

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E AVALIAÇÃO DE POTENCIAL SINÉRGICO

ISABELLA DA SILVA PROBST

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas – Estrutura e função.

Prof. Dr. Ary Fernandes Junior



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
AVALIAÇÃO DE POTENCIAL SINÉRGICO

ISABELLA DA SILVA PROBST

PROF. DR. ARY FERANDES JUNIOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas – Estrutura e função.

Prof. Dr. Ary Fernandes Junior

**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**

Probst, Isabella da Silva.

Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico
/ Isabella da Silva Probst. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Botucatu

Orientador: Ary Fernandes Junior

Capes: 10601058

1. Microbiologia médica. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Bactérias
patogênicas.

Palavras-chave: Ação antibacteriana, Óleos essenciais, Sinergismo, Produtos
naturais, Drogas antimicrobianas, Bactérias patogênicas, Resistência bacteriana.

AGRADECIMENTOS

“Um mestre funciona como um agente catalisador, cuja simples presença estimula. (...) Ele não pode entregar a você aquilo que conhece, mas pode criar um certo campo de energia no qual suas pétalas podem se abrir, no qual as suas sementes serão encorajadas, em que você pode criar coragem suficiente para dar o salto, no qual o milagre torna-se possível.”

Osho Zen

Aos meus pais, que me fazem enxergar que a vida não é um mar de rosas, mas que viver entre espinhos é uma opção, e assim sendo, não me empurram, mas me encorajam de seguir adiante.

A todos meus familiares que, perto, longe, ou no coração, sempre me apoiaram e me deram auxílio, com sentimentos, gestos, palavras, pensamentos.

Às mais que companheiras de bancada, mas do dia a dia, de viagens, e de parte da minha vida: obrigada pela força, pelas risadas, pelos puxões de orelha, por tudo que me ensinaram: Lidi e Bruna – e menos tempo, mas não menos especial, Mari. Também a todas as outras colegas que me receberam e doaram um pouco de si, contribuindo para o meu aprendizado: Priscila, Nathália, Gabriela, Cristiane.

Aos amigos microbiologistas, companhia agradável para todas as horas: Valéria, Carlos, Natália, Mariana, Luíza, Carla, Danilo, Maria Rachel, Tâmara, Lígia.

Aos meus amigos paulistanos, que sempre me querem mais perto, e cuja falta nunca ai passar: Vivi, Pri, Bruno, G, Léo, Harry...

Aos amigos que me acompanham em Botucatu por anos, uns mais, outros menos, mas sem os quais muitas coisas não teriam graça, e muitas coisas perderiam o sentido: K-lú, Hã, Tops, Mukeka, Natália, Jennifer, Miguel, Caracas, Hurley.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado concedida.

À Prof^ª. Dr^ª. Teruê Sadatsune, Prof^ª.Dr^ª Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha e Prof^ª. Dr^ª Vera Lúcia Mores Rall pelo fornecimento de cepas bacterianas para a realização dos testes de sensibilidade antimicrobiana, e por todos os esclarecimentos e sugestões feitos no decorrer dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Júlio Toshimi Doyama do Departamento de Química e Bioquímica pelas realizações das análises cromatográficas dos óleos essenciais.

Ao Prof. Dr. Luciano Barbosa do departamento de Bioestatística pela elaboração das análises estatísticas dos resultados.

Aos funcionários de Departamento de Microbiologia e Imunologia, cujo apoio está sempre à disposição, e sem ele, qualquer experimento se torna mais trabalhoso.

Aos Professores Doutores que participaram da avaliação do projeto tanto na banca de Qualificação, quanto da banca da Defesa.

Ao Professor Doutor Ary Fernandes Junior, que ao aceitar me orientar na Iniciação Científica, mal sabia que ganharia uma mestranda. Agradeço a todo o conhecimento doado, compartilhado e gerado nesses anos, e além de todo apoio profissional, espero que a Vida lhe presenteie com muitos orientados, e que cada um possa herdar um pedacinho da sua atenção, dedicação e paciência com as quais pude contar para concretizar esta conquista.

E àqueles que não foram citados, mas estiveram presentes nas horas em que mais precisei: seja pra brindar, seja pra rir, pra abraçar, ou apenas compartilhar um silêncio.

SUMÁRIO

Resumo	01
Palavras-chave	02
ABSTRACT	04
Keywords	05
INTRODUÇÃO	07
1. PLANTAS MEDICINAIS	07
1.1. Metabolismo secundário: aspectos gerais	07
1.2. Óleos essenciais (OE)	10
2. BIOSÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS	11
2.1. Terpenóides	11
2.2. Alcaloides	14
2.3. Compostos fenólicos	17
3. INFLUÊNCIAS NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	19
3.1. Fatores abióticos	19
3.2. Fatores bióticos	22
4. AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS	24
Capítulo I - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS	
Abstract	29
Keywords	29
INTRODUÇÃO	30
PARTE EXPERIMENTAL	33
Obtenção das plantas	33
Obtenção dos óleos essenciais e caracterização química	33
Linhagens bacterianas	34
Concentração Inibitória Mínima (CIM)	34
Análise estatística	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
AGRADECIMENTOS	41
REFERÊNCIAS	41
Tabela 1	45
Tabela 2	46

Tabela 3	47
Tabela 4	48
MATERIAL SUPLEMENTAR	49
LISTA DE FIGURAS	49

Capítulo II - SINERGISMO DO EFEITO INIBIDOR DO CRESCIMENTO BACTERIANO ENTRE ÓLEOS ESSENCIAIS E ANTIBIÓTICOS

Resumo	54
Palavras-chave	54
1. Introdução	55
2. Resultados e discussão	57
3. Parte experimental	71
3.1. <i>Obtenção das plantas</i>	71
3.2. <i>Óleos essenciais (OE) e caracterização química</i>	71
3.3. <i>Linhagens bacterianas</i>	72
3.4. <i>Ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	72
3.5. <i>Sinergismo entre os óleos essenciais e com drogas antimicrobianas convencionais</i>	73
3.5.1. <i>Metodologia dos discos (Kirby & Bauer)</i>	73
3.5.2. <i>Metodologia da microdiluição</i>	73
3.5.3. <i>Curvas de sobrevivência</i>	74
3.6. <i>Análise estatística</i>	74
Agradecimentos	75
Referências	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
Anexos	
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	87
Comprovante de Submissão de Artigo	88
Cromatogramas dos óleos essenciais puros	89
Cromatogramas das combinações entre os óleos essenciais	92
Fotos	95
Diagramação do ensaio para verificação de sinergismo (microdiluição)	97
Resultados obtidos para os ensaios da microdiluição	100

RESUMO

RESUMO

As pesquisas sobre as propriedades medicinais de plantas estão focadas em diversas áreas, tendo a atividade antimicrobiana e o uso potencial contra linhagens multirresistentes recebido atenção especial. O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial antimicrobiano de sete óleos essenciais (OE) isoladamente, e verificar o possível sinergismo de alguns destes OE quando combinados entre si e com antimicrobianos padronizados sobre linhagens bacterianas de importância clínica com perfis de resistência diferenciados, sendo estas de *Staphylococcus aureus* (linhagens meticilina-resistentes, MRSA, e meticilina-sensível, MSSA), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (todos isolados clínicos humanos) e *Salmonella* spp. (isolados clínicos e de alimentos). Os ensaios foram divididos em duas etapas. Inicialmente (Artigo I), foi obtida a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os óleos de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia* D.C.), cravo da Índia (*Caryophyllus aromaticus* L.), canela (*Cinnamomum zeylanicum* L.), camomila (*Matricaria recutita* L.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.), através da metodologia de diluição em Agar. Os OE foram caracterizados através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), sendo a composição química de cada óleo relacionada com sua atividade sobre os diferentes perfis bacterianos. Na segunda parte do estudo (Artigo II), baseando-se no potencial de ação e rendimento de extração dos óleos, foi avaliado o sinergismo entre os quatro óleos com maiores potenciais, bem como a atividade conjunta destes com tetraciclina e oxacilina frente *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. A combinação entre os OE e antibióticos foi testada utilizando a metodologia de difusão em discos. O potencial sinérgico entre os óleos também foi avaliado por esta metodologia e pela microdiluição em placas. A possível interação entre os óleos também foi verificada através da metodologia de curva de sobrevivência durante um período de 24 horas, sendo que nestes ensaios utilizou-se $\frac{1}{4}$ dos valores obtidos para a CIM_{90%}. Quando aplicados isoladamente, os óleos mostraram melhores resultados sobre as linhagens de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*), confirmando a menor sensibilidade de bactérias Gram-negativas aos produtos naturais. O OE mais eficiente sobre todas as bactérias testadas foi o de canela (*C. zeylanicum*), com valores de CIM_{90%} de 0,23 mg/ml para *S. aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli*, e 0,83 mg/mL para *P. aeruginosa*. No entanto, o OE de pitanga (*Eugenia uniflora*) foi o menos ativo contra todas as linhagens (com a menor CIM_{90%} obtida frente a *S. aureus* MSSA, 50,82 mg/ml). Através da metodologia de difusão por discos, as melhores combinações ocorreram entre os discos contendo 15 µl de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e os OE de *B.*

