, M.T., et al. Essential oil of *Lithraea molleoides* (Vell.): chemical composition and antimicrobial activity. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, n. 4, p.556-560, 2006.

SILVA, J.P.L., et al. Óleo essencial do orégano: interferência na composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30(Supl. 1), p.136-141, 2010.

SILVA, M.T.N., et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.11, n.3, p.257-262, 2009.

SOUZA, E.L. Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos, 2006. 140 f. Tese (Doutorado) – UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, Recife, 2006.

TAJKARIMI, M.M.; IBRAHIM, S.A.; CLIVER, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p.1199-1218, 2010.

TAN, M., et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the flower oil of *Russowia sogdiana* (Bunge) B. Fedtsch. (Asteraceae) from China. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p.197-200, 2007.

TEIXEIRA, P.J.Z., et al. Pneumonia associada à ventilação mecânica: impacto da multirresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.30, n.6, p.566-573, 2004.

THOROSKI, J., et al. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v.52, n.6, p.399– 403, 1989.

TIPPAYATUM, P.; CHONHENCHOB, V. Antibacterial activities of thymol, eugenol and nisin against some food spoilage bacteria. **Kasetsart Journal (Nat. Sci.)**. v.41, p.319-323, 2007.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª ed. São Paulo. Atheneu, 2008. 780p.

UENO, M.; JORGE, A.O.C. Caracterização de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina envolvidos em infecções nosocomiais, por meio de técnicas fenotípicas e análise de perfil plasmidial. **Revista biociências**, v.7, n.2, p.15-22, 2001.

Anexo I



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



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 06 de agosto de 2012

385/2012-CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Ary Fernandes Júnior
Departamento de Microbiologia e Imunologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezado Dr. Ary,

De ordem do Senhor Coordenador, informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4312-2012) "Ação antimicrobiana de compostos majoritários presentes em óleos essenciais sobre bactérias causadoras e infecções hospitalares", a ser conduzido por Priscila Martins Leal, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 06/08/2012.

Situação do Projeto: APROVADO. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

