

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

Flávia Pinho da Cunha Pedrosa

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINAIS
E AROMÁTICAS PERTENCENTES À CPMA – COLEÇÃO DE
PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS DO
CPQBA/UNICAMP**

**Botucatu - SP
2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

Flávia Pinho da Cunha Pedrosa

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINAIS
E AROMÁTICAS PERTENCENTES À CPMA – COLEÇÃO DE
PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS DO
CPQBA/UNICAMP**

Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu, como exigência parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Marta Cristina Teixeira Duarte

Supervisor: Ary Fernandes Júnior

**Botucatu-SP
2012**

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

Pedrosa, Flávia Pinho da Cunha.

Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas pertencentes à
CPMA - Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA - UNICAMP
/ Flávia Pinho da Cunha Pedrosa. – Botucatu : s[n.], 2012

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

Orientador: Marta Cristina Teixeira Duarte

Co-orientador: Ary Fernandes Júnior

Capes: 21202001

1. Essências e óleos essenciais – Uso terapêutico. 2. Plantas medicinais. 3.
Produtos de ação antimicrobiana.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; Concentração mínima inibitória;
Óleo essencial; Plantas medicinais.

“Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos, para sabermos o que seremos”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Marta Cristina Teixeira Duarte, pela oportunidade, exemplo de pesquisadora e por todos os ensinamentos. Obrigada pela amizade, confiança e abertura de novas oportunidades para minha carreira!

Aos companheiros do laboratório no CPQBA: Prof. Alexandre e Edilberto, Alessandra, Aline, Ana Paula, Ângela, Brunno, Camila, Caroline, Kleidir, Laura, Márcio, Raquel, Valéria e Vivian. Agradeço por toda a orientação, ajuda, amizade, risadas, cafês, caronas, almoços no bandeco. Que a amizade e o companheirismo continuem sempre no nosso laboratório.

Ao meu supervisor, Prof. Ary Fernandes Júnior, por todo auxílio prestado e apoio durante o ano todo. Muito obrigada por tudo!

À Dra. Renata Maria Teixeira Duarte por toda a ajuda na parte experimental. Obrigada pelos preciosos ensinamentos, por toda a paciência e amizade.

Aos meus queridos pais, Hermes e Regina, e minha irmã, Fernanda. Obrigada pelo apoio durante todos os anos da minha faculdade, incentivando-me a não desistir dos meus sonhos. Vocês são meu porto seguro. Amo vocês!

Ao meu namorado, Renato Fernandes Volf. Obrigada por todos estes anos de convivência, amizade, amor, paciência e companheirismo. Você é essencial na minha vida. E que venham mais e mais viagens inesquecíveis nas nossas vidas!! Te amo, meu amor!

À minha 2ª família: Celeide, Renato, Mariana e Nicolas. Vocês são meu 2º porto seguro. Obrigada por toda a amizade, carinho, risadas e convivência durante estes 10 anos. Adoro vocês! Ahh não poderia esquecer o tão e esperado sobrinho! Já te amo tanto, meu lindinho! Não vejo a hora de brincar, apertar, morder e te mimar muito.

Às minhas grandes amigas Cláudia, Gláucia e Rachel. Vocês estão sempre nos meus pensamentos e no coração. Sinto muita a falta de vocês no dia a dia! Cam e Anfe, obrigada por toda a ajuda durante o primeiro semestre em Botucatu. Sem a ajuda de vocês, nada disso estaria conquistado!

Ao Instituto de Biociências (UNESP – Botucatu), pela possibilidade de realização do estágio fora da instituição. Agradeço, em especial, Fátima Cavallari, Olga Demant e Iolanda Jeronimo por toda a ajuda com as “papeladas” e paciência nas orientações à distância.

Ao CPQBA/UNICAMP pela oportunidade do estágio e ótima infraestrutura.

À FAPESP, pelo apoio financeiro a este projeto.

RESUMO

A crescente resistência antimicrobiana a drogas e sua propagação no mundo são as maiores ameaças à saúde pública e ao tratamento de doenças acometidas por microrganismos. Recentemente o surgimento da resistência antibacteriana a múltiplos antibióticos aumentou drasticamente. Os óleos essenciais são compostos químicos complexos, voláteis e aromáticos extraídos de diversas partes das plantas como flores, folhas, frutos, sementes, raízes, brotos, entre outras. Plantas medicinais são usadas na medicina popular uma vez que apresentam um amplo espectro de atividade, como inibição de crescimento contra microrganismo, propriedades medicamentosas e flavorizantes bem como medicamentos, antibióticos, analgésicos, sedativos e anti-inflamatórios. A atividade biológica de extratos e óleos essenciais tem sido objeto de estudo científico atualmente. O uso de plantas medicinais como fonte de medicamentos é uma solução alternativa para terapêutica no tratamento de doenças. No Brasil estudos com esta finalidade são de grande importância, devido à biodiversidade da flora do país, portanto a necessidade da busca por novas fontes vegetais torna-se relevante. O presente estudo visa determinar a atividade antimicrobiana de 10 espécies medicinais pertencentes à CPMA – Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA/UNICAMP. Além disso, a identificação química e o fracionamento dos óleos essenciais e extrato com melhor atividade serão analisados e posteriormente será relacionada a melhor atividade antimicrobiana com a composição das frações mais ativas.

Palavras chaves: Atividade antimicrobiana; Concentração mínima inibitória; Óleo essencial; Plantas medicinais

ABSTRACT

The increase of the antimicrobial resistance and its propagation around the world are the biggest threats to the public health care and to the treatment of diseases caused by microorganisms. Nowadays the antimicrobial resistance has increased abruptly. The essential oils are volatile and aromatic compounds derived from parts of plants as flowers, leaves, fruits, seeds, roots, sprouts, among others. The activity of extracts and essential oils of several plant species have been recognized and studied by empirical methods since a long time, but its antimicrobial activities were confirmed recently. Medicinal plants are used in folk medicine as medicines, antibiotic, analgesic, sedative and anti-inflammatory. The use of medicinal plants like source of medicines is an alternative of therapeutics for diseases treatment. In Brazil, studies with this goal are very important, once medicinal plants have been used as a choice of treatment and prevention of infections and diseases in health areas. Considering the fact that some products from medicinal plants have antimicrobial properties it is expected that using screening programs, new potential medicaments could be developed. Otherwise, scientific researches focused on determining therapeutic potential of plants are limited, there are lack of scientific studies which confirms the potential antibiotics properties of a large number of plants. The aim of the present study is determinate the antimicrobial activity of 10 medicinal species belonging to CPMA - Collection of Medicinal and Aromatic Plants from CPQBA/UNICAMP. The minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal or fungicidal concentration (MBC) will be determined against the bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* and the yeast *Candida albicans*. Furthermore, will be conducted chemical identification and fractionation of essential oils and extract with better activity.

Keywords: Antimicrobial activity; Essential oil; Medicinal plants; Minimal inhibitory concentration

LISTA DE FIGURAS

Pag.

Figura 1- Sistema de extração de óleo essencial do tipo Clevenger	28
Figura 2- Cromatograma do óleo essencial de <i>E.caryophyllata</i>	38
Figura 3- Espectro de massas do eugenol	38
Figura 4- Cromatograma do óleo essencial de <i>O.tenuiflorum</i>	39
Figura 5- Espectro de massas do trans cariofileno	40
Figura 6- Cromatograma do óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	40
Figura 7- Espectro de massas do timol	42
Figura 8- Cromatograma do óleo essencial de <i>S. mycrophylla</i>	42
Figura 9- Espectro de massas do composto cariofileno	44
Figura 10- Placa cromatográfica dos óleos essenciais <i>E. caryophyllata</i> (1), <i>O. tenuiflorum</i> (2), <i>O. vulgare</i> (3) e <i>S. mycrophylla</i> (4), utilizado como eluente o diclorometano	45
Figura 11- Placa cromatográfica das frações do óleo de <i>E. caryophyllata</i>	46
Figura 12- Placa cromatográfica das frações do óleo de <i>O. tenuiflorum</i>	46
Figura 13- Placa cromatográfica das frações do óleo de <i>O. vulgare</i>	47
Figura 14- Placa cromatográfica das frações do óleo de <i>S.mycrophylla</i>	47

LISTA DE TABELAS

Pag.

Tabela 1- Plantas medicinais e aromáticas da CPMA utilizadas no estudo	27
Tabela 2- Rendimento (%) dos óleos essenciais estudados	34
Tabela 3- Concentração mínima inibitória (MIC - $\mu\text{g/mL}$), Concentração Bactericida / Fungicida Mínima e Razão (MBC/MFC:MIC) dos óleos essenciais com atividade antimicrobiana até 1000 $\mu\text{g/mL}$	35
Tabela 4- Composição química do óleo essencial de <i>E.caryophyllata</i>	38
Tabela 5- Composição química do óleo essencial de <i>O. tenuiflorum</i>	39
Tabela 6- Composição química do óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	41
Tabela 7- Composição química do óleo essencial de <i>S. mycophylla</i>	43
Tabela 8- Rendimento (%) em massa das frações dos óleos essenciais de melhor atividade antimicrobiana	48
Tabela 9- Concentração mínima inibitória (MIC - $\mu\text{g/mL}$), Concentração Bactericida Mínima e Razão (MBC/MIC) das frações do óleos essenciais com atividade antimicrobiana até 1000 $\mu\text{g/mL}$	49
Tabela 10- Composição química da fração 2 do óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	50
Tabela 11- Composição química da fração 3 do óleo essencial de <i>S. mycophylla</i>	51

SUMÁRIO

Pag.

Resumo	
Abstract	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 <i>Candida albicans</i>	12
1.2 <i>Escherichia coli</i>	13
1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1.4 <i>Salmonella choleraesuis</i>	16
1.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
1.6 Plantas medicinais e atividade antimicrobiana	19
1.7 Atividade anti <i>C. albicans</i>	19
1.8 Atividade anti <i>E. coli</i>	21
1.9 Atividade anti <i>P. aeruginosa</i>	22
1.10 Atividade anti <i>S. choleraesuis</i>	23
1.11 Atividade anti <i>S. aureus</i>	24
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
7. ANEXOS	67

1. INTRODUÇÃO

Em 1928, Alexandre Fleming, médico microbiologista, observou a inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* pela contaminação fúngica *Penicillium notatum*. O marco histórico da descoberta foi um grande avanço na medicina devido a importância no tratamento de doenças infecciosas no homem e em uso veterinário (TORTORA, 2004).

No entanto, o consumo mundial excessivo de antibióticos tem implicado na resistência bacteriana, ocasionando um sério problema de saúde pública. A resistência por certos microrganismos pode ter reflexo na terapêutica humana e animal, principalmente em relação às bactérias Gram negativas, devido à seleção de linhagens com resistência a múltiplas drogas.

Baquero & Blázquez (1997) organizaram uma revisão bibliográfica sobre a evolução da resistência a antibióticos. A resistência bacteriana é um dos maiores acontecimentos da evolução biológica contemporânea. Os antibióticos estão entre as poucas drogas que curam e reduzem os sintomas das doenças, sendo responsáveis pelo progresso da medicina moderna, como avanços na cirurgia, quimioterapia do câncer, transplante de órgãos, entre outros. No entanto, há o risco do retorno a era pré-antibiótica principalmente, devido à necessidade de descoberta de novos fármacos com esta finalidade.

De acordo com Solórzano-Santos (2011), os óleos essenciais são compostos naturais complexos, voláteis, aromáticos obtidos de diversas partes das plantas como flores, brotos, folhas, frutos, sementes, raízes, dentre outras. São constituídos por metabólitos secundários de plantas aromáticas, terpenos e seus derivados oxigenados, terpenóides (ésteres de ácidos aromáticos e alifáticos) e compostos fenólicos. Uma característica importante dos componentes do óleo essencial é a hidrofobicidade que permite interagir com os lipídeos da membrana celular bacteriana e mitocondrial, alterando a organização das estruturas celulares, tornando-as permeáveis. O extravazamento de moléculas e íons essenciais levará a morte celular dos microrganismos. Silva et al. (2003) relata que a exposição aos antifúngicos provoca danos à membrana celular, deixando-as solúveis e com fraturas significativas, o que acabam expondo o seu conteúdo celular.

A atividade biológica de óleos essenciais e extratos de plantas tem sido objeto de intensa investigação científica. Plantas superiores e aromáticas são amplamente utilizadas na medicina popular, bem como para aumentar o prazo de validade dos alimentos, uma vez que

apresentam um amplo espectro de atividade, com inibição de crescimento observada contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos (HULIN et al., 1998). Propriedades medicamentosas e flavorizantes também são aplicáveis a estes compostos bem como medicamentos, antibióticos, analgésicos, sedativos, antiinflamatórios, dentre outros (BAKKALI et al., 2008). Pode-se aumentar a eficácia de um composto antimicrobiano através do uso combinado deste com os óleos essenciais.

As propriedades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de diversas espécies vegetais têm sido reconhecidas e estudadas empiricamente durante séculos, mas foram cientificamente confirmadas apenas recentemente (ARANA SANCHEZ et al., 2010; KARPANEN et al., 2010; LORENZI et al., 2009). O uso de plantas como fonte para medicamentos é predominante em países em desenvolvimento. Trata-se de uma solução alternativa para a terapêutica de problemas de saúde e está bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África (SHALE et al., 1999). No Brasil, estudos com esta finalidade são de grande importância, uma vez que plantas medicinais têm sido utilizadas em várias áreas da saúde como forma alternativa de tratamento e prevenção de infecções e doenças.

Uma vez que as plantas medicinais possuem uma grande variedade de substâncias com propriedade antimicrobiana, é esperado que através de programas de triagem haja uma possibilidade de descoberta de compostos potenciais para o desenvolvimento de novos antibióticos. No entanto, as pesquisas científicas visando determinar o potencial terapêutico das plantas são limitadas, havendo falta de estudos científicos experimentais que confirmem as possíveis propriedades antibióticas de um grande número de plantas.

De acordo com Yamamoto & Ogawa (2002), o extrato etanólico de semente de *Perilla* sem lipídeos inibe fracamente o crescimento de cepas bacterianas orais patogênicas. O extrato de acetato de etila obtido do extrato etanólico por partição exibiu forte atividade antimicrobiana contra *Streptococcus* oral e outras cepas de *Porphyromonas gingivalis*. A atividade antimicrobiana de óleo essencial de *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* foi constatada por Dorman & Deans (2000), corroborando com o estudo de Kivanc & Akagul (1986). O óleo essencial apresenta atividade antibacteriana efetiva tanto em bactérias gram-positivas e como em gram-negativas, contrastando com o resultados encontrados por Zaika (1988), Hussein (1990) e Smith-Palmer et al. (1998).

Nicolls (1970) evidenciou a atividade antifúngica presente em plantas da família Passifloraceae, particularmente nas espécies *Passiflora caerulea*, *Passiflora edulis* e

Passiflora mollissima. Bimer & Nicolls (1973) sugeriram que o agente antibacteriano e antifúngico de Passifloraceae pertence ao grupo de componentes do poliacetileno. A atividade antibiótica do acetileno e poliacetileno são conhecidas em grupos de plantas e fungos superiores. A ação dos componentes do acetileno é a inibição da germinação e do crescimento micelial de alguns grupos de fungos (ALLEN & THOMAS, 1971; THOMAS & ALLEN, 1970; LECHNER et al., 1970).

1.1 *Candida albicans*

É um fungo oportunista que causa infecções sistêmicas em pessoas predispostas, normalmente pacientes com o sistema imunológico debilitado - como pacientes HIV positivos - ou que foram submetidos a tratamento prolongado com certos medicamentos, como os antibióticos (ZHANG et al., 2002). Vive juntamente com outros microrganismos de maneira comensal no trato gastrointestinal, cavidade oral, sangue e no sistema genital de hospedeiros. Em circunstâncias normais não causam efeito nocivo ao homem, porém de acordo com Ryan & Ray (2004) ao reagir a estímulos ambientais, tais como, alterações no mecanismo de defesa ou comprometimento nas barreiras anatômicas do hospedeiro (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003), podem tornar-se patogênica. Assim, a forma unicelular do tipo levedura da *C. albicans* transforma-se em uma forma filamentosa, multicelular e invasiva, infectando o tecido do hospedeiro.