dracunculifolia sobre *S. aureus* e *C. aromaticus* sobre *E. coli* diluídos na proporção de $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} em MHA, enquanto para *P. aeruginosa*, a melhor combinação se deu entre os discos contendo OE de *B. dracunculifolia* e *C. aromaticus* ($\frac{1}{4}$ CIM_{90%}) diluído no MHA. Quando empregada a microdiluição, observa-se que os melhores índices de sinergismos ocorreram nas combinações com os OE de *C. aromaticus* e *C. zeylanicum* frente a *S.aureus* e *E. coli*, e de *C. aromaticus* frente *P. aeruginosa*. Com a realização de curvas de sobrevivência para as cepas ATCC, observamos atividade bactericida principalmente para os OE de *C. aromaticus* e *R. officinalis*, sozinhos ou combinados (na proporção equivalente a $\frac{1}{4}$ da CIM_{90%} de cada óleo) sobre todas espécies bacterianas testadas. Estes resultados corroboram o uso de óleos essenciais como alternativa ao uso de antibióticos no tratamento de infecções bacterianas, estimulando a investigação da aplicação destes produtos naturais de forma isolada ou combinada a outros medicamentos de forma segura para o ser humano.

Palavras chave: ação antibacteriana, óleos essenciais, sinergismo, produtos naturais, drogas antimicrobianas, bactérias patogênicas, resistência bacteriana.

ABSTRACT

ABSTRACT

Research about medicinal properties of plants is focused on several areas, and its antimicrobial activities and potential use against multiresistant strains have received special attention. This study aimed to assess the antimicrobial potential of seven essential oils (EO) alone, and the possible synergism of some of these EO when combined with each other and with standard antimicrobials against clinically important bacterial strains with different resistance profiles, among them, *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-sensitive (MSSA) STRAINS), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (all human clinical isolates), and *Salmonella* spp. (clinical and food samples). The tests were divided into two steps. Initially (Article I), we obtained the minimum inhibitory concentration (MIC) for assa peixe (*Vernonia polyanthes* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia* DC), clove (*Caryophyllus aromaticus* L.), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.), chamomile (*Matricaria recutita* L.) and Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) oils, by agar dilution method. The OE were characterized by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and the chemical composition of each oil was related to the antimicrobial activity against the different bacterial profiles. In the second part of the study (Article II), based on the action potential and yield of extraction of the oils, we evaluated the synergism between the four oils with higher potential, as well as the synergism with tetracycline and oxacillin against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. The combinations between EO and antibiotics were tested by the disc diffusion method. The synergistic potential of the oils was also evaluated by this method and by the microdilution. The possible interaction between the oils was also verified through the methodology of time-kill curve during a 24 hour period, and in these tests we used $\frac{1}{4}$ of the MIC_{90%} values obtained. When applied alone, the oils showed better results on the Gram-positive bacteria strains (*S. aureus*), confirming the lower sensitivity of Gram-negative to natural products. The most efficient EO against all bacteria tested was the cinnamon (*C. zeylanicum*), with MIC_{90%} values of 0.23% mg/ml for *S. aureus*, *Salmonella* spp. and *E. coli*, and 0.83 mg/mml for *P. aeruginosa*. However, the Brazilian cherry EO (*E. uniflora*) was less active against all strains (with the lowest MIC_{90%} value obtained against *S. aureus* MSSA, 50.82 mg / ml). Through the disc diffusion methodology, the best combinations occurred between the disks containing 15 μ l of rosemary EO (*R. officinalis*), and the *B. dracunculifolia* and *C. aromaticus* EO diluted at a ratio of $\frac{1}{4}$ MIC_{90%} in MHA against *S. aureus* and *E. coli*, respectively, while for *P. aeruginosa*, the best combination was found between the disks containing *B. dracunculifolia*

EO and *C. aromaticus* ($\frac{1}{4}$ MIC_{90%}) diluted in MHA. In the microdilution, it is observed synergisms indicators occurring in the combination between *C. aromaticus* and *C. zeylanicum* EO against *S. aureus* and *E. coli*, and *C. aromaticus* against *P. aeruginosa* strains. On the time-kill curves for ATCC strains, bactericidal activity was observed mainly for the *C. aromaticus* and *R. officinalis* EO, alone or in combination (in a proportion equivalent to $\frac{1}{4}$ of the MIC_{90%} for each oil) against all bacterial species tested. These results confirm the essential oils use as alternative antibiotics to treat bacterial infections, stimulating research about application of these natural products isolated or combined with other drugs to humans, safely.

Keywords: antibacterial activity, essential oils, synergism, natural products, antimicrobial drugs, pathogenic bacteria, bacterial resistance.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. PLANTAS MEDICINAIS

1.1. Metabolismo secundário: aspectos gerais

Desde a Antiguidade, o Homem se encanta com a beleza de uma floresta centenária, uma árvore frutífera carregada, ou com o colorido das flores. E desde então se utiliza das plantas como fonte de alimentos, bebidas, pigmentos, fibras têxteis e materiais para a construção de moradias e meios de transporte. Mais recentemente, pode isolar compostos e moléculas com potencial farmacológico, tais como taninos, flavonoides, fenois, alcaloides, terpenoides, entre outras classes (Gurib-Fakim, 2006).

O metabolismo das plantas depende de sua fisiologia, e pode ser dividido em metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário sempre foi considerado essencial a todas as espécies, tendo caráter conservativo e universal, e é responsável pelo desenvolvimento e manutenção celular. Participam desses processos substâncias comuns tais como carboidratos, lipídeos, proteínas, clorofila e ácidos nucleicos. Diferentemente, até pouco tempo atrás, não se sabia ao certo qual a função do metabolismo secundário nas plantas. Acreditava-se que os compostos secundários eram produtos sem valor, ou mesmo resultante de erro metabólico, super-expressão proteica, excreta ou desintoxicação das plantas. Porém, a partir da década de 50, após estudos envolvendo diversas áreas do conhecimento, o metabolismo secundário passou a ser mais bem compreendido. Os produtos resultantes são comuns entre certos grupos taxonômicos, ou exclusivos para determinada espécie, e oferecem vantagens para a manutenção e desenvolvimento das plantas que os sintetizam. Estes fenômenos incluem processos como a defesa contra patógenos e herbívoros, atração de polinizadores, permitir a tolerância de temperaturas extremas e processos de adaptação a estresse hídrico ou deficiência de nutrientes e minerais do solo. Na **Figura 1**, são apresentados alguns destes compostos gerados no metabolismo secundário e alguns processos adaptativos das plantas envolvidas.