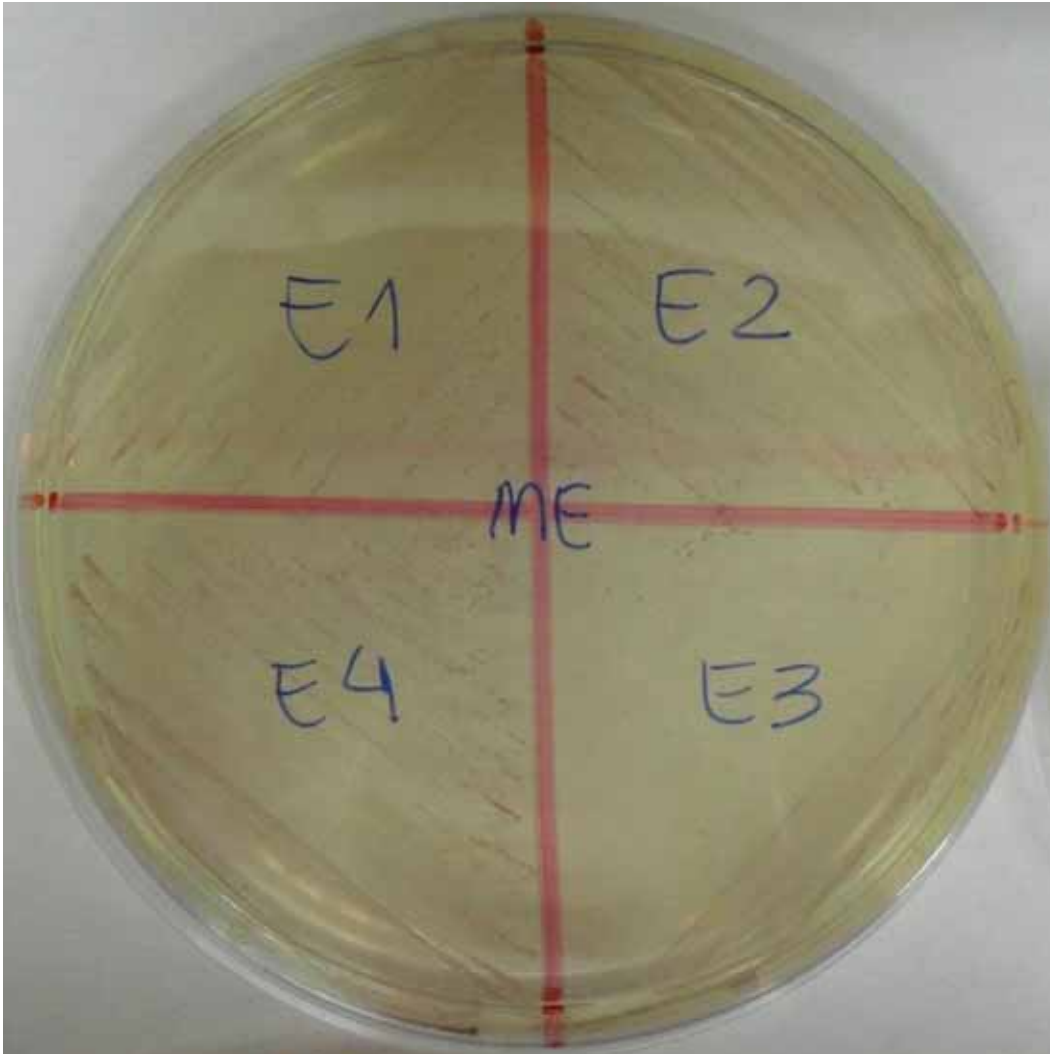
Anexo II

Figura 1. Placa de ME para verificar pureza de 4 amostras de *E. faecalis*. O crescimento de colônias avermelhadas indica tratar-se de enterococo. (Fonte: Priscila Martins Leal, 2013).

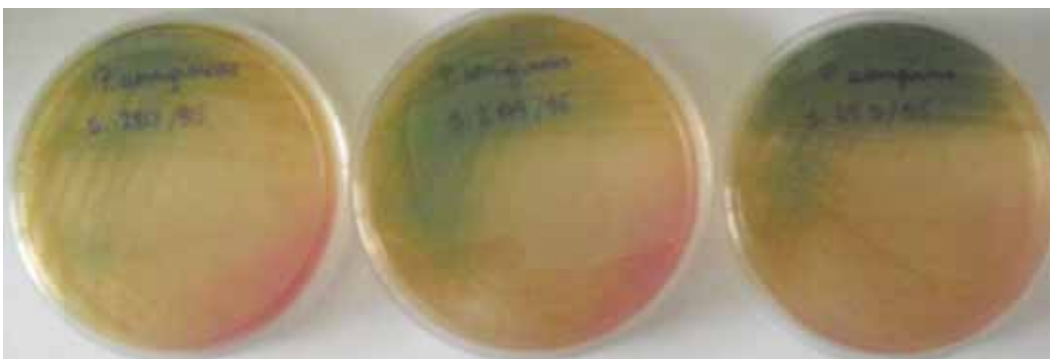


Figura 2. Placas de Agar MacConkey para verificar pureza de 3 linhagens de *P. aeruginosa*, cujas colônias tem coloração esverdeada. (Fonte: Priscila Martins Leal, 2013)



Figura 3. Placa de Mannitol Salt Agar para verificar pureza de duas amostras de MSSA. Apenas a amostra da direita trata-se de *S. aureus*, uma vez que essa bactéria faz o ágar ficar amarelo pois fermenta o manitol, mudando o indicador vermelho de fenol do meio. (Fonte: Priscila Martins Leal, 2013).