A espécie *C. albicans* tem um grande potencial patogênico amplamente conhecido, apresentando como principais fatores de patogenicidade e virulência (CHAKRABARTI et al., 1991; DIGNANI et al., 2003):

- Capacidade de aderência a diversos substratos como mucosas e epitélios.
- Produção do tubo germinativo como consequência da transformação em estruturas filamentosas, que auxiliam na invasão tecidual.
- Termotolerância significativa
- Produção de enzimas extracelulares como proteinases e fosfolipases.

De acordo com Price (1982), a enzima fosfolipase B localiza-se na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo. Ela representa um fator importante para o processo de infecção, porque age na hidrólise de fosfolipídeos, dando origem a lipofosfolipídeos que causam danos à célula epitelial. Além disso, a proteinase secretada pela

C. albicans, as classificadas como proteínases aspartil secretadas (Sap), são também responsáveis pela patogenicidade destes fungos (HUBE & NAGLIK, 2001; CALDERONE & FONZI, 2001).

Estas enzimas são codificadas por 10 famílias de genes Sap, com peso molecular que varia entre 35 e 50 kDa. (FELK et al., 2000; MONOD et al., 1994; MONOD et al., 1998) e são essenciais para o crescimento do fungo, quando utilizada como única fonte de nitrogênio (HUBE et al., 1994; HUBE et al., 1997a). A produção de Sap está associada com uma série de atributos de virulência da *C. albicans*, incluindo formação de hifas, adesão e mudança fenotípica nas quais destacam-se o envolvimento complexo das Saps na patogenicidade (NAGLIK et al., 2003a).

Os azóis são drogas de baixa incidência de efeitos colaterais. Sua ação, assim como a anfotericina B, envolve a ligação dos polienos ao esterol (mais especificamente, o ergosterol) da membrana celular de fungos sensíveis, formando poros ou canais. O resultado seria o extravasamento de pequenas moléculas devido ao aumento da permeabilidade da membrana celular, levando a morte celular (BERGOLD & GEORGIADIS, 2004).

A espécie *C. albicans* adquiriu resistência a muitos antifúngicos potentes, inclusive há casos de resistência adquirida a azólicos em pacientes que foram expostos prolongadamente a estas drogas (NUCCI & COLOMBO, 2002). Os azóis ainda apresentam desvantagens da resistência cruzada aos antimicrobianos, resultando na coresistência, ou seja, a presença de muitos mecanismos que caracterizam-se pela resistência a um único hospedeiro, levando a resistência a múltiplos fármacos com características bioquímicas semelhantes as quais o microrganismo não havia sido exposto (PELLEGRINO et al., 2002; WILLIAMS & LEMKE, 2002; MCGOWAN, 2006).

A anfotericina B é um antibiótico que apresenta efeitos adversos significativos, como nefrotoxicidade e febre com episódios de calafrios, dentre outros (GOODMAND & GILMAN, 1996). É uma substância fungistática e fungicida isolada de cepas de *Streptomyces nodosus*. Seu espectro de ação inclui todas as espécies do gênero *Candida*, algumas espécies de *Aspergillus*, *Blastomyces dermatitidis*, entre outros fungos (BATISTA et al., 1999).

1.2 Escherichia coli

A bactéria *Escherichia coli* pertence à família Enterobacteriaceae. É um bacilo gram-negativo anaeróbio facultativo, fermentadora de lactose e glicose, produtora de ácidos e gases.

Habita comensalmente a microbiota anaeróbia intestinal normal do homem, de mamíferos e aves (DRASAR & HILL, 1974). Apesar desta relação ecológica, muitas cepas de *Escherichia coli* são comprovadamente nocivas ao homem (LEVINE, 1987) e para outros animais (BETTELHEIM, 2002). É utilizada em pesquisa básica, principalmente na genética molecular e tecnologia do DNA recombinante, devido a grande facilidade de manipulação deste microrganismo.

De acordo com a literatura, todas as linhagens de *E. coli* foram inicialmente classificadas como enteropatogênicas (EPEC), mas conforme estudos foram feitos a respeito dos mecanismos de patogenicidade, novas classes da linhagem de *E. coli* foram agrupadas (KAPER, 1994). Estas classes são associadas a sorogrupos particulares definidos pelo antígeno somático “O” do lipopolissacarídeo da membrana externa da bactéria. De acordo com Levine (1987) atualmente há várias classes de *E. coli* diarreagênicas, dentre elas, as chamadas enteropatogênicas (EPEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroinvasivas (EIEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroagregativas (EaggEC), associadas a diarreia hemolítica (DHEC) e produtoras de toxina citolética (CDT).

Para que uma bactéria possa iniciar um processo infeccioso e desenvolver um quadro patológico, é necessário apresentar certos atributos especiais de virulência ou fatores de virulência. Estes fatores permitem que linhagens de *E. coli* iniciem um evento infeccioso, através de processos de colonização, invasão e produção de toxinas (LEVINE et al., 1987). Diversos quadros patológicos, como por exemplo, gastroenterites, infecções urinárias, septicemia ou meningites podem ser ocasionadas pela bactéria *E. coli* (HANSON et al., 1988; LEVINE et al., 1987; LEVINE, 1987).

Embora *E. coli* seja encontrada livre no ambiente e atue como um comensal no intestino de mamíferos, a transferência horizontal de genes tem permitido mudanças fenotípicas de algumas linhagens de bactérias comensais para patógenos (BAUMLER et al., 1997). Para que uma infecção seja bem sucedida é necessário que haja uma interação entre patógeno e hospedeiro, a nível celular e molecular. Deste modo, é indispensável que na superfície da célula bacteriana existam estruturas que reajam com sítios específicos presentes nas membranas das células de determinados tecidos do hospedeiro, permitindo a adesão, multiplicação in loco e colonização do tecido pelo patógeno.

O uso abusivo de medicamentos antimicrobicidas pode explicar o fato do aumento da resistência a drogas por parte de certos grupos de microrganismos, com reflexos na terapêutica humana e animal, principalmente no que diz respeito a bactérias gram-negativas,

devido à seleção de linhagens apresentando resistência a múltiplas drogas. Em vários países, incluindo o Brasil, antibióticos vêm sendo aplicados como aditivos em rações, para promover crescimento animal e também para prevenção ou tratamento de algumas doenças específicas (VALLE, 1985). O uso destes medicamentos de maneira indireta e em longo prazo pode dar origem a seleção de cepas resistentes (TAVARES, 1990).

1.3 Pseudomonas aeruginosa

É uma bactéria em forma de bastonete gram negativa, não fermentadora encontrada em diversos ambientes ou associadas a animais e plantas, causando infecções oportunistas. Normalmente aeróbia restrita, no entanto pode crescer em ambientes anaeróbios na presença de íons nitrato. É um microrganismo ubíquo, no entanto, pouco presente na microbiota de indivíduos saudáveis.

Pseudomonas aeruginosa é um agente de infecções nosocomiais graves, com elevada letalidade (PELLEGRINO, 2002; OSMON, 2004; SAFDAR, 2004). Atualmente, posiciona-se também entre os principais agentes de infecções hospitalares, assim como *Staphylococcus coagulase negativo* e o *S. aureus* (SADER et al., 2001). O trato gastrointestinal é um dos principais locais de colonização e reservatório de *P.aeruginosa*, podendo ser encontrada em outros locais também, como orofaringe, mucosa nasal, axilas e períneo (KISKA & GILLIAN, 2003).

Em um estudo feito por Figueiredo et al. 2007, houve uma taxa de resistência cruzada entre 22,9% e 38,1%, nos fármacos carbapenêmicos e a piperacilina em associação com tazobactam e as drogas comumente utilizadas como adjuvantes no tratamento das infecções graves transmitidas por *Pseudomonas* como os aminoglicosídeos e quinolonas. Este resultado demonstra a dificuldade nas opções de associação de antimicrobianos para tratamentos combinados.

Dentre os mecanismos responsáveis pela resistência as drogas destacam-se: baixa permeabilidade da membrana externa, sistema de efluxo, produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, alterações do alvo das fluoroquinolonas e produção de β - lactamases (LI et al. 1994).

Estudos latino-americanos vêm mostrando uma redução significativa da ação deste grupo de antimicrobianos contra a *P. aeruginosa* em decorrência da produção de metallo-beta-lactamases na região (ANDRADE et al., 2003; BAYRAM et al., 2006; GALES et al.,

2007), indicando taxas de susceptibilidade de 64% (KIFFER et al. 2003; SADE et al. 2005), muito próximas aos resultados encontrados nos estudos de Figueiredo et al., 2007. Apesar de controverso, o uso de esquemas combinados de antimicrobianos parece eficiente para pacientes com infecções graves por *Pseudomonas*, particularmente as infecções com bacteremia (SAFDAR et al. 2004).

Do ponto de vista da microbiologia, estudos feitos por Figueiredo et al. (2007) mostrou que a amicacina é o melhor fármaco para associação de antimicrobianos devido à maior sensibilidade e menor resistência cruzada com os carbapenêmicos e beta-lactâmicos. Adicionalmente, o menor potencial dos aminoglicosídeos em induzir múltipla resistência bacteriana em relação às quinolonas (NSEIR et al. 2005). Contudo não podemos excluir o risco de nefrotoxicidade e ototoxicidade (compromimento da função auditiva e/ou sistema vestibular periférico) induzidos pelos aminoglicosídeos (GILBERT, 2005), resultando em lesões significativas.

No entanto, a associação de antimicrobianos com quinolonas, apesar da sua menor toxicidade parece ser desvantajosa, pois além da elevada frequência de resistência às quinolonas, a resistência cruzada com os carbapenêmicos e beta-lactâmicos ficam em torno de 30% a 40%, reduzindo o potencial terapêutico da associação (FIGUEIREDO et al., 2007).

1.4 Salmonella choleraesuis

As salmonelas são bactérias do tipo bastonetes gram-negativas, não esporuladas, anaeróbias facultativas e amplamente distribuídas no ambiente. Seus principais reservatórios são o homem e os animais (BRENNER et al., 2000). Doenças alimentares causadas por *Salmonella* ocorrem pelo número significativo de determinada linhagem do gênero (JAY, 2005). São tipicamente fermentadoras de glicose e manose, sem produção de gás. Não fermentam substratos como a lactose e sacarose, todavia a maioria produz ácido sulfídrico (BROOKS et al., 2009).

Salmonella pode causar estado de infecção assintomático ou sintomático no homem. As manifestações clínicas causadas pela bactéria incluem: febre entérica, gastroenterite, bacteremia, endocardites, entre outras (MAHON & MANUSELIS, 2000; VIDAL et al., 2003). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Salmonella* spp foi o agente etiológico mais prevalente nas doenças transmitidas por alimentos no período de 1999 a 2004 no Brasil. O tratamento da salmonelose com medicamentos antimicrobianos

não é recomendado para os casos que acometem indivíduos saudáveis. No entanto o uso de antimicrobianos é recomendado em idosos, pacientes muito jovens ou imunocomprometidos e quando há infecção extraintestinal.

De acordo com Kovarz et al. (1994) e Jay (2005) epidemiologicamente, as salmonelas podem ser distribuídas em três grupos, dentre os quais a *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis faz parte do grupo de serovares adaptados a hospedeiros específicos. Alguns podem ser patogênicos ao homem e, eventualmente, podem vir a ser veiculados pela alimentação. Como exemplo podemos citar: *S. enterica* ser. Gallinarum (frango), *S. enterica* ser. Dublin (bovino), *S. enterica* ser. Abortus-equi (cavalo), *S. enterica* ser. Abortus-ovis (ovelha) e *S. enterica* ser. Choleraesuis (suíno).

Segundo Wray & Sojka (1977), animais infectados com *Salmonella* são as maiores fontes de infecção para o homem e outros animais. Assim, é importante o monitoramento constante e a identificação dos sorovares, além do estabelecimento da relação epidemiológica ao longo da cadeia de produção. A resistência aos antimicrobianos também deve ser determinada para verificar se há aquisição e disseminação desse perfil (EFSA, 2008b).

As salmonelas exprimem fatores de virulência que participam de diferentes mecanismos patogênicos. A maioria destes fatores é determinada por genes cromossomais, muitos destes localizados dentro das denominadas “ilhas de patogenicidade”. Tratam-se de grandes regiões cromossomais da célula bacteriana que carregam um ou mais genes de virulência (SCHMIDT & HENSEL, 2004).

A peculiaridade da *Salmonella* na atenuação dos mecanismos imunológico do hospedeiro baseia-se em atributos estruturais e fisiológicos que agem tanto sinergicamente, quanto independentemente, para promover sua sobrevivência e crescimento no hospedeiro. Entre tais fatores incluem-se: fimbrias, adesinas, hemaglutininas, polipeptídeos, flagelos, polissacarídeos de membrana, resistência à fagocitose por macrófagos, porinas, resistência ao soro plasmídeos de virulência, resistência a antibióticos, toxinas (enterotoxinas e citotoxina) entre outros fatores (CARRAMIÑANA et al., 1997).

1.5 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria de grande interesse médico, pois está relacionada a diversas infecções em seres humanos. Pode provocar doenças desde infecções como espinhas, furúnculos ou celulites até infecções graves como pneumonia, endocardites, meningites,

dentre outras. Pertencentes ao grupo dos cocos gram e catalase positivas, não possuem mobilidade, não esporulados e geralmente não encapsulados. Normalmente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Podem apresentar-se em diferentes formas como isoladas, aos pares, em cadeias curtas ou agrupados irregularmente (CASSETARI et al., 2005; KONEMAN et al., 2001; TRABULSI & ALTHERTHUM et al., 2005).

O gênero pertence à família Micrococcae atualmente com 33 espécies, sendo que 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (CASSETARI et al., 2005; KONEMAN et al., 2001). A distribuição da espécie *S. aureus* é ampla, visto que a bactéria é resistente à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável em partículas de poeira.

As doenças provocadas pela bactéria *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta nos tecidos, por bacteremia primária, ou seja, pela presença da bactéria na corrente sanguínea, causando infecção, neste caso, primária ou, exclusivamente, devido às toxinas produzidas pela bactéria (ANDRIOLO, 2005; BRAUNWALD et al., 2002; SCHECHTER & MARANGONI, 1998).

Num primeiro momento, *S. aureus* adere à pele ou a mucosa para, em seguida, romper a barreira epitelial, comprometendo estruturas de ligações intercelulares, como desmossomos e junções de aderência (IWATSUKI, 2006.). Após a invasão do epitélio, o microrganismo utiliza-se de diversas formas de estratégias para garantir sua sobrevivência, tais como, opsonização do complemento, neutralização da fagocitose e inibição da resposta imunológica humoral e celular.

O grande potencial da *S. aureus* não está restrita apenas capacidade de invasão, multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também a sua habilidade de produção de toxinas e enzimas com poder patogênico, por exemplo, betalactamase, coagulase, hialuronidase e catalase. Dentre as toxinas produzidas, podemos citar alfa, beta e gama toxinas, leucocidina, esfoliatina e enterotoxina (BRAUNWALD et al., 2002; SCHECHTER & MARANGONI, 1998 NOVICK, 2007).

S. aureus é um agente de infecção hospitalar, considerada um dos maiores patógenos nosocomial responsável por inativar ação de vários antibióticos, tornando um grande impedimento para a saúde pública (STRATTON, 2000). A bactéria adquiriu resistência quase todos os antimicrobianos, com exceção da vancomicina, entretanto, há relatos de cepas de *S. aureus* resistentes a este antibiótico. (CDC, 1997; FREITAS & FONSECA, 1987).