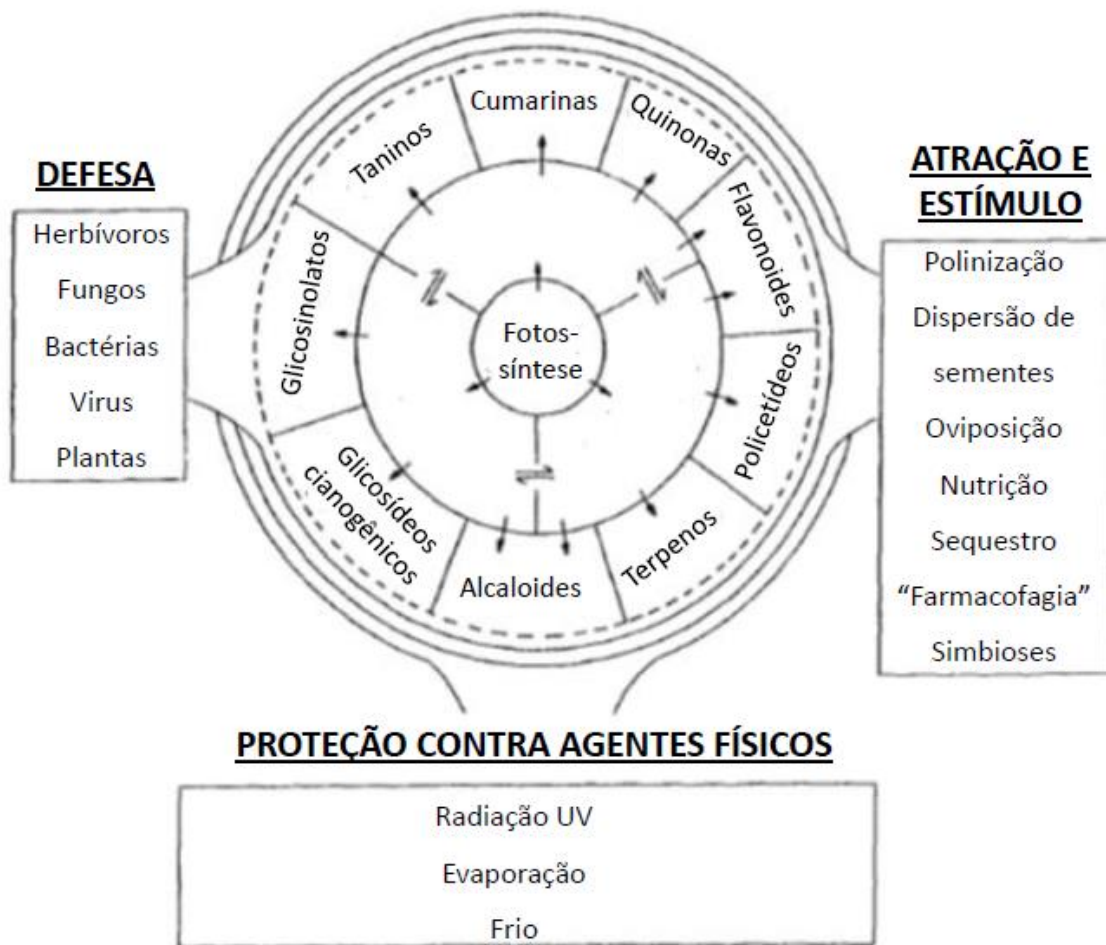


Figura 1. Alguns compostos originados no metabolismo secundário de plantas e suas implicações adaptativas (Fonte Hartmann, 1996).

Certos animais reconhecem e fazem uso das propriedades farmacológicas de alguns metabólitos secundários na natureza. É o caso da farmacofagia, comportamento nutricional observado em alguns herbívoros, que ao se alimentarem de algumas plantas específicas buscam preferencialmente compostos não-nutritivos, como por exemplo metabólitos secundários que serão utilizados em processos de defesa, reprodução, ou ambos (Boppré, 1984). Outro exemplo é o que ocorre com algumas espécies de macacos e outros primatas que incluem intencionalmente algumas plantas em sua dieta objetivando, efeitos analgésicos, antimicrobianos, anti-inflamatórios, imunomoduladores, antidiarrêicos, digestivos e de regulação da fertilidade (Huffman, 1997).

O uso de plantas e derivados pelo Homem objetivando a promoção e manutenção de sua saúde pode ser comprovado historicamente por registros de longa data, como por

exemplo, os egípcios, assírios, mesopotâmicos, indianos, chineses e outras civilizações que sempre contavam com a figura de curandeiro ou equivalente. Era quem indicava a espécie de planta correta para afecções variadas, desde febres, distúrbios psicológicos e gastrointestinais, a infecções bacterianas, acne, gota, e até epilepsia, pelo emprego de formulações simples, como cataplasmas, chás, decoctos, pós, defumadouros, tinturas e outras formulações herbais (Balunas & Kinghorn, 2005; Halberstein, 2005).

Tal conhecimento, acumulado durante séculos, continua sendo valioso para as gerações atuais. A etnofarmacologia fornece pistas sobre substâncias potencialmente úteis no desenvolvimento de novos fármacos baseado em observações feitas em diversas áreas como química, bioquímica, botânica, farmacologia e antropologia (Fabricant & Farnsworth, 2001). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 25% dos medicamentos hoje utilizados são derivados direta ou indiretamente do legado sobre o uso de plantas medicinais, sendo esta porcentagem ainda maior atingindo 60% se consideradas classes específicas de medicamentos - por exemplo, para antimicrobianos e antitumorais.

Em alguns países industrializados, como França, Itália e Alemanha, estima-se que entre 70 – 90% destas populações recorrem ao conhecimento popular, sob o cunho de “medicina complementar”, “alternativa” ou “não convencional”. Esta mesma taxa pode ser observada em países em desenvolvimento, porém sob uma realidade diferente, uma vez que o acesso aos medicamentos padronizados é precário, sendo a medicina popular a principal fonte de prevenção, tratamento e manutenção da saúde de grande parte da população nestes países, (WHO, 2011).

Dentre os vários medicamentos a base de plantas, a síntese da heroína, e mais tarde, do ácido acetilsalicílico (Aspirina®) foi fundamental para o início da organização da indústria farmacêutica. A partir de então, no final do século XIX, as plantas passaram a ter um valor comercial mais significativo, pois a possibilidade de se isolar, purificar ou até mesmo sintetizar princípios ativos isolados de plantas impulsionaram a expansão das pesquisas farmacêuticas, principalmente após a Segunda Guerra Mundial. Alguns medicamentos fundamentados em derivados vegetais têm importância até hoje, como a quinina (antimalárico), Taxol®, vincristina e vimblastina (quimioterápicos), e a digoxina (cardiotônico). Porém, a pesquisa e desenvolvimento de drogas baseadas em produtos naturais, incluindo derivados vegetais, por vezes são declinados. O desencorajamento das organizações farmacêuticas pode ser explicado pelas dificuldades

de isolar e identificar novos compostos bioativos, e pela relação custo \times benefício, em termos de patenteamento (Raskin *et al.*, 2002; Newman, 2008; Li & Vederas, 2009).

Apesar dos obstáculos presentes no desenvolvimento de fármacos baseados em derivados de plantas, o interesse da indústria farmacêutica pela procura de substâncias vegetais biologicamente ativas foi reativado na década de 90. Embora avanços tecnológicos importantes tenham sido conquistados pela química sintética, muitos compostos bioativos isolados de plantas são formados por misturas de moléculas complexas, tornando sua obtenção no laboratório um processo por vezes inviável (Walsh & Fischbach, 2010). E mesmo tendo alto potencial, um composto isolado nem sempre resulta em um medicamento, o que torna a bioprospecção de metabólitos secundários em um mercado de risco. Para aprimorar a pesquisa envolvendo estas substâncias, a indústria farmacêutica tem direcionado o desenvolvimento de novos fármacos de forma racional, através de bioensaios para moléculas-alvo específicas, amparados também pelo conhecimento de alguns mecanismos de ação farmacológica de produtos vegetais (Montanari & Bolzani, 2001).

1.2. Óleos essenciais (OE)

O termo óleo essencial foi definido no século XVI por Paracelso, médico e alquimista suíço, para quem o componente efetivo de uma droga era a “quinta essência”. Podem ser extraídos de parte de plantas como frutas, flores, cascas, ou de plantas inteiras, como especiarias e ervas medicinais. São caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas. Parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais são creditadas aos óleos essenciais (OE). Fisicamente, se apresentam no estado líquido à temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro. Não se misturam à água, e podem ser extraídos de diferentes modos, como hidrodestilação, destilação a vapor, CO₂ supercrítico, ou com a utilização de solventes orgânicos ou gorduras. O óleo obtido de uma de planta serve como característica para aquela espécie. Mesmo que óleos diferentes apresentem compostos iguais qualitativamente, diferenças quantitativas farão com que aquele óleo tenha propriedades químicas e biológicas diferentes dos demais (Trombetta *et. al.*, 2005, Edris, 2007).

Os óleos essenciais são utilizados há séculos como flavorizantes, na fabricação de cosméticos e perfumarias, e farmacologicamente com fins medicinais, o que tem

estimulado a procura por substâncias biologicamente ativas e eficazes, especialmente sobre microrganismos. Outro aspecto é que pelo fato de serem naturais e biodegradáveis geralmente apresentar baixa toxicidade aos mamíferos e por poderem atuar sobre várias moléculas-alvo ao mesmo tempo, quando comparado a fármacos sintéticos, tornam-se substâncias chaves para a pesquisa de novos medicamentos (Figueiredo *et al.*, 2008).

Os aspectos de caracterização química dos OE podem ser obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, sendo que alguns óleos apresentam mais de 60 compostos diferentes. Os componentes majoritários às vezes representam mais de 85% do total, enquanto outros compostos aparecem em quantidades ínfimas, embora a proporção não esteja relacionada com a grandeza de sua atividade, podendo esta inclusive ser fundamental para a ação farmacológica dos demais (Galindo *et al.*, 2010).) A atividade dos OE engloba ação fitoterápica, antiviral, antisséptica, nutricional, antifúngica, entre outras. A atividade bacteriostática e /ou bactericida de OE é exercida principalmente por compostos terpenoides (Burt, 2004). Porém, a composição e a atividade de um óleo essencial pode ser modificada por vários aspectos, desde o modo de extração, a fatores próprios da planta e do ambiente em que ela está inserido, fatores estes que estão detalhados adiante (Silva *et al.*, 2011).

2. BIOSÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS

Os produtos do metabolismo secundário podem ser divididos em três grandes grupos segundo a sua biossíntese: terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos. Em torno de 55000 terpenoides já foram isolados, podendo estes apresentar funções tanto no metabolismo primário como secundário. Aqueles produzidos pelo metabolismo secundário são derivados da molécula precursora de cinco carbonos, o isopentenil difosfato (IPP). Os cerca de 12000 alcaloides conhecidos apresentam uma ou mais moléculas de nitrogênio, sendo sintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Os compostos fenólicos conhecidos, em torno de 8000, podem ser sintetizados pela via do ácido chiquímico, ou via do acetato/malonato (Croteau *et al.*, 2000).

2.1. Terpenoides

Os terpenoides são também conhecidos como isoprenoides e constituem uma classe de produtos naturais obtidos de plantas com a maior variedade estrutural e funcional. Alguns destes compostos participam de processos como respiração e desenvolvimento celular, portanto importantes ao metabolismo primário. Entretanto, a

maioria dos terpenoides são produtos do metabolismo secundário, tendo como função intermediar a relação planta \times ambiente. Nas plantas superiores, existem duas vias distintas capazes de sintetizar os precursores universais dos isoprenoides, isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). No citosol, IPP é gerado pela via do ácido mevalônico (MVA), e através da ação da enzima IPP-isomerase, pode originar DMAPP; ao passo que a síntese nos cloroplastos ocorre via do 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), sendo esta via presente também em alguns protozoários e na maioria das eubactérias (Phillips *et al.*, 2008).

A síntese de ácido mevalônico a partir de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA é catalisada pela enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGR), etapa que regula esta via. A conversão de MVA em IPP ocorre por uma sequência de ações enzimáticas por MVA quinase; fosfomevalonato quinase; e pirofosfomevalonato descarboxilase. Os isoprenoides plastídicos são sintetizados pela via do metileritritol fosfato, também conhecida como via não-MVA ou via de Rohmer. Nesta, há a condensação de uma molécula de piruvato com uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato, originando 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP), seguida pelo rearranjo e redução para MEP, pela enzima DXP redutoisomerase (DXR). Por uma série de reações subsequentes, IPP e DMAPP são originados como produtos finais (Enfissi *et al.*, 2005).

As primeiras pesquisas indicavam que o IPP sintetizado no citosol seria precursor do farnesil difosfato (FDP) para a síntese de sesqui- (C15) e triterpenos (C30), da mesma forma que o IPP sintetizado nos plastídios seria precursor para o geranyl difosfato (GDP), utilizado na síntese de monoterpenos (C10), e geranylgeranyl difosfato (GGDP), utilizado na síntese de di- (C20) e tetraterpenos (C40). Porém, através do bloqueio das vias MVA e MEP por inibidores, foi demonstrado que a separação entre essas duas rotas é quase inexistente, uma vez IPP e DMAPP sintetizados no citosol podem ser desviados para o metabolismo nos cloroplastos, e vice-versa, como esquematizado na **Figura 2** (Biswas *et al.*, 2009).

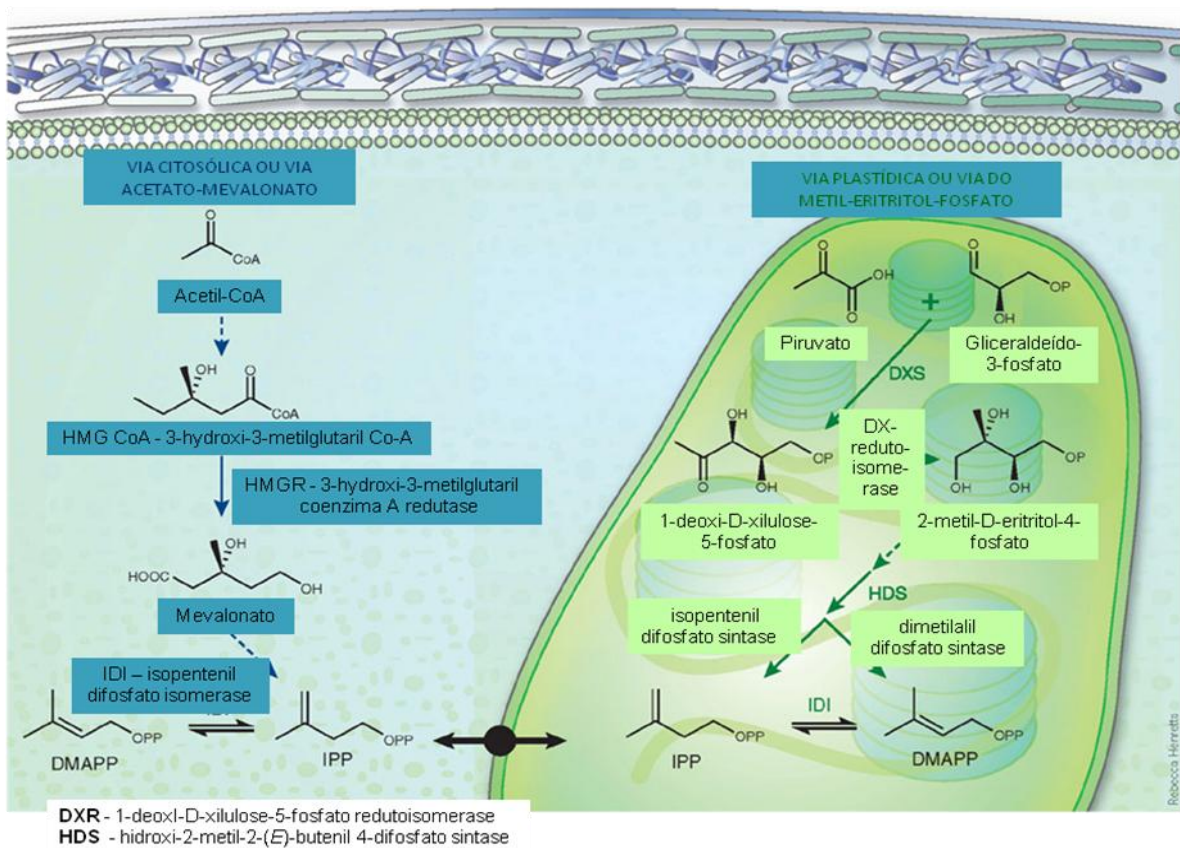


Figura 2. Esquema das duas vias possíveis para a síntese de IPP (isopentenil difosfato) e DMAPP (dimetilalil difosfato), mostrando a comunicação entre ambas. (adaptado de Roberts, 2007).

Os terpenoides atuam nas plantas em diferentes funções características, como por exemplo, na produção de hormônios (giberelinas), pigmentos fotossintéticos (carotenoides), carreadores de elétrons (ubiquinonas), e em mecanismos de defesa e comunicação. A maioria dos compostos apresenta baixo peso molecular, natureza lipofílica, grande variedade de estruturas e alta pressão de vapor à temperatura ambiente (Bakkali *et al.*, 2008).

Os monoterpenos são bem conhecidos como constituintes da essência volátil de flores e óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e ervas aromáticas, justificando sua importância para a indústria de perfumes e aromatizantes. O geraniol, mentol, linalol e o citral são exemplos de monoterpenos. Assim como os monoterpenos, muitos sesquiterpenos podem atuar como compostos antimicrobianos (fitoalexinas) e anti-herbivoria. Fazem parte desta classe farnesol, zingibereno e cariofileno. As resinas ácidas apresentadas por coníferas e leguminosas, os hormônios giberelinas, fitoalexinas, e metabólitos secundários farmacologicamente importantes (como Taxol®,

quimioterápico, e forscolina, usada no tratamento de glaucoma) são exemplos de diterpenos. Os triterpenos são sintetizados a partir da condensação cauda-cauda de duas unidades de sesquiterpeno (pela extremidade fosfato). Os brassinoesteroides, fitoesteroides de membrana, algumas fitoalexinas, toxinas e componentes de ceras cuticulares compõem esta ampla classe de compostos químicos. Como exemplos de tetraterpenos, podem ser citados os carotenoides, pigmentos intimamente ligados aos processos fotossintéticos. Existe ainda um grupo complexo de terpenos cujas moléculas são resultantes da síntese de mais de oito unidades de isoprenoides. Chamado de politerpenoides, contêm compostos como ubiquinonas, poliprenoides e polímeros longos encontrados, por exemplo, no látex (Croteau *et al.*, 2000).