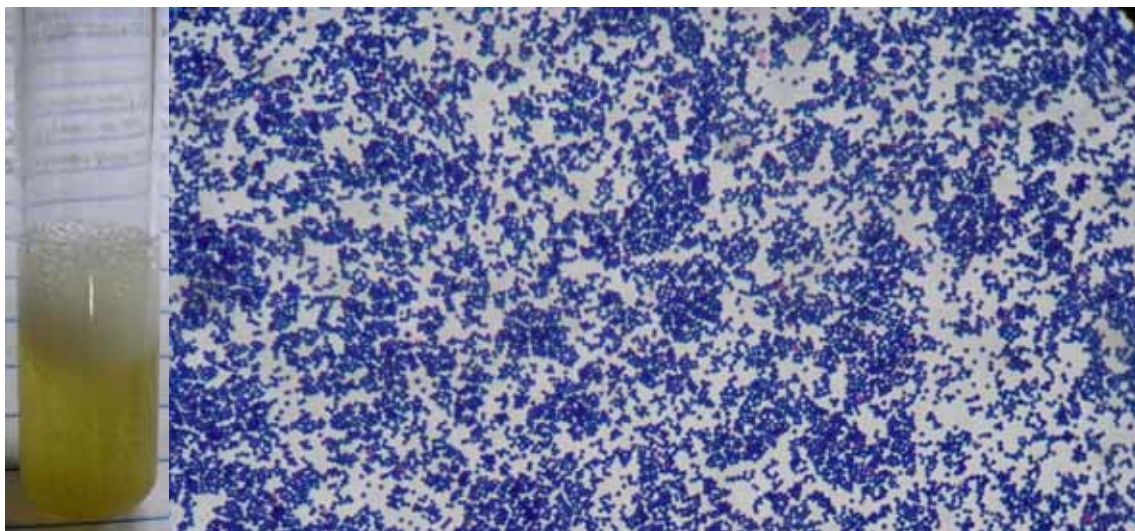


Figura 4. À esquerda: teste de catalase e à direita, coloração de Gram para *Staphylococcus aureus*: cocos Gram positivos e em cachos. (Fonte: Priscila Martins Leal, 2013).



Figura 5. Multiinoculador de Steer utilizado na etapa de determinação das CIM de acordo com a metodologia da diluição em agar. (Fonte: Priscila Martins Leal, 2013).



Figura 6. Multiinoculador de Steer: cada poço contendo uma cepa bacteriana. (Fonte: Priscila Martins Leal, 2013).



Figura 7. Placa com as bactérias recém inoculadas pelo Multiinoculador de Steer. (Fonte: Priscila Martins Leal, 2013).

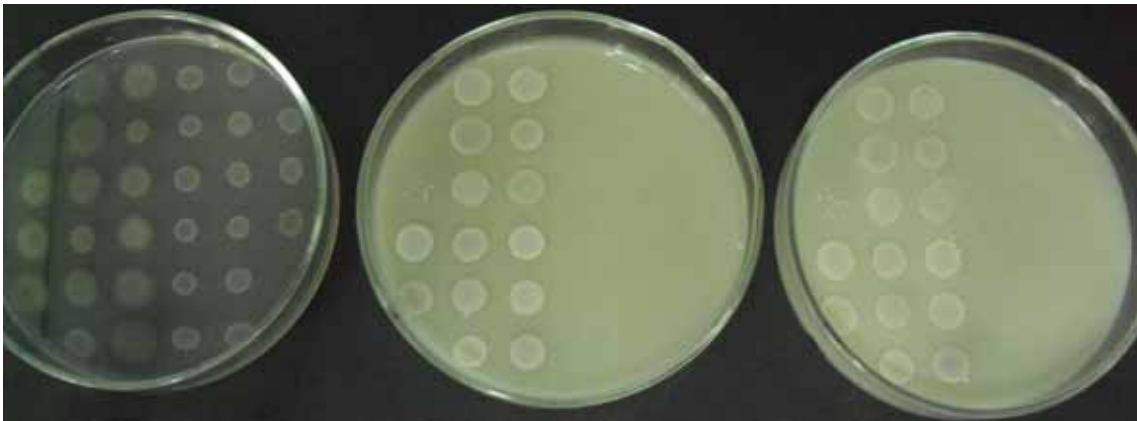


Figura 8. Placas contendo concentrações de terpineol (250 μ L, 15000 μ L e 20000 μ L respectivamente). As 15 primeiras bactérias (3 colunas da esquerda) são amostras de *P. aeruginosa*, enquanto os demais (3 colunas da direita) de *E. faecalis*. Verifica-se crescimento de todas as cepas na placa de 250 μ L e inibição das linhagens de *E. faecalis* na segunda placa, enquanto não houve inibição de *P. aeruginosa* neste ensaio. (Fonte: Priscila Martins Leal, 2013).



Figura 9. Placa de ELISA utilizada no ensaio sobre curva de sobrevivência de *P. aeruginosa* e *P. aeruginosa* ATCC, e para verificar resultados previamente obtidos para controle e eugenol sobre *E. faecalis*. (Fonte: Priscila Martins Leal, 2013).