1.5 PLANTAS MEDICINAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A problemática da resistência de microrganismos patógenos a inúmeras drogas é atualmente reconhecida, sendo a procura de novos antibióticos a partir de espécies vegetais, uma das medidas mais indicadas para solucionar este impasse. Óleos essenciais e extratos de plantas medicinais apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de microrganismos incluindo espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (CARSON et al., 1995; CARSON & RILEY, 1995; DUARTE, 2006). Ainda que indústrias farmacêuticas venham produzindo um número significativo de novos antibióticos nas últimas três décadas, o aumento da resistência de microrganismos para essas drogas é atualmente reconhecido (NASCIMENTO et al., 2000).

A resistência microbiana aos antibióticos no mercado está aumentando e a perspectiva para o uso de drogas antimicrobianas no futuro é ainda incerta. Assim, ações devem ser tomadas para reduzir esse problema, por exemplo, para controlar o uso de antibióticos, deve haver o desenvolvimento de pesquisas para melhor entendimento e compreensão do mecanismo genético de resistência, dando continuidade aos estudos para o desenvolvimento de novas drogas, sintéticas ou naturais (PRASHAR et al., 2003).

1.6 Atividade anti *Candida albicans*

Atualmente, muitos estudos em diferentes países têm avaliado a inibição de *C. albicans* por extratos, óleos essenciais e substâncias isoladas de plantas. Estas substâncias extraídas das plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de fungos relacionados a infecções superficiais da pele (ADAM et al., 1998), de bactérias patogênicas bucais (CECANHO et al., 1999), e de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias gram-negativas e gram-positivas (GALLI et al., 1985). No entanto as informações disponíveis sobre plantas medicinais ativas contra a levedura *C. albicans* não resultou, até o momento, em formulações para uso humano ou animal, exceto algumas patentes utilizando material derivado de plantas da família do *Allium* (PLUMMER, 1992), de *Radix gentianae* (CHEN, 1998) e cinco extratos de plantas estudados por LEE et al. (2003).

Duarte et al. (2005) investigaram óleos essenciais e extratos etanólicos obtidos de 35 plantas medicinais comumente usadas no Brasil para atividade anti *C. albicans*. Os óleos essenciais de 13 plantas mostraram atividade anti *Candida* incluindo *Aloysia triphylla*,

Anthemis nobilis, *Cymbopogon martinii*, *C. winterianus*, *Cyperus articulatus*, *C. rotundus*, *Lippia alba*, *Mentha arvensis*, *M. piperita*, *Mentha* sp., *Mikania glomerata*, *Stachys byzantina* e *Solidago chilensis* com concentrações mínimas inibitórias de 0,25 a 2,0 mg/mL.

Um levantamento de plantas medicinais usadas para tratar micoses comuns foi feito na cidade de Curitubam - Sergipe, por Cruz et al. (2007). Cem habitantes foram entrevistados por agentes de saúde, e quatro diferentes plantas foram as mais citadas (mais do que 50% das citações): *Ziziphus joazeiro*, *Caesalpinia pyramidalis*, *Bumelia sartorum* e *Hymenea courbaril*. Os extratos aquosos obtidos de diferentes partes dessas plantas foram submetidos ao teste de difusão em gota de ágar para triagem primária da atividade antimicrobiana. Somente o extrato aquoso de infusão de *Z. joazeiro* e *C. pyramidalis* apresentaram atividade significativa contra alguns microrganismos, entre eles, *C. guilliermondii*, *C. albicans*, quando comparados com o padrão anfotericina B.

Barbaro (2009) avaliou a atividade *in vitro* de óleos essenciais das seguintes plantas: *Zingiber officinalis*, *Coriandrum sativum*, *Cominum cyminum*, *Crocus sativus*, *Thymus vulgaris*, *Myristica fragrans* e *Ocimum basilicum*. Como resultado, a autora encontrou que óleos de *Cominum cyminum* e *O. basilicum* foram os que tiveram melhor atuação frente à *Candida glabrata* apresentando halos de inibição ≥ 150 mm. Para *C. parapsilosis* e *C. krusei*, o *Cominum cyminum* que apresentou maior atividade, obtendo-se halos de inibição de 90 mm, no entanto frente a diferentes cepas de *C. albicans* houve variação no tamanho dos halos de inibição para os diferentes óleos testados, demonstrando-se que existe variação na susceptibilidade entre as linhagens de um mesmo microrganismo. Sartoratto et al. (2004) e Duarte et al. (2005) compararam atividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos de plantas aromáticas brasileiras e obtiveram como resultados: para os óleos de *Thymus vulgaris* e *O. basilicum* concentração mínima inibitória de 2.000 $\mu\text{g/mL}$ e > 2.000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente para *C. albicans* - ATCC 10231.

Outros autores em diversos países pesquisaram sobre a atividade anti *Candida* de plantas medicinais usadas tradicionalmente, identificando espécies ativas, como é o caso de plantas medicinais de Venda (STEENKAMP et al., 2007), de *Euphorbia fusiformis*, uma espécie medicinal rara (NATARAJAN et al., 2007), e de plantas medicinais da Turquia (OSKAY & SARI, 2007).

1.7 Atividade anti *Escherichia coli*

A relação entre resistência a drogas e síntese de enterotoxinas foi estudada por vários autores (SCALETSKY, 1982; SCALETSKY et al., 1982b; SILVA et al., 1982). Usualmente estas características são codificadas por plasmídeos independentes (SCALETSKY et al., 1982b; SILVA et al., 1982), sendo de baixa frequência a ocorrência de plasmídeos codificando simultaneamente resistência a drogas e síntese de um ou outros tipos de enterotoxinas.

Resistência a antibióticos é um fenômeno que ocorre amplamente em ETEC. Estas linhagens transportam geralmente cinco ou mais tipos distintos de plasmídeos, sendo que frequentemente um ou mais são plasmídeos de resistência (R) que confere resistência a antibióticos específicos. (ELWELL & SHIPLEY, 1980; SILVA et al., 1982).

Estudos feito por Rauha et al. (2000) envolvendo 13 substâncias fenólicas e 29 extratos preparados à partir de plantas finlandesas foram avaliados quanto a atividade contra *Aspergillus niger*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *P. aeruginosa*, *S. cerevisiae*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. As substâncias flavona, quercetina e naringenina foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos. O extrato vegetal mais efetivo foi lisimáquia púrpura (*Lythrum salicaria* L.) contra *C. albicans*. A maioria dos demais extratos inibiu o crescimento das bactérias estudadas.

Schuck et al. (2001) encontrou como resultados de seus estudos que o infuso de folhas secas de *Cymbopogon citratus* apresentou atividade contra *S. aureus* e *E. coli*. O decocto de folhas secas demonstrou atividade frente ao *S. aureus*, obtendo-se para ambos, halos de inibição inferiores ao padrão cloranfenicol.

O óleo de citral apresentou melhor ação antimicrobiana, quando comparado com o óleo limoneno, obtendo-se halos de inibição superiores ao padrão de nistatina, apesar da menor quantidade empregada. O óleo volátil foi ativo, em especial, contra *S. aureus* e *C. albicans*, superando os valores de inibição dos antibióticos padrões. Os resultados obtidos sugerem que a inibição do crescimento do microrganismo seria devido à volatilização do óleo na placa. Nos testes em que se utilizou o inóculo de *C. albicans* nas concentrações de 1 e 2% e 20 mL do óleo volátil, não houve crescimento da levedura nas placas, porém, na concentração de 4%, ao redor da zona de inibição formada, observaram-se pequenas colônias da mesma. Empregando-se o inóculo de *C. albicans* a 1% observou-se que o óleo de citral e

o óleo volátil ocasionaram inibição total do microrganismo, nas quantidades de 5 e 20 μL , respectivamente (SCHUCK et al., 2001).

Delaquis et al. (2002) estudaram a concentração mínima inibitória de óleos essenciais sobre bactérias gram positivas e negativas e sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os óleos essenciais de *Anethum graveolens* L., *Eucalyptus dives* e sementes e folhas de *C. sativum* foram obtidos por destilação, fracionados e analisados por cromatografia gasosa. O óleo essencial das sementes e folhas de *C. sativum* mostram-se efetivos contra *Pseudomonas fragi*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *S. cerevisiae* e principalmente contra *Listeria monocytogenes*.

De acordo com os estudos de Lo Cantore et al. (2004), foi observada uma significativa atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Coriandrum sativum* e *Foeniculum vulgare*, contra dois micopatógenos, sendo uma espécie responsável por doenças no cultivo de cogumelos comestíveis, 27 espécies de bactérias fitopatogênicas, *E. coli* e *Bacillus magaterium*. A avaliação foi feita por testes de difusão em agar indicando que os dois óleos essenciais avaliados possuem alto efeito antimicrobiano, podendo ser usado como bactericida natural para controle de doenças de plantas.

Sagdic & Ozcan (2003) estudaram a atividade de hidrosóis de ervas contra bactérias, incluindo *E. coli* ATCC 25022 e *E. coli* O157:H7. O orégano e segurelha de verão foram efetivos contra todas as bactérias durante incubação. Além disso, estes autores estudaram dezoito extratos de ervas comumente consumidas ao redor do mundo. Estas espécies foram testadas contra 23 linhagens de bactérias, para comparação de seus efeitos antibacterianos com 11 antibióticos (SAGDIC et al., 2003). Dentre os patógenos, *E. coli* ATCC 25922 cultivada em caldo nutriente foi inibida pelos extratos de *Helichrysum compactum*.

1.8 Atividade anti *Pseudomonas aeruginosa*

Entre as espécies de bactérias gram negativas, *P. aeruginosa* demonstra maior facilidade de desenvolvimento de resistência aos antibióticos convencionais, para isto, estudos com plantas medicinais estão sendo desenvolvidos no Brasil e em diversos países no mundo.

A espécie *Psidium guajava* é reconhecida popularmente como medicinal, sendo utilizada contra cólicas e diarreias, e características diuréticas (MOURA, 1978; MORALES et al., 1994; ALMEIDA et al., 1995). Adicionalmente apresenta ainda atividade antimicrobiana (JAIARJ et al., 1999) e hipoglicemiante (ROMAN-RAMOS et al., 1995). Seus extratos, *in*

vitro, têm mostrado efeito inibitório para diferentes microrganismos (ANDRIANTSOA, 1983; CÁRCERES et al., 1993; SANTOS et al., 1998). Vários autores demonstram a atividade do extrato aquoso da folha contra diversas espécies, tais como, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Sarcina lutea*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus albus* e *S. aureus* (SANTOS et al., 1998, NASCIMENTO et al., 2000; JIMÉNEZ, 1979; GNAN & DEMELHO, 1999).

Os extratos hidroalcoólicos do caule e da folha de *Psidium guajava* apresentaram uma concentração mínima inibitória de 1,2 mg/mL e 1,8 mg/mL, para os microrganismos *Shigella* spp e *P.aeruginosa*, respectivamente. Estes resultados corroboram com a literatura científica em relação à *P.aeruginosa* (NASCIMENTO et al., 2000). O efeito frente à *P. aeruginosa* foi muito sutil quanto à produção de halo de inibição pela metodologia MAPO (FIO CRUZ/ INCQS, 1992) o que corrobora com o estudo de Longbottom et al. (2004), que confirmaram a tolerância da *P. aeruginosa* frente ao óleo essencial. Hammer et al. (2004) verificou em seus estudos que alterações nas propriedades de membrana da *C. albicans* desencadearam o processo de inibição, sendo possivelmente uma explicação para a produção de halo de inibição pelo método em questão.

1.9 Atividade anti *Salmonella choleraesuis*

De acordo com Silvestri (2010), avaliou diferentes concentrações do óleo essencial de *Eugenia caryophyllata* Thunb, popularmente conhecido como cravo-da-índia. O óleo essencial desta espécie tem como principal componente majoritário o eugenol. Silvestri (2010) estudou a ação antimicrobiana do cravo-da-índia para diversas bactérias gram positivas como *S. aureus* e gram negativas como *S. choleraesuis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, dentre outras. Somente *S. choleraesuis* mostrou-se sensível significativamente ao óleo essencial nas três concentrações de 5 µL, 10 µL e 15 µL.

A ação antibacteriana dos componentes de óleos essenciais pode ocorrer de três diferentes formas: pela interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular; pelo aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; e por alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos, incluindo aqueles envolvidos na produção de energia celular e síntese de componentes estruturais ou por inativação e destruição do material genético (KALEMBA & KUNICKA, 2003; DELAMARE et al., 2007).

Aligianis et al. (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como: forte inibição - MIC até 500 µg/mL; inibição moderada – MIC entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - MIC acima de 1600 µg/mL.

As concentrações mínimas inibitórias (CIM) das bactérias gram positivas apresentaram variação de 0,2 mg.mL⁻¹ (*S. aureus*) a 0,6 mg.mL⁻¹ (*Streptococcus mutans*). Já a variação das CIM das bactérias gram negativas foi de 0,5 mg.mL⁻¹ (*S. choleraesuis*, *Enterobacter cloacae* e *Serratia* sp.) a 0,8 mg.mL⁻¹ (*P. aeruginosa*). Estes resultados são da mesma ordem de magnitude dos resultados encontrados com óleo essencial de *Origanum majorana* (BUSATTA et al., 2008), *Thymus vulgaris* L. (KALPOUTZAKIS et al., 2001), *Salvia* sp. (TEPE et al., 2004), *Melissa officinalis* (MIMICA-DUKIC et al., 2004) e *Origanum vulgare* L. (BUSATTA et al., 2007).

1.10 Atividade anti *Staphylococcus aureus*

A resistência das diversas espécies bacterianas aos antimicrobianos é extremamente variável entre os países, origem hospitalar ou comunitária das estirpes. Algumas espécies apresentam resistência amplamente difundida em todo o mundo, como é o caso da *S. aureus*. No Brasil, atualmente, os estafilococos tanto o *S. aureus* como o *S. epidermidis* mostram-se resistentes à penicilina G, ampicilina e amoxicilina em mais de 70% das cepas isoladas, seja em ambiente hospitalar ou na comunidade (DUARTE et al., 1994; PINTO et al., 1996; RANGEL et al., 1995; SADER, 1998; SANTOS FILHO et al., 1994).

Plantas medicinais como o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) demonstrou atividade inibitória contra *S. aureus* nas concentrações 100%, 50% e 25% a partir da solução aquosa a 1%. Todavia não houve atividade na concentração de 10% e variações na comparação dos resultados no período de incubação de 24 e 48 horas (SOUSA & CONCEIÇÃO, 2007). Estes resultados corroboram com os estudos feitos por Porte & Godoy (2001), onde existe uma alta sensibilidade de bactérias gram positivas ao óleo essencial de alecrim, incluindo *S. aureus*, *Micrococcus* sp e *Sarcina* sp, bem como a levedura *Saccharomyces cerevisidae*.

Gnan & Demello (1999) mencionam uma atividade frente ao microrganismo *S. aureus* no extrato aquoso da folha *Psidium guajava* na concentração de 6,5 mg/mL. Por outro lado, a atividade antibiótica do extrato aquoso da folha desta espécie (numa concentração acima de 5 g/mL) foi observada tanto nos *S. aureus* quanto nos *Streptococcus* β-hemolíticos.

De acordo com Hussein et al., 1997 estudos químicos com extratos obtidos de *Punica granatum* L. tem revelado a presença de compostos polifenólicos como os glicosídeos flavonóides e taninos (1,2,4-tri-O-galloyl-fl-glucopyranose e 1,3,4-tri-O-galloyl-fl-glucopyrano). A atividade antimicrobiana desta espécie tem sido relatada em vários estudos, como por exemplo, Navarro et al., 1996, que relata a atividade contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Prashanth et al., 2001 estudou a sua ação contra *S. aureus* MTCC 737, *E.coli* MTCC 723 e em outros microorganismos. Machado et al., 2003 confirmou a atividade desta espécie vegetal contra cepas de *S. aureus* meticilina resistentes e sensíveis.