2.2 Alcaloides

Alcaloides são produtos naturais de baixo peso molecular, caracterizados pela presença de um átomo de hidrogênio em sua estrutura básica. Constituem uma classe numerosa que é dividida em subclasses por apresentar vias de síntese não relacionadas evolutivamente (**Figura 3**). Segundo Kutchan (1995), desde a descoberta da morfina (isolada de *Papaver somniferum*, papoula) foram descritos mais de 20000 compostos isolados, sintetizados e acumulados por cerca de 20 % das espécies de plantas.

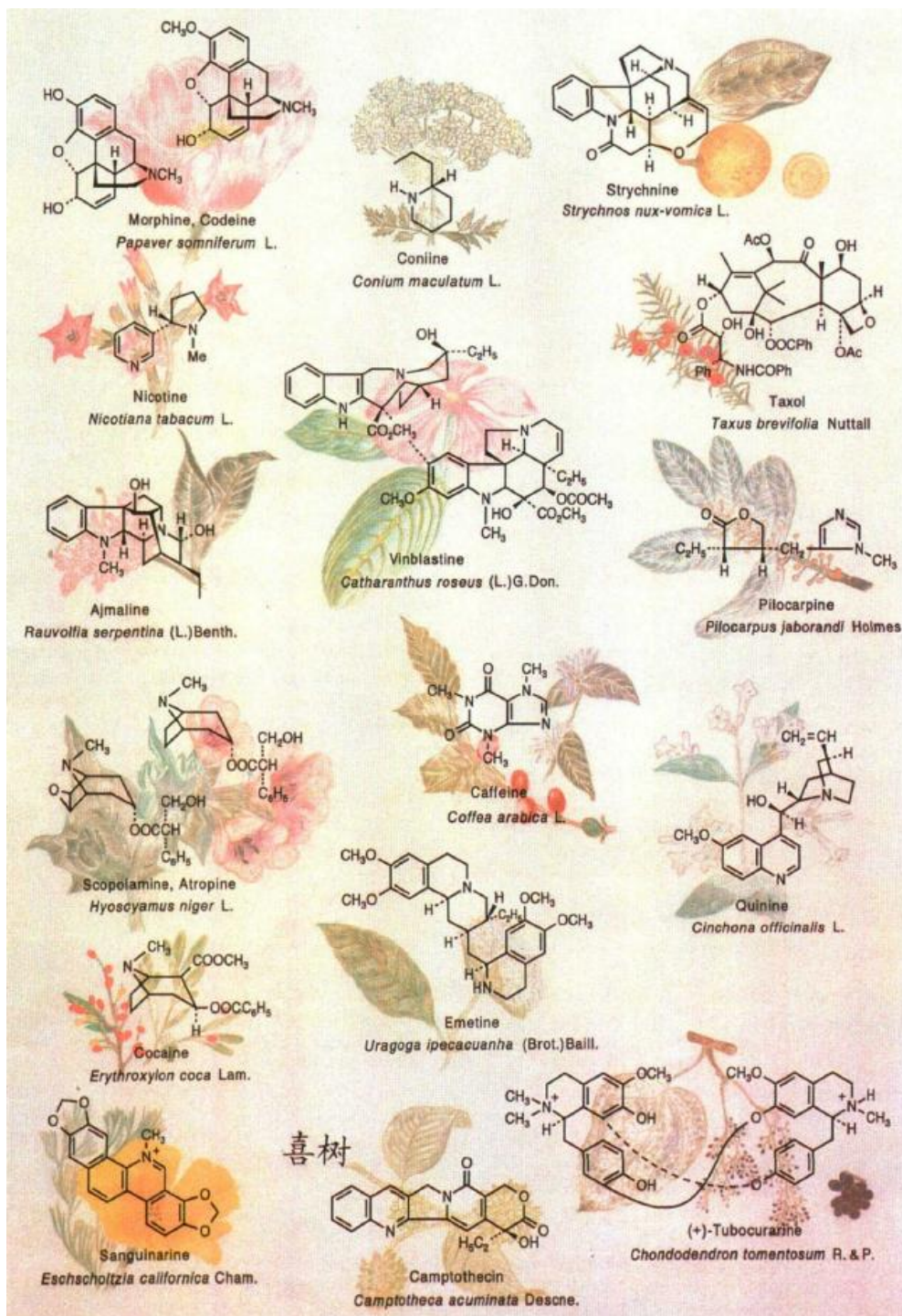


Figura 3 Ilustração de algumas plantas e respectivos alcaloides isolados; entre elas estão o café, a papoula e a quina. (Kutchan, 1995).

Apesar da existência de algumas características em comum, particularidades da bioquímica, biologia celular e biologia molecular comprovam as diferenças entre as subclasses de alcaloides. Enzimas envolvidas na catálise de reações em mamíferos compartilham de mecanismos de ação comuns onde cada uma pode agir sobre um

amplo espectro de substratos. Já as reações envolvidas na biossíntese dos alcalóides são catalisadas por enzimas estereoespecíficas (formação de somente um isômero, em detrimento de outro arranjo espacial), regioespecíficas (formação de somente um de dois produtos possíveis), com ação determinada sobre substratos específicos. Os principais aminoácidos envolvidos nestes processos são lisina, ornitina, tirosina e triptofano. Sozinhos ou combinados com moléculas de secoiridoide, esteroide ou terpenoide, permitem a formação de diversas classes de alcaloides, algumas citadas na **Tabela 1** (Facchini & De Luca, 1998; Yang & Stöckigt, 2010).

Tabela 1. Principais classes de alcaloides sintetizados pelas plantas.

Classe	Aminoácido precursor	Exemplos
Piperidínicos	Lisina	Coniina, cassina, espectralina.
Indólicos	Triptofano	Quinina, vimblastina, vincristina.
Isoquinolínicos	Tirosina	Morfina, codeína, mescalina.
Tropânicos	Ornitina	Atropina, hioscina, escopolamina.
Pirrolidínicos	Ornitina	Nicotina, higrina.

Fonte: Adaptado de Facchini & De Luca (1998).

Os alcaloides piperidínicos têm como aminoácido precursor a lisina, a partir da qual é formado um anel piperidínico, originado por perda de um grupo carboxílico e um átomo de nitrogênio (Gupta & Spencer, 1969). Talvez o exemplo mais conhecido desta classe seja a coniina, alcaloide isolado do extrato de cicuta (*Conium maculatum*), usado na execução do filósofo Sócrates.

O triptofano é um aminoácido aromático derivado do corismato, sintetizado na via do chiquimato, e que por ação de descarboxilase, origina triptamina. A condensação de triptamina com secologanina produz strictosidina, molécula intermediária na síntese dos alcaloides indólicos. A quinina (*Cinchona officinalis*), camptotecina (*C. acuminata*), estricnina (*Nux vômica*), vincristina e vimblastina (*Catharanthus roseus*) são exemplos deste grupo (El-Sayed & Verpoorte, 2007).

Todos os alcaloides isoquinolínicos apresentam em sua composição núcleo tetrahydroisoquinolina, derivado da tirosina. Este grupo de substâncias pode ser bem representado pelos diferentes tipos estruturais de alcaloides provenientes do ópio, isolado do látex da papoula. Dentre eles, encontra-se a morfina e codeína, além da mescalina, isolada do peiote (*Lophophora williamsii* (Lem) Coult.) (Facchini & De Luca, 1995).

Os alcaloides tropânicos e os alcaloides pirrolidínicos envolvem a participação de precursor comum na biossíntese, a putrescina, diamina derivada da descarboxilação do aminoácido ornitina. Como exemplo de alcalóides tropânicos, podemos citar substâncias isoladas em sua maioria de plantas pertencentes à Família Solanaceae, incluindo a atropina e escopolamina (de *Atropa belladonna*), e cocaína (*Erythroxylon coca*). A nicotina é um exemplo de alcaloide pirrolidínico. É extraída de *Nicotiana tabacum*, sendo sintetizada nas raízes da planta através da condensação de ornitina e ácido nicotínico (Sato *et al.*, 2001).