O extrato da casca do caule de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) possui atividade antimicrobiana em diferentes organismos como *Morganella morganii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella typhi* (LAURENS et.al., 1992). A capacidade de inibição do crescimento de microorganismos desta resina é uma das características farmacológicas mais conhecidas e comprovadas cientificamente (SALOMÃO et al., 2007). Pesquisadores têm demonstrado tal atividade frente a diversos microorganismos como *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *S.typhinurium* e *S.enteritidis*. (PARK et al., 1998).

2. OBJETIVOS

a) Determinar a atividade antimicrobiana, ou seja, a concentração mínima inibitória – MIC de óleos essenciais de 8 espécies medicinais e dos extratos de *Passiflora incarnata* e *Perilla frutescens* pertencentes à CPMA, para os microrganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e a levedura *Candida albicans*;

b) Determinar a concentração bactericida/fungicida mínima (MBC/MFC), respectivamente dos óleos essenciais e extratos de melhores atividades antimicrobianas;

c) Identificar quimicamente e fracionar os óleos essenciais e os extratos de melhor atividade antimicrobiana;

d) Determinar a atividade antimicrobiana das frações dos óleos e extrato de melhor atividade, visando relacionar a atividade com a composição das frações mais ativas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécies medicinais

Foram estudadas 10 plantas medicinais e/ou aromáticas pertencentes à Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA/UNICAMP – CPMA. No entanto, durante o desenvolvimento do projeto, algumas espécies foram substituídas devido à quantidade insuficiente de folhas das espécies na Coleção, para obtenção do óleo essencial.

Apesar da CPMA ser fiel depositária junto ao CGEN, foi solicitada autorização para estudo das plantas nativas junto ao CNPq (Anexo 1). Na Tabela 1 estão discriminadas as espécies vegetais utilizadas no presente estudo.

Tabela 1. Plantas medicinais e aromáticas da CPMA utilizadas no estudo

Nome Científico	Nome Popular	Origem	No. CPMA
<i>Bixa orellana</i>	Urucum	N	252
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Cravo da Índia	E	455
<i>Melissa officinalis L. Balm</i>	Melissa, erva cidreira	E	2363
<i>Melissa officinalis L. citronela</i>	Vassoura-do-campo	E	2362
<i>Ocimum basilicum</i>	Manjerição escuro	E	2361
<i>Ocimum tenuiflorum L.</i>	Manjerição roxo	E	2367
<i>Origanum vulgare hirtum</i>	Orégano grego	E	2360
<i>Passiflora incarnata L.</i>	Maracujá-verdadeiro	E	2365
<i>Perilla frutescens</i>	Perilla verde	E	2359
<i>Salvia microphylla</i>	Melhoral	E	2192

N: nativa; E: exótica; No.: número

3.2 Manutenção e cultivo das espécies na CPMA/ CPQBA-UNICAMP

As espécies atualmente mantidas na CPMA foram cultivadas em canteiros sob irrigação, no campo do CPQBA, visando manutenção e produção para garantir material suficiente aos estudos.

3.3 Obtenção dos óleos essenciais para triagem da atividade antimicrobiana

As extrações dos óleos essenciais foram realizadas por hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger, pesando-se cerca de 100 g das partes aéreas da planta fresca em balão de fundo redondo de 1000 mL, adicionando-se 700 mL de água destilada e procedendo-se à destilação por 2 horas.

Em seguida, a fase aquosa foi extraída com diclorometano e a fase orgânica obtida foi submetida à secagem com sulfato de sódio anidro, filtrada em algodão e o solvente evaporado à secura.

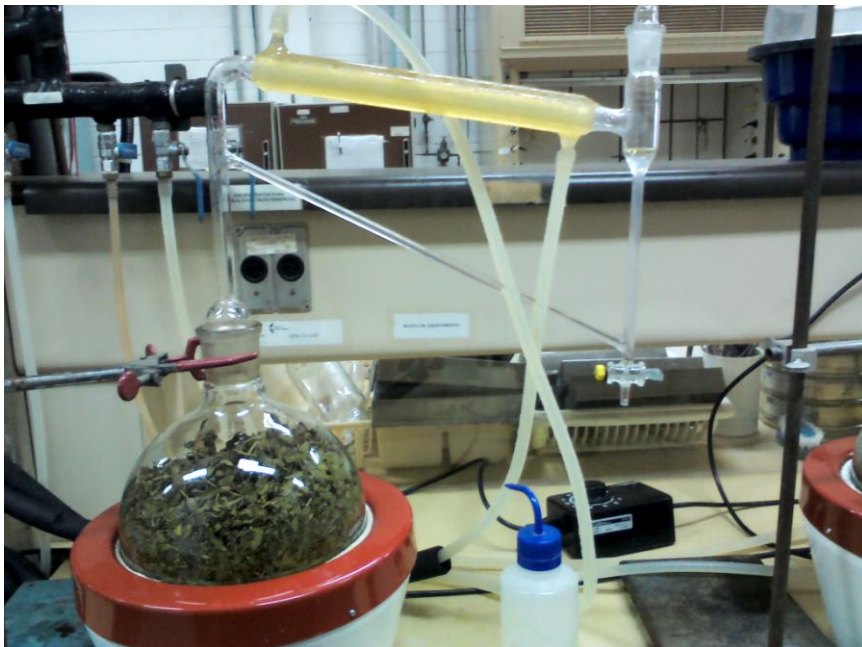


Figura 1. Sistema de extração de óleo essencial do tipo Clevenger
Fonte: Flávia P. da Cunha Pedrosa

3.4 Obtenção do extrato hidroalcoólico para triagem da atividade antimicrobiana

Os extratos das espécies *P. incarnata* e *P. frutescens* foram obtidos a partir 20 g das folhas secas e moídas com 200 mL de solução hidroalcoólica 70%, seguido de extração em sistema ultra-turrax (tipo Polytron®) à temperatura ambiente, durante 3 minutos. Após este período, os extratos foram filtrados e os resíduos reextraídos como anteriormente, com uma nova solução hidroalcoólica. Os resíduos foram lavados com a mesma solução, e os filtrados combinados e evaporados à vácuo até total volatilização, levando à obtenção do extrato da planta.

Posteriormente foi adicionado aos extratos, solução hidroalcoólica 70% de polivinilpirrolidona (PVP), concentração de 16 mg/mL. O PVP é um polímero solúvel em água, usualmente utilizado na indústria farmacêutica para solubilização de drogas com baixa solubilidade. Estudos realizados por CHIOU & RIEGELMAN (1971) a respeito da função dos polímeros solúveis em água comprovaram a eficácia do PVP no aumento da solubilidade e taxa de dissolução de drogas de baixa solubilidade.

3.5 Triagem *in vitro* da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos pelo Método da Microdiluição (CLSI, 2002; CLSI, 2005). Seleção dos óleos com potencial para uso como antimicrobiano

3.5.1 Microrganismos

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e dos extratos das espécies em estudo foi avaliada frente aos seguintes microrganismos: *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis* e *S. aureus*.

Os microrganismos foram preservados em meios de cultivo específicos, conforme indicado para cada espécie, repicados 24 horas antes dos ensaios de atividade antimicrobiana e mantidos em estufa a 36°C para crescimento microbiano.

3.5.2 Meios de cultivo para os testes de atividade antimicrobiana

Os meios de cultivo utilizados para os testes de atividade antimicrobiana para a levedura *C. albicans* foi o RPMI-1640. Para os demais microrganismos do presente estudo foi utilizado o caldo de Müeller Hinton.

3.5.3 Preparo dos óleos essenciais e dos extratos para os testes de atividade antimicrobiana

Para uso nos testes de atividade antimicrobiana, os óleos essenciais foram solubilizados em meio Müeller - Hinton ou RPMI-1640 contendo 2,5% dimetilsulfóxido (DMSO) e solução de Tween 80 em água (0,1 %). Os extratos das espécies estudadas foram preparados com PVP (16 mg/mL) e, posteriormente, adicionado meio de cultura específico para cada microrganismo. A concentração máxima testada foi de 1 mg/mL.

3.5.4 Preparo de inóculo padronizado

O inóculo foi preparado a partir da suspensão de células de crescimento recente (24h) em solução salina (0,85%), sendo a densidade ótica padronizada a 625 nm (bactérias) ou 530 nm para leveduras, absorvância entre 0,08 e 0,1 para ambos os microrganismos, seguido da diluição indicada para cada tipo de microrganismo.

3.5.5 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) pelo Método da Microdiluição (CLSI 2002, 2003)

Em uma microplaca esterilizada com 96 poços foram depositados 100 µL dos meios de cultura citados acima, sendo a coluna 12 utilizada para os controles do microrganismo e de esterilidade do meio de cultura. Na coluna 1 - linha A foram acrescentados 50 µL da solução do material a ser testado, de concentração conhecida (uma substância diferente para cada número ou coluna), sendo estes referentes ao controle de esterilidade das amostras. Em seguida, 100 µL dos mesmos materiais foram adicionados na linha B, o conteúdo dos orifícios homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (C), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do material.

Os 100 µL finais foram desprezados. Em seguida adicionou-se 100 µL do inóculo do microrganismo a ser avaliado, sendo a densidade ótica padronizada a 625 nm (bactérias) ou 530 nm para leveduras, absorvância entre 0,08 e 0,1 para bactérias e *C. albicans*, seguido de diluição para concentração final de 10⁴ células/mL (bactérias) ou 10³ células/mL (levedura). As placas foram seladas com parafilm® e incubadas por 24-48 h a 36°C.

3.5.6 Leitura dos resultados

No caso das bactérias, após este período foram acrescentados 50 µL de uma solução aquosa de TTC (2,3,5-cloreto de trifetil tetrazolium) a 0,1% em cada compartimento, e as placas re-incubada por 3 h na referida temperatura. A MIC foi definida como a menor concentração do extrato ou óleo essencial capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha. O revelador TTC permite observar as regiões onde houve crescimento bacteriano, uma vez que as células com atividade respiratória coram-se de vermelho. Do mesmo modo, permite avaliar qualitativamente se houve inibição do crescimento em locais correspondentes a uma determinada fração do extrato vegetal corrida na placa em questão, através da formação de halos de inibição, região onde não haverá reação com o revelador.

No caso da levedura *C. albicans*, após o período de incubação foi verificada se houve mudança de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo, o que indica mudança de pH ocasionada pelo crescimento microbiano.

3.5.7 Determinação da Concentração Bactericida (MBC) ou Fungicida Mínima (MFC) dos óleos selecionados

Após determinação da MIC dos óleos de melhor atividade foram determinados os valores de MBC e MFC, através do plaqueamento com SWAB estéril (Absorve®) do material do compartimento (poço) da placa referente à de MIC, e de 3 compartimentos de concentrações acima do mesmo.

3.6 Fracionamento dos óleos essenciais com potencial para uso como antimicrobiano

Os óleos essenciais *E. caryophyllata*, *O. tenuiflorum*, *O. vulgare* e *S. mycrophylla* foram fracionados e as frações testadas quanto a atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição (CLSI, 2002; CLSI, 2005).

Para fracionamento, a coluna seca foi preparada com sílica gel 60 Merck (0,063 – 0,200mm), utilizando-se como suporte tripa de celulose, seguida da adição do óleo essencial bruto. A fase móvel utilizada foi definida após análise do óleo por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), em dois eluentes: diclorometano e hexano/acetato de etila (90:10). Após eluição, a coluna foi dividida em frações e estas transferidas individualmente para frascos herméticos, seguido da adição de solvente apropriado. As frações foram levadas a um banho ultrassônico a fim de retirar os compostos retidos na sílica, e analisadas por cromatografia de camada delgada. Em seguida, as frações semelhantes foram agrupadas, filtradas e evaporadas a vácuo para secagem do solvente.

2.7 Análise cromatográfica dos óleos essenciais para identificação dos constituintes químicos

2.7.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os óleos essenciais foram diluídos em acetato de etila na concentração de 20mg/mL e analisados por CCD, utilizando-se cromatoplasmas de alumínio (Merk® – artigo 5554). O eluente utilizado nas análises foi o diclorometano, definido de acordo com as características de cada óleo. As placas foram analisadas sob luz UV (λ 254 e 366 nm), seguidas de pulverização com uma solução de anisaldeído (ácido acético:ácido sulfúrico:anisaldeído 50,0:1,0:0,5 v/v) e aquecimento em estufa a 100 °C por 5 min.

2.7.2 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

Os óleos essenciais foram diluídos em acetato de etila, na concentração de 20mg/mL e analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a Detector Seletivo de Massas (CG-EM), utilizando o cromatógrafo a gás AGILENT HP-6890, com detector AGILENT HP-5975.

Foram utilizadas as condições cromatográficas recomendadas para óleos essenciais, segundo parâmetros de Adams (2007): injeção split/splitless, coluna capilar HP-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m). Temperaturas: injetor= 220 °C, detetor= 280 °C, coluna= 60 °C, 3 °C/min, 240 °C e gás de arraste He 1,0 mL/min.

Os índices de retenção (IR) para cada composto foram determinados pela co-injeção de padrões de hidrocarbonetos (série homologa C9 a C22). A identificação dos compostos foi feita através da comparação entre os espectros de massas obtidos e perfis da biblioteca NIST-05, dados descritos por Adams (2007), e pela co-injeção de padrões autênticos, quando disponíveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais de 8 das 10 espécies medicinais e/ou aromáticas estudadas foram obtidos por hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger e apenas para as espécies, *Perilla frutescens* e *Passiflora incarnata*, foram feitos extratos hidroalcoólicos (70%) .

Os rendimentos dos óleos essenciais estão apresentados na Tabela 2. De acordo com os resultados, notamos que os rendimentos dos óleos essenciais das plantas medicinais estudadas variaram de 0,15% para a espécie *O. vulgare hirtum* a 4,69 % para *E. caryophyllata*.

Tabela 2. Rendimento (%) dos óleos essenciais estudados (base = peso da planta seca)

Nome Científico	Massa da planta (g)	Massa de óleo (g)	Rendimento (% m/m)
<i>B. orellana</i>	543,53	2,56	0,58
<i>E. caryophyllata</i>	777,51	18,11	4,69
<i>M. officinalis</i> L. Balm	515,06	0,51	0,47
<i>M. officinalis</i> L. citronela	504,68	0,46	0,43
<i>O. basilicum</i>	550,0	1,99	2,76
<i>O. tenuiflorum</i> L.	510,75	0,60	0,64
<i>O. vulgare hirtum</i>	1.300	0,93	0,15
<i>S. mycophylla</i>	1.070	1,02	0,38

O teste de microdiluição em série foi realizado para determinar a MIC dos óleos essenciais e extratos frente às bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis* e *S. aureus* e a levedura *C. albicans*. A MIC refere-se a menor concentração de óleo essencial ou extrato necessário para impedir o crescimento dos microrganismos. Os resultados de atividade dos óleos essenciais e extratos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração mínima inibitória (MIC - µg/mL), Concentração Bactericida/Fungicida Mínima e Razão (MBC/MFC:MIC) dos óleos essenciais com atividade antimicrobiana até 1000 µg/mL.

Microrganismo	Planta Medicinal	MIC (µg/mL)	MBC/MFC (µg/mL)	Razão
<i>C. albicans</i>	<i>B. orellana</i>	600	1000	1,7:1
	<i>E. caryophyllata</i>	400	1000	2,5:1
	<i>O. tenuiflorum</i>	700	1000	1,4:1
	<i>O. vulgare</i>	500	1000	2:1
<i>E. coli</i>	<i>E. caryophyllata</i>	800	1000	1,3:1
	<i>B. orellana</i>	1000	>1000	-
	<i>O. tenuiflorum</i>	600	1000	1,7:1
	<i>O. vulgare</i>	800	1000	1,3:1
	<i>S. microphylla</i>	900	1000	1,1:1
<i>S. choleraesuis</i>	<i>E. caryophyllata</i>	1000	>1000	-
	<i>O. tenuiflorum</i>	800	1000	1,3:1
<i>S. aureus</i>	<i>O. tenuiflorum</i>	800	1000	1,3:1
	<i>O. vulgare</i>	800	>1000	-
	<i>S. microphylla</i>	1000	>1000	-

Todos os óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos testados apresentaram valor de MIC maior que 1000 µg/mL contra *P. aeruginosa*, não havendo, portanto, atividade antimicrobiana na faixa de concentração estudada.