2.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão presentes em todos os órgãos das plantas, sendo abundantes em legumes, frutas, grãos, vegetais como também encontrados no chocolate, vinho tinto, azeite de oliva, chá verde e café. Já foram caracterizados mais de 8000 compostos que compreendem estruturas diversas variando de moléculas simples, como os ácidos fenólicos, a compostos cujas moléculas são altamente ramificadas, como os taninos. Os polifenóis podem ser divididos em pelo menos 10 classes diferentes baseada em suas estruturas químicas (fenóis simples, ácidos fenólicos, benzoquinonas, isocumarinas e cumarinas, naftoquinonas, estilbenos, acetofenonas, xantonas, entre outros). Os flavonoides (constituem a classe fenólica mais importante com mais de 5000 compostos descritos (Bravo, 1998). Podem ser originados basicamente por duas rotas bioquímicas diferentes, seja pela via do chiquimato ou pela via do acetato/malonato (Quideau *et al.*, 2011). Todos os flavonoides apresentam uma estrutura em comum constituída por três anéis, sendo que pela troca dos radicais inseridos no anel C da molécula do flavonoide (**Figura 4**), estes podem ser divididos em 13 subclasses.

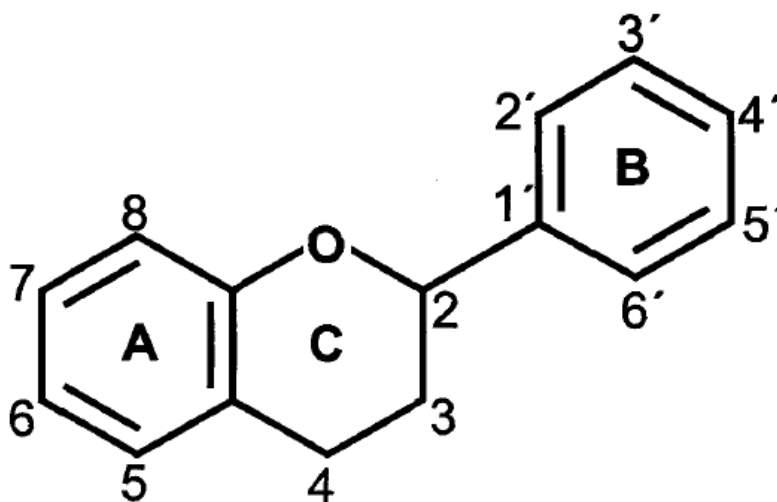


Figura 4. Numeração e estrutura básica de uma molécula de flavonoide (Bravo, 1998).

A via do chiquimato é uma rota metabólica importante para as plantas e é iniciada com a condensação de fosfoenolpiruvato (PEP) e eritrose-4-fosfato, para a formação de ácido chiquímico. A partir deste composto forma-se corismato, molécula precursora dos aminoácidos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp), sendo que por ação da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) há conversão da fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico. Nas reações enzimáticas subsequentes são originados esqueletos fenilpropanoides que servirão de substrato para a biossíntese de cumarinas, ligninas, flavonas, antocianinas, estilbenos além de outros compostos fenólicos (Kosuge, 1969; Herrmann, 1995).

A rota do acetato/mevalonato (MVA) também contribui para o processo de síntese de fenóis, embora de forma menos significativa. A enzima chalcona-sintase (CHS) condensa uma molécula de cumaril-CoA com três moléculas de malonil-CoA (derivadas do acetato), formando tetrahidroxichalcona, substrato intermediário para a biossíntese de outros compostos fenólicos, como as antocianinas, taninos condensados, isoflavonoides e flavonóis (Claudot, 1997).

3. INFLUÊNCIAS NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS



Figura 5. Esquema mostrando os principais fatores intrínsecos da planta e condições do ambiente que podem influenciar nos teores de metabólitos secundários. (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

A biossíntese de metabólitos secundários é um processo complexo e está sujeito a influência de diferentes variáveis. Fatores bióticos e abióticos podem interferir com a qualidade e a quantidade de produtos secundários resultantes do metabolismo de uma planta em determinado momento (Sangwan, 2001; Gobbo-Neto & Lopes, 2007). A seguir, esses fatores são considerados com alguns detalhes.

3.1 Fatores abióticos

Diversas condições ambientais podem influenciar na biossíntese de metabólitos secundários. A temperatura é um delas. Variações extremas são desfavoráveis ao metabolismo das plantas, sejam pelos seus valores muito elevados ou muito baixos. De maneira geral, temperaturas amenas são mais produtivas enquanto as temperaturas altas incidem negativamente sobre as vias metabólicas das plantas (Sangwan, 2001). Em estudo avaliando o metabolismo secundário da orelha-de-gato (*Hypericum brasiliense* Choisy), dois grupos foram avaliados separadamente. O primeiro grupo foi submetido a temperaturas variáveis, e o segundo mantido em temperaturas constantes, sendo todos

os ensaios realizados em casa de vegetação. Foi reportado que temperaturas elevadas (30°C) ou baixas (10°C) influenciaram no acúmulo de biomassa dos cultivares e no conteúdo total de compostos fenólicos. Quando expostas durante a noite a 10°C, as plantas produziram mais isouliginosina B, 1,5-dihidroixantona, rutina e quercetina que aquelas expostas a 30°C e à temperatura ambiente (25°C), entretanto, os níveis de ácido betulínico mensurados foram maiores a 25°C (Abreu & Mazzafera, 2005).

As mudanças climáticas também interferem com o metabolismo das plantas, sendo que a sazonalidade implica em mudanças de parâmetros como temperatura e pluviosidade, podendo estimular a produção de certos compostos em detrimento de outros, o que favorece a síntese de determinadas classes de metabólitos secundários. Alterações na composição de padrões em plantas empregadas como terapêuticos ilustram estas condições: flavonoides, cumarinas, óleos essenciais, taninos, alcaloides, glicosídeos cianogênicos são produzidos em maior ou menor escala, de acordo com as estações do ano. Hussain *et al.* (2008) avaliaram o rendimento da produção de óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) durante o ano inteiro, e registraram uma diminuição na síntese durante o inverno em comparação com a estação do verão (0.5% m/v e 0.8% m/v, respectivamente, em ml/100g de material seco).

O ciclo circadiano compreende períodos de luz (claro) e de ausência de luz (escuro) no qual as plantas estão submetidas, influenciando o maquinário fotossintético, que conseqüentemente influencia seu metabolismo e a síntese de produtos secundários. De maneira geral, a quantidade de luz recebida pode favorecer o crescimento vegetativo e ganho de biomassa, eventos considerados contrários à produção de óleos essenciais, taninos, flavonoides e outros metabólitos secundários. Além disso, a variação diária na quantidade de água/biomassa pode dar a falsa aparência de haver maior quantidade de metabólitos secundários, quando na verdade, há diminuição na concentração de água. Estas observações foram comprovadas por Itenov *et al.* (1999:), que avaliaram o conteúdo de metabólitos secundários da papoula (*P. somniferum*), constatando que com a diminuição de água no látex, aparentemente foram aumentadas as concentrações de morfina, codeína e noscapina.

Por outro lado, não só a quantidade de luz, mas também a sua qualidade (comprimentos de onda diferentes) pode influenciar positivamente a síntese de alguns compostos secundários. Em estudo com manjeriço (*O. basilicum* L.), Loughrin & Kasperbauer (2001) reportaram a existência de diferenças nos conteúdos de compostos aromáticos sintetizados quando as plantas foram expostas a comprimentos de luz

diferentes (preto, vermelho, verde, azul, amarelo e branco). Em relação à maioria dos monoterpenoides, os níveis mais altos de produção foram obtidos com as plantas que cresceram sob as cores amarelo e verde, enquanto que os menores níveis foram obtidos sob as cores azul e branca. No caso do composto alifático hexanal, os maiores níveis foram registrados sob a luz vermelha. Ainda considerando o espectro de luz, a quantidade de luz ultravioleta (UV) absorvida pela planta pode incentivar a biossíntese de compostos secundários com valor medicinal para o ser humano. Particularmente a radiação UV-B estimula a formação de metabólitos como compostos fenólicos (incluindo flavonoides), alcaloides, óleos essenciais e terpenoides (seus compostos majoritários), glucosinolatos, fitoestrogênios, entre outros. Uma explicação para tal fenômeno seria a importância destes compostos contra a ação estressora da radiação UV, através da prevenção de possíveis danos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs) (Zhang & Björn, 2009).

A correlação entre altitude e maior expressão do metabolismo secundário nas plantas envolve outras variáveis, principalmente a incidência da radiação UV e a diminuição das temperaturas, ocorrências que favorecem a síntese de compostos secundários. Ao estudar extrato de camomila (*Matricaria chamomilla* L. cv. BONA) por Cromatografia líquida de Alta Performance (HPLC), Ganzera *et al.* (2008) observaram uma variação positiva na quantidade total de flavonoides, correspondendo a um aumento de 26%, e um aumento de 31% na quantidade de ácidos fenólicos, no intervalo compreendido entre 1000m e 2000m. Em trabalho do mesmo grupo, a avaliação de extrato de arnica (*Arnica montana* L.) de cultivares coletados em nove altitudes diferentes não detectou aumentos significativos no conteúdo de flavonoides, mas houve correlação positiva entre o aumento na altitude e no conteúdo de ácido cafeico e derivados (Spitaler *et al.*, 2008). O azeite de oliva obtido de plantações em altitudes elevadas apresenta maiores índices compostos fenólicos e tocoferol, índices estes que garantem uma melhor qualidade a azeite por este apresentar maior resistência à oxidação (Ryan & Robards, 1998).