De acordo com os resultados verificamos que especificamente os óleos essenciais de *B. orellana*, *E. caryophyllata*, *O. tenuiflorum*, *O. vulgare* e *S. microphylla* apresentam efeito antimicrobiano para a levedura *C. albicans* e para as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *S. choleraesuis*.

Com base no estudo realizado por ALIGIANIS et al. (2001), DUARTE et al. (2005) propuseram uma classificação da atividade antimicrobiana para materiais vegetais (óleos essenciais e extratos), relacionada aos resultados de MIC, sendo: forte inibição: MIC até 500 µg/mL; inibição moderada: MIC entre 600 e 1000 µg/mL; e fraca inibição: MIC acima de 1000 µg/mL.

Avaliamos, portanto, os óleos essenciais estudados de acordo com a classificação acima. Desse modo, para a levedura *C. albicans*, os óleos *E. caryophyllata* e *O. vulgare* apresentaram forte atividade antimicrobiana. Os demais apresentaram inibição moderada sobre os microrganismos.

Todavia, na faixa de concentração estudada não foi possível determinar a MIC de alguns óleos essenciais, como para os microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *S. choleraesuis*, cujos os óleos essenciais das espécies *S. mycrophylla*, *B. orellana* e *E. caryophyllata*, respectivamente, apresentaram fraca inibição, visto que o valor da MIC foi maior que 1000 µg/mL.

A razão entre o valor MBC/MFC:MIC é utilizada para especificar a natureza do efeito antimicrobiano do óleo essencial contra patógenos, ou seja, o seu modo de ação (HAFIDH et al., 2011). Se o valor da razão estiver entre 1:1 e 2:1, o efeito é bactericida ou fungicida, portanto, causa a morte celular de 99,9% das células do patógeno. Contudo, se o valor da razão for maior que 2:1, o efeito é bacteriostático ou fungistático, portanto, apenas controla o crescimento celular.

De acordo com a Tabela 3, a maioria dos óleos essenciais apresentaram razão MBC/MFC:MIC entre 1:1 e 2:1 logo, classificados como bactericidas/fungicidas. Entretanto, apenas o óleo bruto da espécie *E. caryophyllata* para o patógeno *C. albicans* apresentou efeito fungistático.

Os óleos essenciais *E. caryophyllata*, *O. tenuiflorum*, *O. vulgare* e *S. mycrophylla* foram selecionados e analisados quanto à composição química por Cromatografia Gasosa acoplada a Detector Seletivo de Massas (CG-EM).

Para confirmação de cada composto identificado, o índice de retenção (IR) foi calculado, e, posteriormente comparado com o índice encontrado na literatura, de acordo com as condições em que foram realizados. Abaixo está representada a equação para o cálculo do IR.

$$IR = \frac{[(t_{Rx} - t_{RCn-1}) \times (C_n - C_{n-1})] \times 100}{(t_{RCn} - t_{RCn-1})} + (100 \times C_{n-1})$$

Onde:

t_{Rx} : Tempo de retenção do analito

t_{RCn} : Tempo de retenção do hidrocarboneto com "n" carbonos

t_{RCn-1} : Tempo de retenção do hidrocarboneto com "n-1" carbonos

C_n : Número de carbonos do hidrocarboneto "n"

C_{n-1} : Número de carbonos do hidrocarboneto "n-1"

O óleo essencial bruto de *E. caryophyllata* apresentou melhor atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans* e as bactérias *E. coli* e *S. choleraesuis*. Seu perfil químico e composição química estão apresentados nas Figura 2 e Tabela 4, respectivamente.

De acordo com a Tabela 4, o composto majoritário do óleo essencial bruto é o eugenol, correspondendo a 90,64% da composição total do óleo. O espectro de massa do composto está apresentado na Figura 3.

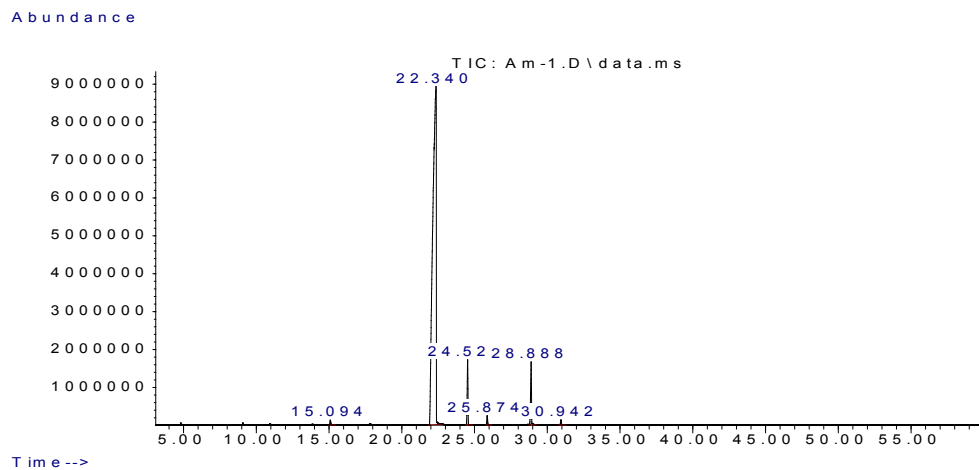


Figura 2. Cromatograma do óleo essencial de *E. caryophyllata*

Tabela 4. Composição química do óleo essencial de *E. caryophyllata*

t_R (min)	IR	Identificação	% rel.
15,10	1194	salicilato de metila	0,30
21,97	1358	eugenol	90,64
24,53	1420	trans-cariofileno	3,96
25,87	1453	α -cariofileno	0,52
28,89	1529	acetato de eugenol	4,27
30,94	1582	óxido de cariofileno	0,32

t_R = tempo de retenção; IR = índice de retenção; n.i. = não identificado

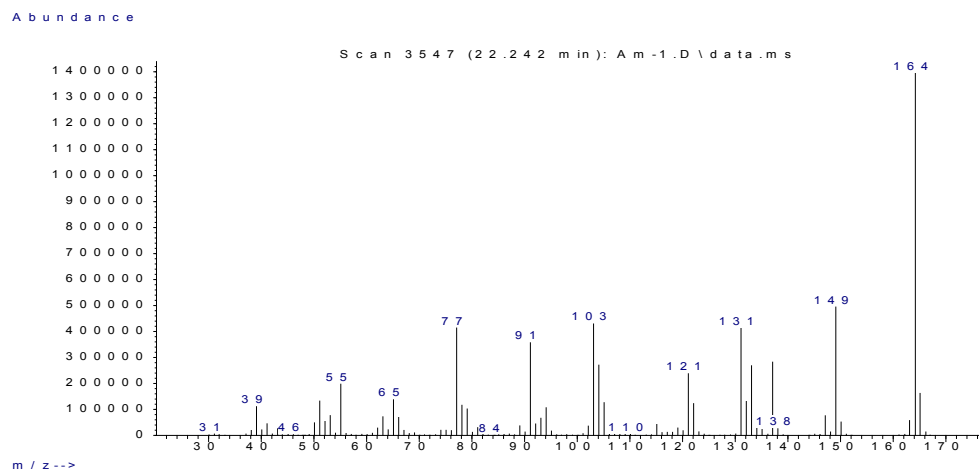


Figura 3. Espectro de massas do eugenol

O óleo essencial bruto da espécie *O. tenuiflorum* apresentou melhor atividade antimicrobiana para todos os microrganismos exceto para *P. aeruginosa*. O perfil químico do óleo está apresentado na Figura 4 e a composição química na Tabela 5. Os compostos majoritários do óleo são o eugenol e o trans cariofileno, correspondendo respectivamente a 54,23% e 18,86% da composição total do óleo essencial. A Figura 3 (acima) e 6 representam os espectros de massas do eugenol e trans cariofileno, respectivamente.

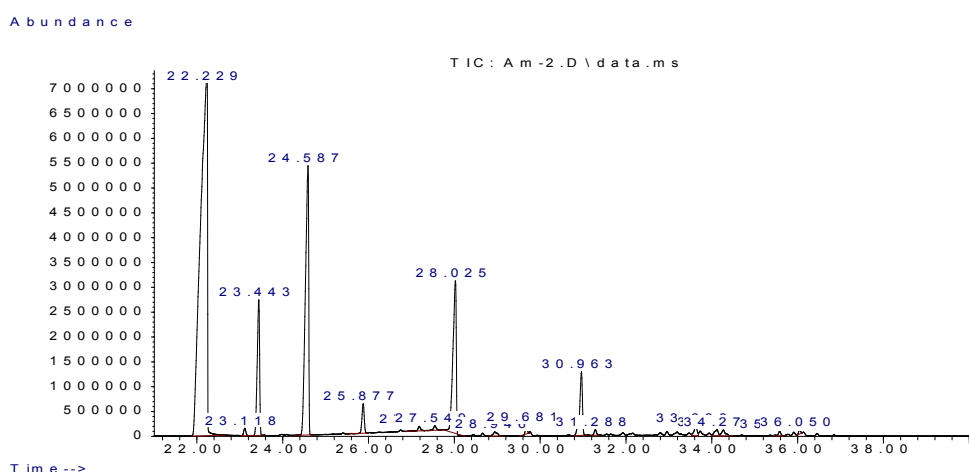


Figura 4. Cromatograma do óleo essencial de *O. tenuiflorum*

Tabela 5. Composição química do óleo essencial de *O. tenuiflorum*

t_R (min)	IR	Identificação	% rel.
22,23	1364	eugenol	54,23
23,12	1385	β - elemeno	0,35
23,44	1393	cipereno	7,07
24,59	1421	trans cariofileno	18,86
25,88	1453	α - cariofileno	1,44
27,19	1486	β -selineno	0,29
27,55	1495	viridifloreno	0,28
28,02	1507	germacreno A	10,81
28,95	1531	cubeneno	0,37
29,68	1550	elemol	0,32
30,96	1583	óxido de cariofileno	3,68
31,29	1591	viridiflorol	0,27
33,63	1654	kongol	0,64
34,12	1667	bulnesol	0,50
34,27	1671	khusinol	0,47
35,58	1707	n.i.	0,25
36,05	1720	n.i.	0,18

t_R = tempo de retenção; IR = índice de retenção; n.i. = não identificado

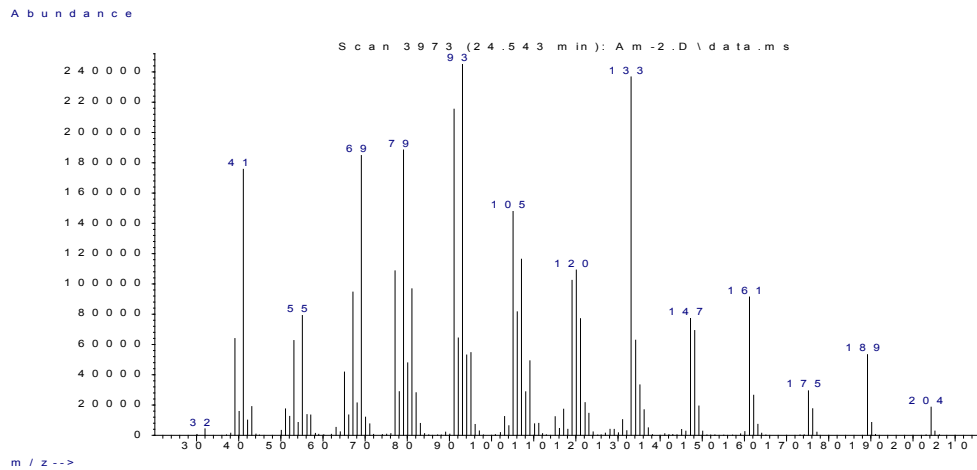


Figura 5. Espectro de massas do trans cariofileno

O óleo essencial de *O. vulgare* apresentou a melhor atividade, na faixa de concentração estudada, frente ao fungo *C. albicans* e as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Seu perfil químico está apresentado na Figura 6 e a composição química na Tabela 6.

De acordo com a Tabela 6 podemos observar que os compostos majoritários do óleo essencial, respectivamente são: timol (20,04%), terpin-4-ol (18,97%) e linalol (12,69%). A Figura 7 apresenta o espectro de massa do composto timol, o componente com maior percentagem na composição total do óleo essencial.

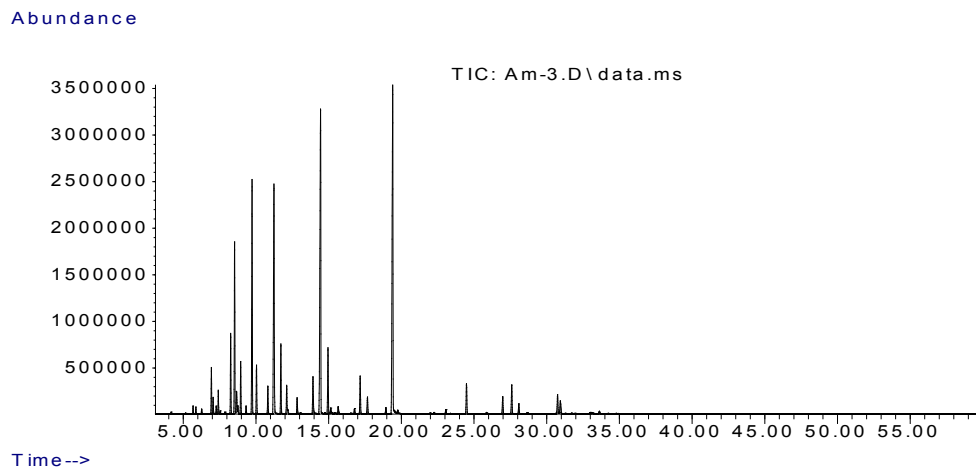


Figura 6. Cromatograma do óleo essencial de *O. vulgare*

Tabela 6. Composição química do óleo essencial de *O. vulgare*

t _R (min)	IR	Identificação	% rel.
5,67	926	origaneno	0,25
6,94	973	β-felandreno	1,62
7,06	977	amil vinyl carbinol	0,61
7,27	985	3- octanona	0,28
7,41	991	mirceno	0,83
8,26	1017	α-terpileno	3,05
8,53	1024	orto cimeno	6,66
8,67	1028	limoneno	0,92
8,95	1036	z-β-ocimeno	1,97
9,32	1046	octatrieno	0,31
9,73	1058	1,4 ciclohexadieno	9,76
10,04	1067	trans-4-Tujanol	1,97
10,82	1089	isoterpinoleno	1,18
11,24	1100	linalol	12,69
11,71	1112	1- octeno-1-ol, acetato	2,90
12,12	1122	2- ciclohexeno-1-ol	1,05
12,83	1139	trans-2-p-menteno-1-ol	0,75
13,92	1166	borneol	1,91
14,45	1179	terpin-4-ol	18,97
14,96	1191	α-terpineol	3,14
17,17	1244	carvacrol (metil éter)	1,78
17,67	1256	linalil butirato	0,83
19,41	1297	timol	20,04
24,48	1419	trans-cariofileno	1,58
26,97	1480	germacreno D	0,89
27,60	1496	biciclogermacreno	1,54
28,09	1508	α-farneseno	0,52
30,75	1577	espatulenol	1,11
30,95	1582	óxido de cariofileno	0,92

t_R = tempo de retenção; IR = índice de retenção

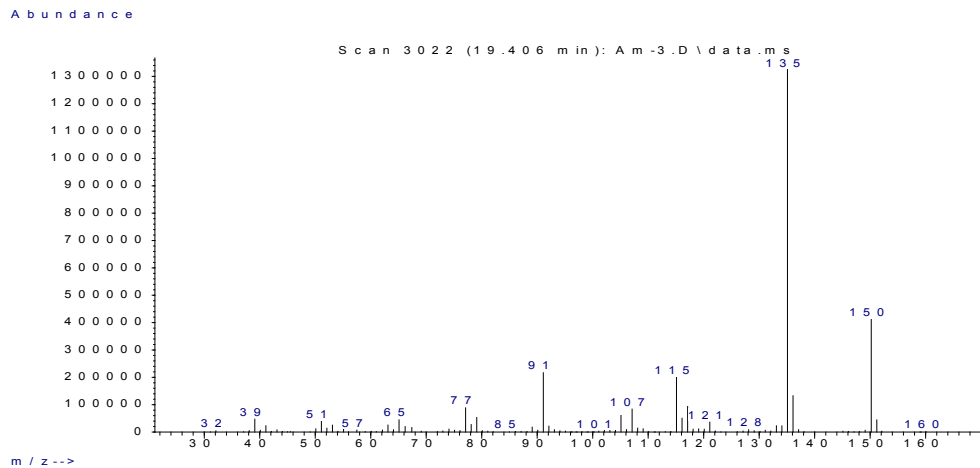


Figura 7. Espectro de massas do timol

O óleo bruto *S. mycrophylla* apresentou atividade antimicrobiana para os microrganismos *E. coli* e *S. aureus*. A Tabela 7 apresenta a composição química do óleo essencial bruto, onde o composto cariofileno e valerianol correspondem a 15,74% e 11,45% da composição total do óleo essencial, respectivamente.