A disponibilidade de água também interfere com inúmeros processos fisiológicos das plantas, pois estresses como períodos muito úmidos ou muito secos induzem respostas como o fechamento de estômatos, acúmulo de solutos e antioxidantes, expressão de genes relacionados a estresse e síntese de determinados metabólitos secundários. Geralmente condições de estresse hídrico estimulam positivamente a produção de metabólitos secundários, em especial glicosídeos cianogênicos,

glucosinolatos, antocianinas, alcaloides e alguns terpenoides. Liu *et al.* (2011) avaliaram seis constituintes ativos presentes em espécie de sálvia (*Salvia miltiorrhiza* Bunge, ou “danshen” para os chineses), e reportaram que em níveis elevados de estresse houve um aumento na expressão, com exceção do ácido rosmarínico. Em relação a vinca (*Catharanthus roseus* L.) as quantidades de ajmalicina acumuladas aumentaram quando as plantas foram submetidas à privação de água (Jaleel, 2008).

Outro parâmetro que pode interferir de forma positiva ou negativa no metabolismo secundário e no crescimento das plantas é o aumento de poluentes na atmosfera. Dados apresentados sobre estes impactos levam em conta principalmente as taxas de gás carbônico (CO₂), ozônio (O₃) e dióxido de enxofre (SO₂). Cultivares de soja (*Glycine max* L.) crescidas em atmosfera modificada (sob duas vezes a pressão atmosférica de CO₂ comum, o equivalente a $760 \pm 11 \mu\text{mol mol}^{-1}$) demonstraram um aumento nos conteúdos medidos das isoflavonas constitutivas dadzeína e genisteína, e da flavona apigenina (Kretzschmar *et al.*, 2009). Goiabeiras (*Psidium guajava* cv. Paluma) que tiveram suas folhas submetidas à fumigação com O₃ expressaram maiores níveis de antocianinas e taninos totais, e uma tendência a aumentar a expressão de taninos condensados (Rezende & Furlan, 2009).

3.2 Fatores bióticos

Além de fatores ambientais, características inerentes à planta também podem influenciar em seu metabolismo, afetando a produção de compostos secundários. Ao sofrer lesões de qualquer natureza, as plantas também passam por uma situação estressante. Ataques provocados por insetos (herbivorismo) e por patógenos (vírus, bactérias, protozoários, nematoides) e injúrias causadas por fatores físicos como neve, tempestades, geadas, insolação e ventanias estimulam mecanismos de defesa, incluindo a produção e acúmulo de metabólitos secundários. A defesa anti-herbivorismo de uma planta pode ser direta, afetando sua palatabilidade e digestibilidade para os insetos, ou indireta, pela atração de predadores dos herbívoros. O papel defensivo de alguns produtos do metabolismo secundário é conhecido, sendo particular entre as diferentes espécies de plantas. Os taninos (em carvalhos), maisina (flavona, em milho), gliceolina (isoflavonoide, em soja), tomatina (saponina, em tomate) e sesquiterpenos (em tabaco) são exemplos de substâncias que fazem participam do arsenal químico de defesa que pode ser utilizado por plantas (Chen, 2008).

A produção de metabólitos secundários em resposta a injúrias física pode ser exemplificado experimentalmente pelo aumento da síntese de ajmalicina, catarantina e vindolina, em plântulas lesionadas artificialmente (Vázquez-Flota, 2004). Também em estudo envolvendo a realização de ferimentos artificiais em tabaco (*Nicotiana tabacum*), foi demonstrada uma correlação entre o tipo de ferimento causado (lesão de folhas jovens, remoção do ápice das plântulas, ou a combinação dos dois) e produção e acúmulo de ácido jasmônico e nicotina em toda a planta (Shi *et al.*, 2006).

A quantidade total e proporcional de metabólitos secundários também depende do estágio de desenvolvimento, biomassa e diferenciação celular e tecidual da planta. Por meio da análise química qualitativa e quantitativa do extrato obtido de sálvia e alecrim (*Salvia fruticosa* Miller e *Rosmarinus officinalis* L., respectivamente), Papageorgiou *et al.* (2008) registraram os níveis mais altos de quercitrina e luteolina durante o período de florescimento e níveis mais baixos durante o estágio vegetativo para o alecrim e no período pós-frutificação da sálvia. Quanto ao composto fenólico rutina, presente apenas no extrato de alecrim, as quantidades são mais elevadas conforme a planta amadurece, sendo que os níveis mais altos foram detectados no período de frutificação tardia.

As plantas têm a tendência de otimizar o seu metabolismo em resposta à aplicação de fertilizantes e outros nutrientes em uma plantação, levando à expressão de maior biomassa por unidade de área e aumentando o rendimento de metabólitos secundários. Porém, existem variáveis que podem interferir no aproveitamento dos recursos disponibilizados fazendo com que cada espécie responda de forma particular às condições de privação ou excesso de nutrientes. Ainda, com o passar do tempo, os cultivares se adaptam aos nutrientes recebidos, deixando de acelerar o crescimento (Sangwan *et al.*, 2001).

Os nutrientes aplicados também podem afetar o metabolismo secundário das plantas. O efeito da aplicação de quatro sais clorados (KCl, CaCl₂, MgCl₂ e FeCl₃) sobre a toxicidade causada por NaCl em sálvia (*S. officinalis* L.) foram avaliados por Tounekti *et al.* (2010). Segundo os resultados obtidos, o tratamento com NaCl isolado estimulou a síntese de manool ao mesmo tempo em que diminuiu as concentrações de borneol e viridiflorol. Por outro lado, quando combinado com KCl, CaCl₂ e MgCl₂, o NaCl afetou de maneira dose-dependente as quantidades dos monoterpenos oxigenados 1.8-cineol, cânfora, β-tujona e borneol. Dorda (2009) avaliou os efeitos da aplicação foliar de Ca²⁺ e Mg²⁺ sobre cultivares de orégano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) e verificou que ambos os tratamentos surtiram efeitos positivos na altura, número de

caules, conteúdo de clorofila e biomassa (peso seco) embora não tenha sido verificado qualquer efeito sobre o conteúdo de óleo essencial.

4. AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

De acordo com González-Lamothe *et al.* (2009), os produtos do metabolismo secundário acumulado pelas plantas podem atuar de duas formas: como “potencializadores de atividade antibacteriana”, favorecendo a atividade de antibióticos cuja ação encontra-se limitada por mecanismos de multirresistência desenvolvidos pelos microrganismos; ou como “atenuantes de virulência”, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção.

Os óleos essenciais apresentam atividade contra uma ampla variedade de microrganismos: vírus, fungos, protozoários e bactérias. Os compostos e suas porcentagens presentes nos OE's variam de acordo com a espécie considerada, as condições de coleta e extração, e as partes da planta utilizadas. Os principais compostos isolados dos óleos essenciais são terpenos e seus derivados oxigenados, terpenoides, incluindo os compostos fenólicos (Solórzano-Santos & Miranda-Novales, 2011).

A atividade antimicrobiana exercida por terpenos e derivados tem sido descrita através de pesquisas envolvendo diversas espécies de plantas e microrganismos testados. Em revisão sobre o assunto, Greay & Hammer (2011) cita alguns dos mecanismos por meio dos quais estes compostos atuam sobre células bacterianas. Monoterpenos interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória. A exposição a terpenos pode interferir com a expressão de genes codificadores de fatores de virulência, como quando consideradas linhagens de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas (Qiu *et al.*, 2011), e com a expressão de proteínas citoplasmáticas e de membrana em *Salmonella enterica* (Di Pasqua *et al.*, 2010). Ao investigar a atividade antimicrobiana de sesqui- e diterpenos isolados da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) contra bactérias cariogênicas, Souza *et al.* (2011) descreveram uma maior eficiência para os compostos com apenas um grupo hidrofílico frente aos que apresentaram dois grupos.