A Figura 8 e 9 apresentam respectivamente, o perfil químico do óleo essencial *S. mycrophylla* e o espectro de massas do composto cariofileno.

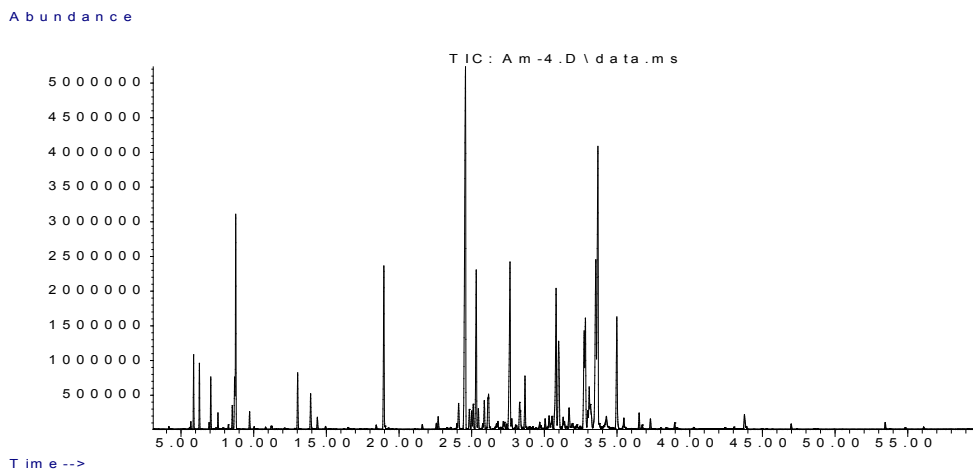


Figura 8. Cromatograma do óleo essencial de *S. mycrophylla*

Tabela 7. Composição química do óleo essencial de *S. mycrophylla*

t_R (min)	IR	Identificação	% rel.
5,87	933	alfa-pineno	1,38
6,27	948	Canfeno	1,28
7,05	977	beta-pineno	1,07
7,54	995	3- octanol	0,33
8,53	1024	Orto-cimeno	0,53
8,69	1029	beta-felandrene	1,32
8,77	1031	Eucalipitol	4,92
9,72	1058	gama-terpeno	0,41
13,03	1144	Canfora	1,49
13,92	1166	Borneol	1,04
18,96	1286	Bornil acetato	4,86
24,10	1409	alfa-gurjuneno	0,87
24,58	1421	Cariofileno	15,74
24,84	1428	n.i.	0,68
25,00	1432	beta-gurjuneno	0,54
25,11	1434	delta-cadineno	0,77
25,32	1439	Aromadendreno	5,28
25,46	1443	alfa-guaieno	0,59
25,87	1453	alfa-cariofileno	0,86
26,16	1460	Seicheleno	1,89
27,64	1497	Biciclogermacreno	6,49
28,30	1514	gama-cadineno	1,29
28,67	1523	delta-cadineno	1,65
30,81	1579	Espatulenol	5,56
30,98	1583	Óxido de cariofileno	4,01
31,70	1602	n.i.	0,78
32,74	1630	n.i.	3,65
32,83	1632	gama-eudesmol	3,65
33,09	1639	Hinesol	1,45
33,17	1642	epi - alfa- cadinnol	1,16
33,54	1652	beta-eudesmol	7,87
33,68	1655	Valerianol	11,45
34,99	1690	n.i	4,15
36,53	1734	n.i	0,51

t_R = tempo de retenção; IR = índice de retenção; n.i. = não identificado

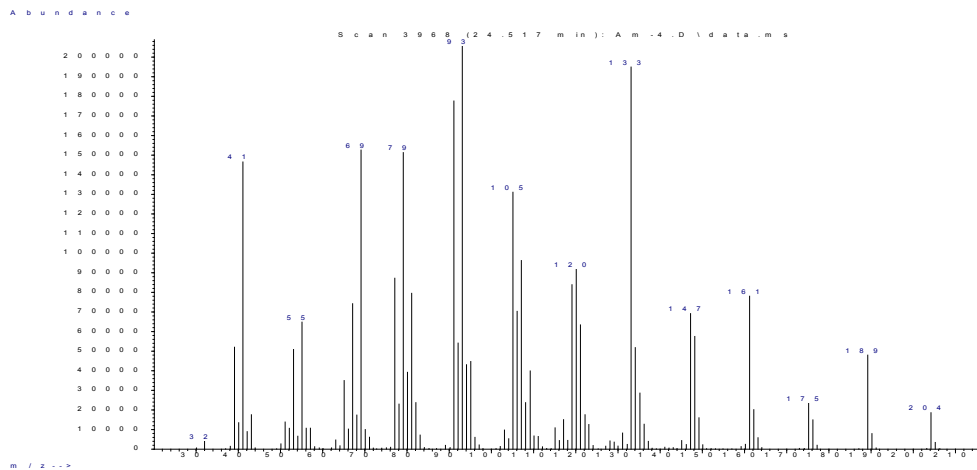


Figura 9. Espectro de massas do composto cariofileno

Os óleos essenciais *E. caryophyllata*, *O. tenuiflorum*, *O. vulgare* e *S. microphylla* foram selecionados e realizada a análise por CCD em dois eluentes diferentes, diclorometano e hexano/acetato de etila (90:10). O eluente selecionado para o fracionamento dos óleos essenciais foi o diclorometano por promover melhor separação dos compostos constituintes dos óleos essenciais (Figura 10).

O número de frações de cada óleo essencial foi definido através da disposição das bandas na placa cromatográfica, como observado na Figura 10. Para os óleos essenciais *E. caryophyllata*; *O. vulgare* e *Salvia microphylla* e *O. tenuiflorum* foi estabelecido o número de frações em 2, 3 e 4 frações, respectivamente.

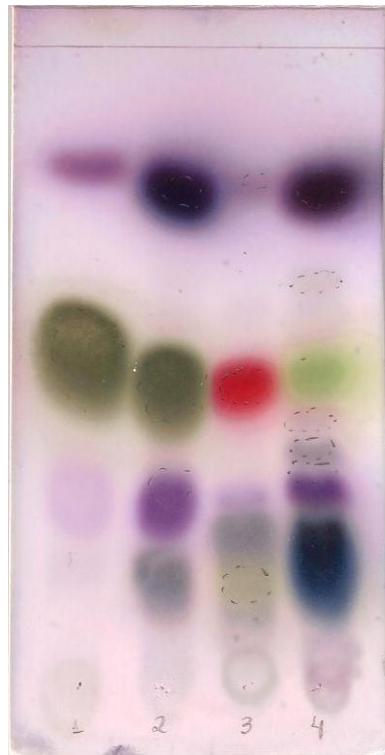


Figura 10. Placa cromatográfica dos óleos essenciais *E. caryophyllata* (1), *O. tenuiflorum* (2), *O. vulgare* (3) e *S. mycrophylla* (4), utilizando como eluente o diclorometano

Após o fracionamento dos óleos essenciais de melhor atividade antimicrobiana foram feitas placas de CCD das frações, como mostram as Figuras 11 a 14. Em cada placa cromatográfica há uma denominação “PP” seguida de uma numeração, normalmente de 1 a 4. A numeração corresponde ao número de frações que foi fracionado o óleo bruto e a sigla “PP” significa ponto de partida, que é o óleo essencial bruto diluído em acetato de etila (20 mg/mL) para fins comparativos com a fração.

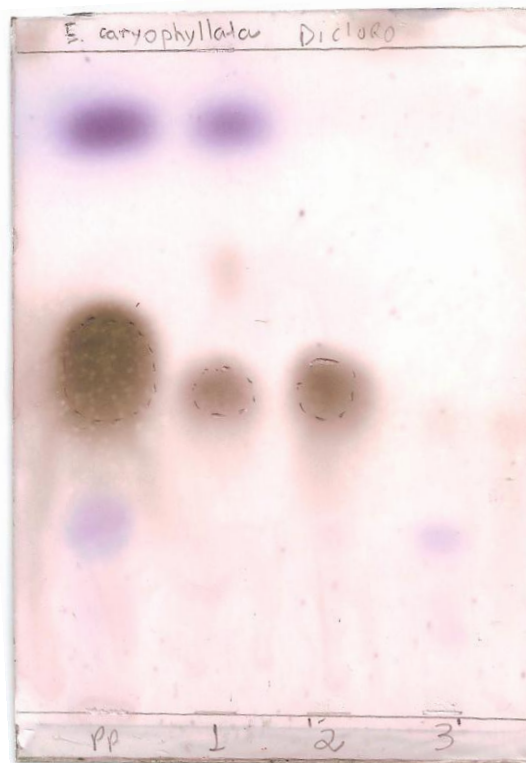


Figura 11. Placa cromatográfica das frações do óleo de *E. caryophyllata*

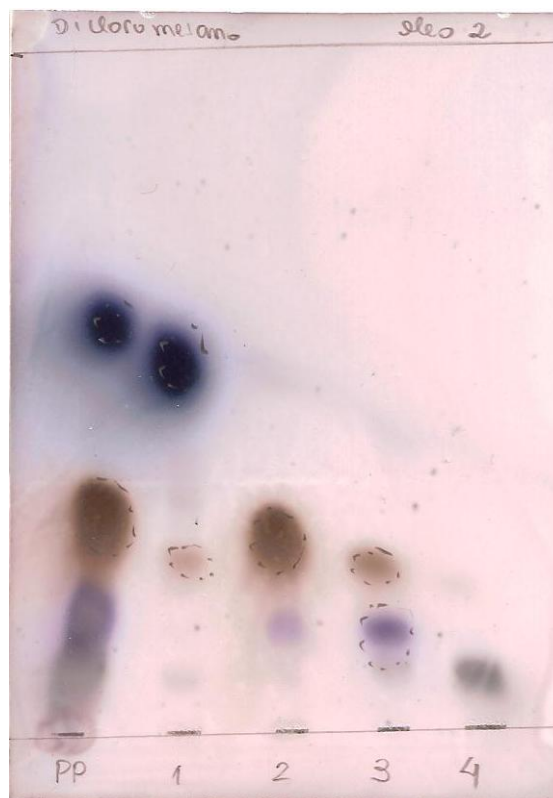


Figura 12. Placa cromatográfica das frações do óleo de *O. tenuiflorum*

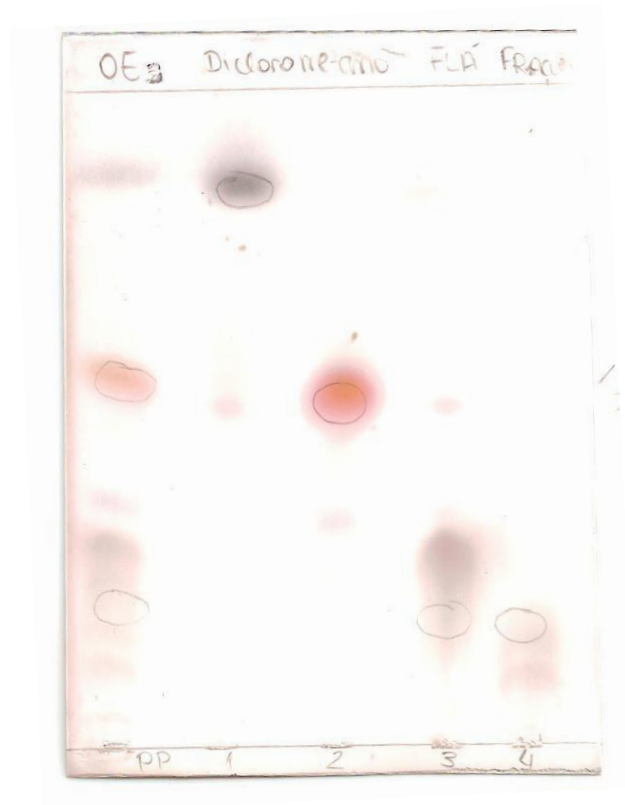


Figura 13. Placa cromatográfica das frações do óleo de *O. vulgare*

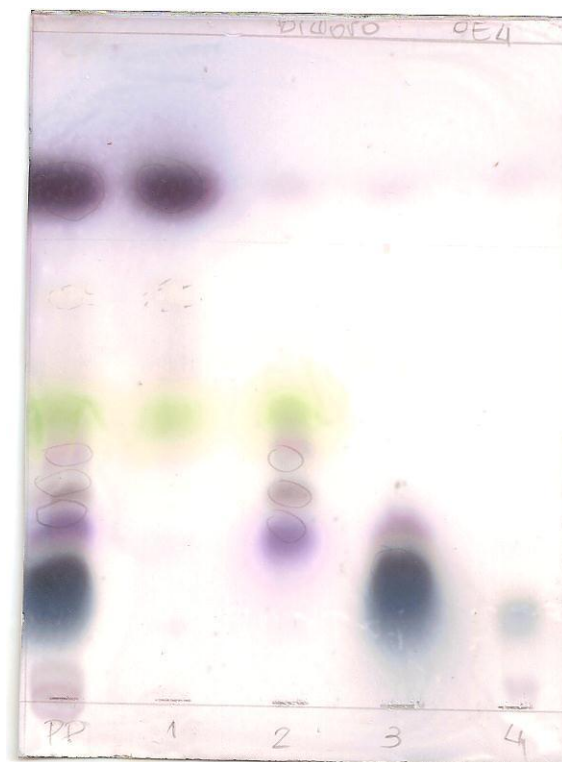


Figura 14. Placa cromatográfica das frações do óleo de *S. mycrophylla*

Após a evaporação do diclorometano de cada fração, não foi possível coletar quantidade suficiente de massa em algumas frações. Dessa forma, as frações 2 e 3 do óleo essencial *E. caryophyllata*; e frações 3 e 4 das espécies *O. vulgare* e *S. mycrophylla* foram combinadas em uma única fração. A Tabela 8 são apresentadas a massa inicial do óleo bruto que foi fracionada, a soma da massa das frações obtidas após o fracionamento e o rendimento em frações.

Tabela 8. Rendimento em massa das frações dos óleos essenciais de melhor atividade antimicrobiana

Planta	Massa óleo bruto (g)	Massa frações (g)	Rendimento (%)
<i>E.caryophyllata</i>	0,6582	0,3944	59,92
<i>O.tenuiflorum</i>	0,5105	0,4261	83,47
<i>O.vulgare</i>	0,5147	0,3402	66,10
<i>S. mycrophylla</i>	0,4987	0,3008	60,32

O teste de microdiluição em série foi realizado para determinar a MIC das frações dos óleos essenciais mais ativos. Para os óleos que apresentaram atividade de até 1000 µg/mL foi também certificado o valor da concentração bactericida/fungicida mínima (MBC/MFC), ou seja, a menor concentração de óleo essencial necessária para inibir 99,9% das células microbianas. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Concentração mínima inibitória (MIC - $\mu\text{g/mL}$), Concentração Bactericida Mínima e Razão (MBC/MIC) das frações do óleos essenciais com atividade antimicrobiana até 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Microrganismo	Planta medicinal		MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	Razão
<i>E. coli</i>	<i>O. tenuiflorum</i>	Fração 4	600	1000	1,7:1
	<i>O. vulgare</i>	Fração 2	300	300	1:1
	<i>S. mycophylla</i>	Fração 3	500	1000	2:1
<i>S. aureus</i>		Fração 3	400	900	2,5:1
	<i>O. vulgare</i>	Fração 4	250	250	1:1
	<i>S. mycophylla</i>	Fração 3	800	700	1,3:1

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o óleo essencial bruto das espécies *E. caryophyllata*, *O. vulgare* e *O. tenuiflorum* testados para os microrganismos *C. albicans*, *S. aureus* (exceto *E. caryophyllata*) e *S. choleraesuis* (exceto *O. vulgare*) apresentaram MIC menores que as frações, isto é, foram mais ativos. Deste modo, podemos sugerir que exista ação sinérgica entre os componentes do óleo que favorece a atividade antimicrobiana.

Posteriormente realizou-se a identificação e a análise da composição química das frações de melhor atividade antimicrobiana por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM). O eugenol foi o principal composto identificado no óleo essencial das espécies *E. caryophyllata* e *O. tenuiflorum*, correspondendo, respectivamente, a cerca de 90,64% (Tabela 4) e 54,23 % (Tabela 5) da composição total do óleo bruto. O fitoconstituente eugenol é reconhecido na literatura científica por sua ação antimicrobiana conferida à espécie *E. caryophyllata*, tendo sido descrita por diversos autores, como PINTO et al., 2009; AYOOLA et al., 2008; NZEAKO et al., 2006.

Para a bactéria *E. coli*, o valor da MIC da fração 2 do óleo de *O. vulgare* foi menor em relação a MIC do óleo essencial bruto (MIC óleo bruto $\geq 800\mu\text{g/mL}$). Logo, podemos inferir que a fração está enriquecida com o(s) componente(s) responsável(s) pela atividade antimicrobiana. Além disso, a fração 2 teve efeito bactericida para o microrganismo. A análise química realizada das frações mostrou como composto majoritário o timol. Portanto, podemos sugerir que este fitoconstituente pode ser o responsável pela atividade antimicrobiana. A composição química da fração 2 do óleo essencial de *O. vulgare* está

apresentada na Tabela 10. O timol corresponde a 82,78% da composição total da referida fração.

Tabela 10. Composição química da fração 2 do óleo essencial de *O. vulgare*

t_R (min)	IR	Identificação	% rel.
3,31	801	Etil butirato	4,59
3,50	812	Tetracloroetileno	0,51
7,27	985	3- octanona	0,84
14,39	1177	terpin-4-ol	2,63
17,68	1258	Bergamol	2,97
19,46	1301	Timol	82,78

t_R : tempo de retenção; IR: índice de retenção; % rel: porcentagem relativa

A fração 3 do óleo essencial de *S. mycrophylla* apresentou como composto majoritário o α -eudesmol. Os valores da MIC do óleo bruto foram superiores para *E. coli* e *S. aureus*, quando comparado ao da fração 3, evidenciando a ação antimicrobiana deste constituinte frente a estes microrganismos. A Tabela 11 apresenta a composição química da fração 3 do óleo essencial de *S. mycrophylla*. O composto α -eudesmol corresponde a cerca de 21,85% da composição total da fração.

Tabela 11. Composição química da fração 3 do óleo essencial de *S. mycrophylla*

t _R (min)	IR	Identificação	% rel.
3,30	800	ácido butanóico etil ester	2,93
4,31	860	etilbenzeno	0,27
7,54	995	3- octanol	0,60
8,76	1031	Eucalipitol	8,97
13,03	1144	Canfora	0,43
13,92	1166	Borneol	1,46
14,38	1177	terpinen-4-ol	0,61
27,53	1494	α -cubeneno	0,53
28,35	1515	γ -cadineno	0,99
30,52	1571	n.i.	1,11
30,78	1578	Espatuleno	10,45
30,99	1584	Óxido de cariofileno	2,91
31,70	1602	n.i.	1,58
32,72	1623	10 epi- γ - eudesmol	7,31
32,81	1625	γ -eudesmol	7,08
33,07	1638	Hinesol	2,89
33,20	1641	Cadinol	1,55
33,52	1649	β -eudesmol	13,75
33,65	1654	α -eudesmol	21,85
34,26	1671	n.i.	1,08
34,97	1690	n.i.	8,46
35,47	1704	n.i.	0,82

t_R: tempo de retenção; IR: índice de retenção; % rel: porcentagem relativa;
n.i.: não identificado

Para o microrganismo *E. coli*, a fração 4 da espécie vegetal *O. tenuiflorum* apresentou evidenciado efeito antimicrobiano na faixa de concentração estudada. O valor da MIC do óleo essencial bruto foi maior do que a da fração 4. Consequentemente podemos sugerir que, a fração está enriquecida com o componente responsável por tal atividade. De acordo com a análise da composição química realizada por CG-EM, o composto majoritário da fração 4 do óleo essencial de *O. tenuiflorum* é o β -malieno, correspondendo a cerca de 14,16% da composição total da fração citada.

Finalmente, os valores da MIC encontrados nas frações 3 e 4 do óleo essencial de *O. vulgare* foram menores em relação à MIC do óleo essencial bruto, portanto, podemos inferir que as referidas frações contêm fitoconstituintes majoritários que desempenham papel prioritário na atividade antimicrobiana. Por meio da análise de CG-EM, constataram-se que os constituintes das frações 3 e 4 são o terpen-4-ol (53%) e o hidrato de trans sabineno (55,43%), respectivamente.

De acordo com a Tabela 9, a análise MBC:MIC mostra que a maioria das frações tiveram como resultado ação bactericida. Todavia, apenas a fração 3 do óleo essencial *O. vulgare* mostrou ação bacteriostática.

A via de ação do óleo essencial contra bactérias Gram positivas, tais como *S. aureus* e *S. choleraesuis*, e fungos parecem semelhantes. Alguns fitocompostos existentes nos óleos essenciais alteram a membrana plasmática e parede celular destes microrganismos, extravazando o conteúdo interno, além de causar prejuízo na respiração celular (COX et al., 2000).

Os óleos essenciais podem acarretar danos físicos as células, ocorrendo ligação entre componentes ativos e a superfície celular, podendo até penetrar e atingir alvos intercelulares, além de alterações morfológicas. As causas apontadas para os efeitos são inibição da força próton-motriz da membrana citoplasmática; inibição da cadeia respiratória e transferência de elétrons, dentre outros fatores.

4 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a MIC de alguns óleos essenciais brutos como, *E. caryophyllata*, *O. vulgare* e *O. tenuiflorum* foram mais eficientes em relação à MIC de suas respectivas frações, quando testadas para os microrganismos *C. albicans*, *S. aureus* (exceto *E. caryophyllata*) e *S. choleraesuis* (exceto *O. vulgare*). No entanto, os testes realizados com as frações dos óleos essenciais resultaram em valores da MIC menores quando comparados ao óleo bruto, inclusive com efeito bactericida. O potencial e a diversidade das plantas medicinais no Brasil e a pesquisa científica por novos antibióticos estão em fase de expansão, embora o emprego seja ainda limitado. Os resultados do presente trabalho destacam o papel das espécies medicinais *O. tenuiflorum*, *O. vulgare* e *S. mycophylla* e suas frações, como antimicrobianos naturais.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, K. et al. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **J Agr Food Chem.** 46(5): 1739-1745, 1998.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Brasília, 186 p., 2008.

ALIGIANIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **J Agr Food Chem.** 49: 4168-4170, 2001.

ALLEN, E.H.; THOMAS, C.A. An antifungal polyacetylene from diseased safflower (*Carthamus tinctorius*). **Phytochemistry.** 10: 1579-1582, 1971.

ALMEIDA, C.E. et al. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Rev Saúde Publ.** 29: 428-433, 1995.

ANDRADE, S.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the sentry Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **J Antimicrob Chemoth.** 52: 140-141, 2003.

ANDRIANTSOA, M. Archives du CNRP. 1983, 179p.

ANDRIOLO, A. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar. São Paulo: Manole, 2005, 98p.

ARANA SANCHEZ, A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregan essential oils (*Lippia graveolens* H.B.K.) with different composition when microencapsulated in beta-cyclodextrin. **Lett Appl Microbiol.** 50: 585-590, 2010.

AYOOLA, G.A. et al. Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove). **African Journal of Microbiology Research.** 2: 162-166, 2008.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chem Toxicol.** 46(2): 446-475, 2008.

BAQUERO, F.; Blázquez, J. Evolution of antibiotic resistance. **Tree**. 12: 482-487, 1997.

BARBARO, N.R.; STELATO, M.M. Atividade anti-*candida* de óleos essenciais de plantas utilizadas na culinária. In: Anais do XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas, Campinas, São Paulo, 2009.

BATISTA, J. M.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **Rev Odontol Uni São Paulo**. 13(4): 343-348, 1999.

BAUMLER, A.J. et al. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operon evolution of *Salmonella* serotypes. **J Bacteriol**. 179(2): 317-322, 1997.

BAYRAM, A.; BALCI, I. Patterns of antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit of a university hospital in Turkey. **BMC Infect Dis**. 6: 155, 2006.

BERGOLD, A.M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão acadêmica**. 5(2): 159-172, Curitiba, 2004.

BETTELHEIM, K.A. *Escherichia coli*. 2002. Disponível em: www.aciencenet.com.au [acesso em 10.06.2012].

BIMER, J.; NICOLLS, J.M. Passicol, an antibacterial and antifungal agent produced by *Passiflora* plant species: preparation and physicochemical characteristics. **Antimicrob Agents Ch**. 3:105-109, 1973.

BRAUNWALD, E. et al. Harrison, medicina interna. 15. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana do Brasil, 2002.

BRENNER, F.W. et al. *Salmonella* nomenclature. **J Clin Microbiol**. 38: 2465-2467, 2000.

BROOKS, G. F. et al. Microbiologia Médica. 24 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 820p, 2009.

BUSATTA, C. et al. Evaluations of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Braz J Microbiol**. 38, 610-616, 2007.

_____. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiol.** 25: 207-211, 2008.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.** 9: 327-335, 2001.

CÁRCERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. **J Ethnopharmacol.** 38: 31-38, 1993.

CARRAMIÑANA, J.J. et al. Potential virulence determinants of *Salmonella* serovars from poultry and human sources in Spain. **Vet Microbiol** [online], 54: 375-383, 1997. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIlg&_imagekey=B6TD6-3RGSY4F-H-. Acesso em 01 jun. 2012.

CARSON, C.F. et al. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J Antimicrob Chemother.** 35: 421-424, 1995.

_____. Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J Bacteriol.** 78: 264-269, 1995.

CASSETARI, V.C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E.A.S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Braz J Infect Dis.** 9(1): 70-76, 2005.

CDC. Interim guidelines for prevention and control of *Stafilococcal* infection associated with reduced susceptibility to vancomycin. **MMWR.** 46(26): 626-627, 1997.

CECANHO, R. et al. Effect of hydroalcoholic *Mikania laevigata* on bacterial growth and production of carbohydrate by *Streptococcus mutans*. **Proceedings of the Fourteenth Annual Meeting the FESBE.** 14: 290, 1999.

CHAKRABARTI, A.; NAVAK, N.; TALWAR, P. *In vitro* proteinases production by *Candida* species. **Mycopathologia.** 114: 163-168, 1991.

CHEN, Y. Method of treating *Candida* and *Cryptococcus* fungal infections by administering gentian. U.S. Patent US 5837254 A, 1998.

CHIOU, W.L.; RIEGELMAN, S. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. **J.Pharm. Sci.**, 60: 1281-1302, 1971.

CLSI. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da CLSI. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico. 6ª. edição, M7-A6, 23(2), 2005.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop.** 36(5): 599-607, 2003.

COX, S.D. et al The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology.* 88:170-175, 2000.

CRUZ, M.C.S. et al. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **J Ethnopharmacol.** 111: 409-412, 2007.

DELAMARE, A.P. et al. Antibacterial activity of essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chem.** 100:603-608, 2007.

DELAQUIS, P.J. et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **Int J Food Microbiol.** 74: 101-109, 2002.

DIGNANI, MC.; SOLOMKIN, JS.; ANAISSIE, E. *Candida*. In: Anaissie, E; McGinnis, M.R; Pfaller, M.A. (eds) *Medical Mycology.* 1ª Ed, Churchill Livingstone, Filadélfia, 195-239, 2003.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. **J Appl Microb.** 88: 308–316, 2000.

DRASAR, B. S.; HILL, M. J. Human Intestinal Flora. **Academic Press**, London, U.K, 1974.

DUARTE, D.; VERAS, M.A.; MARTINS, J.A. Perfil evolutivo da resistência do *Staphylococcus aureus* – experiência do Hospital Adventista Silvestre. In: Programa Oficial e Resumo de Trabalhos do VIII Congresso Brasileiro de Infectologia, Porto Alegre. Resumo nº 91, p. 82, 1994.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciências**. Campinas, n.7, 2006.

_____. Anti - *Candida* activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **J Ethnopharmacol**. 97: 305-311, 2005.

ELWELL, L. P.; SHIPLEY, P. L. Plasmid mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. **Annu Rev Microbiol**. 34: 465-496, 1980.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. For citation purposes: Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. **EFSA**. Italy, 765: 1-87, 2008b.

FELK, A.; SCHAFER, W.; HUBE, B. *Candida albicans* secretory aspartic proteinase (*SAP10*) gene. Gene Accession number AF146440, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/28863901> [Acesso: 18 JAN 2012].

FIGUEIREDO, E.A.P. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Rev Bras Ter Int**. 19(4), 2007.

FIO CRUZ/INCQS. Manual de Saneantes. Rio de Janeiro, 1992.

FREITAS, C.C.; FONSECA, A. Aspectos genéticos bioquímicos da resistência bacteriana aos antibióticos. In: Zanon, U; Neves, J. *Infecções hospitalares: prevenção, diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: Medsi. 207-249, 1987.

GALES, A.C.; TORRES, P.L.; VILARINHO, D.S. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital. **Braz J Infect Dis**. 8: 267-271, 2007.

GALLI, A.; FRANZETTI, L.; BRIGUGLIO, D. *In vitro* antimicrobial activity of essential oil and extracts of spices used in foods. **Ind Aliment – Italy**. 24(277): 463-466, 1985.

GILBERT, D.N. Aminoglycosides. In: Mandel, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, 6th Ed.; Elsevier, 328-355, 2005.

GNAN, S.O.; DEMELLO, M.T. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous goiaba extracts. **J Ethnopharmacol.** 68:103-108, 1999.

GOODMAN & GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9a ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill Interamericana editores. p.1436, 1996.

HAFIDH, R.R. et al. Inhibition of growth of highly resistent bacterial and fungal pathogens by a natural product. **Open Microbiol. J.** 5: 96-106, 2011.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J Antimicrob Chemoth.** 53, 1081-1085, 2004.

HANSON, M.S.; HEMPEL, J.; BRINTON, C.C. Purification of the *Escherichia coli* type 1 pilin and minor pilus proteins and partial characterization of the adhesin protein. **J Bacteriol.** 170: 3350–3358, 1988.

HUBE, B. et al. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. **Mol Microbiol.** 14: 87–99, 1994.

_____. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology.** 147: 1997-2005, 2001.

_____. Extracellular proteolytic activity of *Candida species*. In Proceedings of the Fifth Symposium on Topic in Mycology: Host–Fungus Interplay, Stanford, California, USA, June 27–30, 1995. Vanden Bossche, H., Stevens, D.A., and Odds, F.C. (eds). Bethesda: National Foundation for Infectious Diseases, pp. 109–122, 1997a.

HULIN, V. et al. Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. **Sci Aliment.** 18:563-582, 1998.

HUSSEIN, S.M. et al. Tannins from the leaves of *punica granatum*. **Photochemistry.** 45(4), 819-823, 1997.

HUSSEIN, A.M.S. Antibacterial and antifungal activities of some Libyan aromatic plants. **Planta Med.** 56: 644–649, 1990.

- IWATSUKI, K. et al. *Staphylococcal cutaneous* infections: invasion, evasion and aggression. **J Dermatol Sci.** 42: 203-214, 2006.
- JAIARJ, P. et al. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* .Linn. leaf extract. **J Ethnopharmacol.** 67: 203-212, 1999.
- JAY, J.M.I. Microbiologia de Alimentos. 6ª Edição, Porto Alegre: Artmed, 711p, 2005.
- JIMÉNEZ MISAS, C.A.; ROJAS HERNÁNDEZ, N.M.; LÓPEZ ABRAHAM, A.M. Biological evaluation of Cuban plants. **Rev Cubana Med Trop.** 31: 13-19, 1979.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Curr Med Chem.** 10: 813-829, 2003.
- KALPOUTZAKIS, E. et al. Composition of the essential oil of two nepeta species and *in vitro* evaluation of their activity against *Helicobacter pylori*. **Planta Med.** 67: 880-883, 2001.
- KARPANEN, T.J. et al. Enhanced chlorhexidine skin penetration with eucalyptus oil. **BMC Infect Dis.** 10: 278, 2010.
- KAPER, J. B. Molecular pathogenesis of enteropathogenic *Escherichia coli*. In: Miller, V.L.; Kaper, J. B.; Portnoy, D. A.; Isberg, R. R. eds. Molecular genetics of bacterial pathogenesis. **ASM Press**, Washington, DC, 1994.
- KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTYC Program Brazil 2003. **Braz J Infect Dis.** 9: 216-224, 2003.
- Kiska, D.L; Gillian, P.H. Pseudomonas. In: Manual of clinical Microbiology. Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Jorgensen, J.H; Tenover, R.H. (eds), 8th ed. Manual of Clinical Microbiology. **Am Soc Clin Microbiol**, Washington DC, 2003.
- KIVANC, M.; AKAGUL, A. Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. **Flavour Fragr J.** 1:175-179, 1986.
- Koneman, E. et al. Diagnóstico microbiológico. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 11, parte 1, 2011.

KOVARZ, L. et al. Rôle du facteur sigma σ (RpoS) dans la virulence de *Salmonella typhimurium*. Prix de La SPILF junior. 1re Journée Junior de la SPILF, 1031-1034, 1994.

LAURENS, A. et al. Étude de l'action antibatérienne d'extraits d'*Anacardium occidentale* L. **Ann Pharm Fr.** 40, 143-146, 1992.

LECHNER, R. M. et al. Identification and activity of Weyerone acid as a phytoalexin in broad bean (*Vicia faba*) after infection by *Botrytis*. **Phytochemistry.** 9: 249-252, 1970.

LEVINE, M. A.; XU, J. G.; KAPER, J. B. et al. A DNA probe to identify enterohaemorrhagic *Escherichia coli* of O 157.H7 and other serotypes that cause haemorrhagic colitis and haemolytic-uraemic syndrome. **J Infect Dis.** 156: 175-182, 1987.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **J Infect Dis.** 155: 377-389, 1987.

LI, X; MA, Z.D; LIVERMORE, D.M. Role of efflux pump (s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. **Antimicrob Agents Chemoth.** 38: 1742-1752, 1994.

LO CANTORE, P. et al. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var *vulgare* (Miller) essential oils. **J Agr Food Chem.** 52: 7862-7866, 2004.

LONFBOTTOM, C.J. et al. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. **J Antimicrob Chemoth.** 54: 386-392, 2004.

LORENZI, M. et al. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. **Antimicrob Agents Chemoth.** 53:2209-2211, 2009.

MACHADO, T.B. et al. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int J Antimicrob Agents.** 21: 279-284, 2003.

MAHON, C.R.; MANUSELIS, G. Textbook of diagnostic microbiology. 2.ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company. 463-514, 2000.

- MCGOWAN, J.E. Jr. Resistance in nonfermenting Gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **Am J Infect Control.** 34:(Suppl1):S29-S37, 2006.
- MIMICA-DUKIC, N. et al. Antimicrobial and antioxidant of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. **J Agr Food Chem.** 52: 2485-2489, 2004.
- MONOD, M. et al. Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. **Microbiology.** 144: 2731– 2737, 1998.
- MONOD, M. et al. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. **Mol. Microbiol.** 13:357–368, 1994.
- MOURA, F. As plantas que curam. Livraria Editora Ltda., Brasil, 1978.
- MORALES, M.A. et al. Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajava*. **Arch Med Res.** 25: 17-21, 1994.
- NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiol Mol Biol R.** 67: 400– 428, 2003a.
- NASCIMENTO, G.G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Braz J Microbiol.** 31: 247– 256, 2000.
- NATARAJAN, D. et al. Anticandidal and anticryptococcal activity of *Euphorbia fusiformis*, a rare medicinal plant. **World J Microbiol Biotechnol.** 23: 719-721, 2007.
- NAVARRO, V. et al. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **J Ethnopharmacol.** 53: 143-147, 1996.
- NICOLLS, J. M. Antifungal activity in *Passiflora* species. **Annals of Botany** (London), 34: 229-337, 1970.
- NZEAKO, B.C.; AL-KHAROUSI, Z.S.; AL-MAHROOQUI, Z. Antimicrobial activities of clove and thyme extracts. Sultan Qaboos University Mecial Journal. 6:33-39, 2006.

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**. 20: 7-14, 1982.

NOVICK, R.P. Pathogenicity factors and their regulation. *In*: Fischetti, V. A. *et al.* (eds.). Washington DC: ASM Press, 392-407, 2007.

NSEIR, S.; DI POMPEO, C.; SOUBRIER, S. First-generation fluoroquinolone use and subsequent emergence of multiple drug-resistant bacteria in the intensive care unit. **Crit Care Med**. 33: 283-289, 2005.

NUCCI, M.; Colombo, A. L. Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. **Braz J Infect Dis**. Salvador, 6(3): 2002.

OSKAY, M.; SARI, D. Antimicrobial screening of some Turkish medicinal plants. **Pharm Biol**. 45: 171-181, 2007.

OSMON, S.; WARD, S.; FRASER, V.J. *et al.* Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. **Chest**. 125: 607-616, 2004.

PARK, Y. K. *et al.* Estudo da Preparação dos Extratos de Própolis e suas Aplicações. **Ciênc Tecnol Alim**. Campinas-SP, 18(3), 1998.

PELLEGRINO, F.L. *et al.* Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro. **Brazil J Clin Microbiol**. 40:2420-2424, 2002.

Pinto, C.A.G. *et al.* Comportamento microbiológico das infecções comunitárias no Hospital Municipal Odilon Behrens (HNOB) – jan/94 a dez/95. *In*: Programa Científico Oficial do IX Congresso Brasileiro de Infectologia, Recife, n. 413: p. 184, 1996.

PINTO, E. *et al.* Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*. 58:1454-1462, 2009.

PLUMMER, N. New antimicrobial compositions which colonise the small intestine – contain non-pathogenic microorganisms and *Allium* plant material; for treating gastrointestinal and urogenital disease. U.S. Patent EP554319-A, 1992.

PRASHANTH, D.; ASHA, M.K.; AMIT, A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. **Fitoterapia**. v. 72: 171-173, 2001.

Prashar, A. et al. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, 63: 569–575, 2003.

PORTE, A.; GODOY, R. L.O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. Curitiba, 19(2): 193- 210, 2001.

RANGEL, E. et al. Avaliação das culturas de secreções do laboratório do Hospital Universitário de Brasília (HUB)-DF e do perfil de resistência aos antimicrobianos, de outubro/93 a março/94. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 28(1):263, 1995.

RAUHA, J. P. et al. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 56, n. 1, 3-12, 2000.

ROMAN-RAMOS, R. et al. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 48: 25- 32, 1995.

RYAN, K.J.; RAY, C.G. Sherris Medical Microbiology an introduction to infectious diseases. McGraw Hill, 2004.

SADER, H. Resistência bacteriana. Fascículo 1. Laboratórios Pfizer, São Paulo, 1998.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the sentry Antimicrobial Surveillance Program. **Braz J Infec Dis**. 5:200-214, 2001.

SAFDAR, N.; HANDELSMAN, J.; MAKI, D.G. Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteraemia? A meta-analysis. **Lancet Infect Dis**. 4:519-527, 2004.

- SAGDIC, O. et al. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiol.** 19 (5): 473-480, 2003.
- SAGDIC, O & OZCAN, M. Antibacterial and activity of Turkish spice hydrosols. **Food Control.** 14: 141-143, 2003.
- SALOMÃO, K. et al. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. Oxford Journals. eCAM Advance Access published, 2007.
- SANTOS FILHO, L.; FREITAS, F.I.S.; SIQUEIRA, Jr. J.P. Evolution of drug-resistance in *Staphylococcus aureus* from a Brazilian university hospital. **Folha Medica.** 108:101- 103, 1994.
- SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz J Microbiol.** 35(4), 275-280, 2004.
- SCALETSKY, I.C.A. et al. *Escherichia coli* strains producing LT toxin isolated from processed food. **Revista de Microbiologia.** São Paulo, 13(3), p.236-241, 1982.
- SCALETSKY, I.C.A.; SILVA, M.L.M.; TRABULSI, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect Immun.** 45:534-536, 1982b.
- SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. *Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- SCHUCK, V.J.A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Rev Bras Cien Farm.** 37: 45-49, 2001.
- SHALE, T.L.; STIRK, W.A.; VAN STADEN, J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. **J Ethnopharmacol.** 67:347-354, 1999.
- SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology. Reviews*, 17:14-56, 2004.

- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Lett Appl Microbiol.** 26: 118–122, 1998.
- SILVA, R.M.; TOLEDO, M.R.F.; TRABULSI, L.R. Correlation of invasiveness with plasmid in enteroinvasive strains of *Escherichia coli*. **J Infect Dis.** 146: 708, 1982.
- SILVA, S.R.S. et al. Análise de constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Rev Bras Plant Med.** 6:63-70, 2003.
- SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb). **Revista Ceres.** Viçosa, 57 (5), 589-594, 2010.
- SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Curr Opin Biotech.** 23:1-6, 2011.
- SOUSA, T. M. P.; CONCEIÇÃO, D. M. Atividade Antibacteriana do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L). **Ciência Veterinária.** 5(5), 2007.
- STEENKAMP, V.; FERNANDES, A.C.; VAN RENSBURG, C.E.J. Screening of Venda medicinal plants for antifungal activity against *Candida albicans*. **S Afr J Bot.** 73: 256-258, 2007.
- STRATTON, C.W. Nuances in antimicrobial susceptibility testing for resistant gram-positive organisms. **Antimicrob Infect Dis.** 18: 57-64, 2000.
- TAVARES, W. Manual de quimioterápicos antinfeciosos. Rio de Janeiro: Atheneu.770p, 1990.
- TEPE, B. et al. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *S. cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth) *S. multicaulis* (Vahl). **Food Chem.** 84:519-525, 2004.
- THOMAS, C. A.; ALLEN, E.H. An antifungal polyacetylene compound from *Phytophthora* infected safflower. **Phytopathology.** 60:261-263, 1970.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 8a. ed. Porto Alegre, Brasil: ARTMED, 2004.920p.

TRABULSI, L.R.; ALTHERTHUM, F. Microbiologia. *Staphylococcus aureus*. São Paulo: Atheneu, 20: 175-82, 2005.

VALLE, R.P. Resíduos de antibióticos em alimentos. **Revi Bras Med Vet.** 7(7), 206-208, 1985.

VIDAL, J.E. et al. Liver abscess due to *Salmonella enteritidis* in a returned traveler with HIV infection: case report and review of the literature. **Rev Inst Med Trop.** São Paulo, 45: 115-117, 2003.

ZAIKA, L.L. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. **J Food Nutr.** 9:97-118, 1988.

ZHANG, Z. et al. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Tovomita krukovii*. **Planta Med.** 68: 49-54, 2002.

YAMAMOTO, H.; OGAWA, T. Antimicrobial activity of *Perilla* seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. **Biosci Biotechnol Biochem.** 66(4):921-924, 2002.

WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 5a ed. Philadelphia Lippincot Williams & Wilkins p.1114, 2002.

WRAY, C.W.; SOJKA, W.J. Reviews of the progress of dairy science: bovine salmonellosis. **Journal of Dairy Science.** Champaign, 44(2): 383-425, 1977.

7. ANEXOS

Anexo 1



3380099835931218

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010363/2012-2

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 161/2010, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

CNPJ: 460.684.250/0001-33

Representante Legal: RONALDO ALOISE PILLI

Cargo/Função: Pró-Reitor de Pesquisa

CPF: 850.557.788-49 **RG:** 54628908

Projeto: Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas pertencentes à CPMA ? Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA/UNICAMP

Coordenador do Projeto: Marta Cristina Teixeira Duarte

CPF: 057.273.778-54 **RG:** 11707361 - SSP / SP

Finalidade do projeto: Estudos recentes da literatura sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais demonstram o grande potencial de aplicação das plantas medicinais nativas de diversas regiões do mundo. As plantas medicinais têm sido utilizadas em várias áreas da saúde como forma alternativa de tratamento e prevenção de doenças, principalmente devido ao baixo custo em detrimento aos medicamentos industrializados. Por outro lado, a resistência de patógenos humanos a múltiplas drogas é bem conhecida atualmente. Há a necessidade da busca de substâncias antimicrobianas a partir de novas fontes vegetais, incluindo plantas utilizadas na medicina popular, por oferecerem grande variedade de compostos com propriedades terapêuticas. É por meio da enorme biodiversidade da flora do Brasil e do mundo que são necessários futuros estudos com novas plantas a fim de investigar novas propriedades farmacológicas de seus compostos. Assim, os objetivos deste trabalho são: a) Determinar a atividade antimicrobiana, ou seja, a concentração mínima inibitória ? MIC e a concentração bactericida/fungicida mínima (MBC/MFC, respectivamente) de óleos essenciais de 8 espécies medicinais e do extrato de Passiflora incarnata e Perilla frutescens pertencentes à CPMA, para os microrganismos Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella choleraesuis, Staphylococcus aureus e para a levedura Candida albicans. b) Identificar quimicamente e fracionar os óleos essenciais e o extrato de melhor atividade antimicrobiana. c) Determinar a atividade antimicrobiana das frações dos óleos e extrato de melhor atividade, visando relacionar a atividade com a composição das frações mais ativas.

Amostras a serem acessadas:

Espécie(s): Bixa orellana

Tipo de material/quantidade de amostras: 200g de folhas frescas

Local de depósito de subamostra: CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS

Equipe do projeto: MARTA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE / CPF 057.273.778-54

FLAVIA PINHO DA CUNHA PEDROSA / CPF 366.866.778-09

ADILSON SARTORATTO / CPF 042.809.608-52

VERA LUCIA GARCIA REHDER / CPF 015.677.898-03

GLYN MARA FIGUEIRA / CPF 057.205.448-36

Validade da Autorização: 20/07/2012 a 10/07/2013

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio da Plataforma Carlos Chagas, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010363/2012-2. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRM). Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, mormente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 20 de Julho de 2012

Paulo Sergio Lacerda Beirao
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 3380099835931218 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.