Guinoiseau *et al.* (2010) testaram os OE's de *Inula graveolens* L. e *Santolina corsica* Jordan et Fourr. frente a *S. aureus*, e observaram que a atividade bactericida de ambos os óleos não envolveu lise celular, porém a parede celular de algumas células bacterianas sofreu afinamento, e percebeu-se a perda da homogeneidade do conteúdo

celular pela formação de grânulos citoplasmáticos. O óleo de coentro (*Coriandrum sativum* L.) exerceu efeitos sobre os processos respiratórios, bomba de efluxo e potencial de membrana de bactérias Gram-positivas e negativas, sendo bactericida para a maioria das linhagens testadas, muito provavelmente por ocasionar danos na membrana celular (Silva *et al.*, 2011).

Apesar de várias estruturas químicas isoladas de produtos do metabolismo secundário das plantas exercerem alguma ação antibacteriana, a maior parte destas moléculas apresenta atividade fraca e espectro de ação limitado quando utilizadas sozinhas. Porém, ao serem combinadas entre si ou com antibióticos, podem atuar como adjuvantes, modificando a resistência bacteriana frente determinadas drogas, diminuindo a dose necessária de antibióticos para um resultado eficaz (Simões *et al.*, 2009). É o caso da estratégia de defesa da uva-espim (*Berberis vulgaris* L.): o alcaloide berberina é ineficiente sobre bactérias patogênicas multirresistentes. Assim, a planta sintetiza concomitantemente 5-metoxihidnocarpina, composto que bloqueia o mecanismo de extrusão bacteriana, permitindo que a berberina se intercale no DNA dos microrganismos, tornando a defesa da planta eficaz (Stermitz *et al.*, 2000). O valor terapêutico da combinação de substâncias é praticado desde sistemas medicinais antigos como na Ayurveda e na Medicina Tradicional Chinesa (MTC), objetivando o sinergismo. Combinações entre OE's são utilizadas na aromaterapia, e até mesmo a OMS recomenda o uso de alguns medicamentos alopáticos de forma combinada (van Vuuren & Viljoen, 2011). Hemaishwarya *et al.* (2008) citam algumas associações entre produtos naturais e antibióticos, visando a inibição da ação do mecanismo de resistência bacteriana, ou sua expressão (**Tabela 2**).

Tabela 2. Algumas associações efetivas entre produtos naturais e antibióticos.

Produtos naturais	Antibióticos	Mecanismos de ação	Microrganismos
Catequinas, epigallocatequina galato (EGCG), baicalina, corilagina.	B-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas).	Inibição da proteína de ligação à penicilina alterada (PBP2a), ou inibição de sua síntese.	<i>S. aureus</i> meticilina resistentes (MRSA).
ECGg	Penicilina	Inibe penicilinase.	<i>S. aureus</i> produtores de penicilinase.
Diterpenos de <i>Lycopus europaeus</i> L.	Tetraciclina.	Bloqueio de bombas de efluxo.	<i>S. aureus</i> com mecanismo de efluxo multirresistente.
Extrato de romã (<i>Punica granatum</i> L.).	Ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, oxacilina, entre outros.	Inibe Nor A (bomba de efluxo responsável por resistência a fluorquinolonas.	MRSA.
α -mangostim.	Vancomicina.	Desconhecido.	MRSA e Enterococcus vancomicina resistentes (VRE).

Fonte: Adaptado de Hemaiswarya *et al.* (2008).

Com o propósito de avaliar o sinergismo entre os compostos naturais alil-isotiocianato, carvacrol, eugenol, timol e cinamaldeído quando combinados com seis drogas antimicrobianas, Palaniappan & Holley (2010) obtiveram os melhores resultados quando utilizados carvacrol e timol, sendo que na ocorrência de interações sinérgicas, as concentrações inibitórias das drogas antibacterianas foram reduzidas pra valores de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{8}$ daquelas necessárias quando os antibióticos foram empregados sem associações.

Com o uso concomitante de produtos naturais, vários são os alvos bacterianos atingidos ao mesmo tempo pelos diversos mecanismos de ação que estes produtos podem exercer. Usando dez óleos essenciais (entre eles, orégano, sálvia, bergamota e lavando), Lv *et al.* (2011) observaram uma melhor atividade dos OE's de orégano e manjeriço, isolados, sobre os microrganismos testados. Contra *S. aureus* (Gram-positivo), todas as combinações demonstraram sinergismo; frente aos Gram-negativos e levedura testados, as melhores

associações levaram em conta o óleo de orégano; nenhuma avaliação resultou em atividade indiferente ou antagônica. Ao testarem a suscetibilidade de *Listeria innocua* frente a carvacrol, timol e eugenol, García-García *et al.* (2011) obtiveram melhores resultados com o primeiro composto. Entre as combinações binárias, carvacrol+timol, em diferentes concentrações, foram as que mais alcançaram atividade bactericida, evidenciando atividade sinérgica. Três combinações ternárias alcançaram atividade bactericida, tendo duas demonstrado efeito sinérgico e uma, aditivo.

Levando em consideração os recentes trabalhos desenvolvidos com o intuito de avaliar o potencial antimicrobiano de produtos naturais e de combinações de produtos naturais entre si ou com antibióticos, o presente estudo tem como objetivos: (1) avaliar as propriedades antibacterianas de sete óleos essenciais sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (isolados clínicos) e *Salmonella* sp. (casos clínicos e isolados de alimentos); (2) determinar a composição química dos OE, através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM); (3) avaliar o possível sinergismo entre quatro óleos de todos aqueles testados, e entre os mesmos quatro óleos e dois antimicrobianos padronizados.

CAPÍTULO I

* Escrito de acordo com as normas estipuladas e submetido à Revista *Química Nova*.

Composição química e atividade antibacteriana de óleos essenciais

Chemical composition and antibacterial activity of essential oils

Isabella da Silva Probst^{I,*}, Lidiane Nunes Barbosa^I, Bruna Fernanda Murbach Teles Machado^I, Ary Fernandes Junior^I

^IDepartamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Junior, s/n, 18618-970 Botucatu – SP, Brasil

*isasprobst@gmail.com

ABSTRACT

The chemical composition of the essential oils (EO) from *Caryophyllus aromaticus* L., *Cinnamomum zeylanicum* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Eugenia uniflora* L., *Matricaria recutita* L., *Vernonia polyanthes* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. were identified and its antibacterial activities were evaluated against *Staphylococcus aureus* (MRSA and MSSA) *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella* Enteritidis strains isolated from human clinical cases, and *S. Typhimurium* strains isolated from food samples. The *C. zeylanicum* EO showed the highest inhibition (MIC_{90%} about 0.23 mg/ml to the most strains, except *P. aeruginosa*), probably due to the cinnamaldehyde content, while *E. uniflora* EO showed a weak activity (MIC_{90%} ranged from 50.82 mg/ml to 92,4 mg/ml).

Keywords: CG-MS, antibacterial activity, plant secondary metabolites.

INTRODUÇÃO

As taxas de resistência bacteriana registradas nos hospitais têm sido crescentes, o que tem despertado a atenção e preocupação dos profissionais da saúde. Além disso, bactérias originárias de ambientes não hospitalares carreadoras de genes multirresistentes tornam as infecções bacterianas cada vez mais difíceis de serem tratadas, aumentando ainda os riscos para pacientes internados e imunossuprimidos. Além de permitir a sobrevivência em ambientes considerados tóxicos às bactérias, mecanismos de resistência podem contribuir com fatores de virulência, regulação da homeostase bacteriana e desintoxicação de metabólitos intracelulares. O surgimento e a disseminação de resistência bacteriana ocorrem por diferentes mecanismos normalmente relacionados à pressão seletiva e também devido ao uso incorreto de antibióticos.¹

A Ásia registra alta prevalência de bactérias multirresistentes, conhecidas também por “superbugs”, ou superbactérias, sendo estas especialmente *Streptococcus pneumoniae* penicilina resistente, *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e extensivamente resistentes, entre outras, sendo que algumas cepas resistentes como *Salmonella* spp. podem ser isoladas não só de humanos como também de amostras veterinárias.²

O uso de plantas, e derivados como extratos e óleos essenciais, no tratamento de afecções bacterianas está registrado em documentos de civilizações como China e Índia, com aproximadamente cinco mil anos, e existem indícios do uso de plantas como terapêuticos há mais de 60 mil anos na região onde atualmente se encontra o Iraque.³ Os óleos essenciais normalmente são obtidos por hidrodestilação ou destilação a vapor, sendo compostos por uma mistura variável de terpenoides, hidrocarbonetos de baixo peso molecular, ácidos, alcoóis, aldeídos, cumarinas, entre outras classes de compostos. A atividade antimicrobiana dos OE tem sido atribuída principalmente aos terpenos e derivados, sendo estes compostos capazes de interagir com diferentes moléculas alvo e funções das células bacterianas. Vários estudos têm avaliado a atividade antibacteriana destes compostos e relataram diferentes mecanismos de ação, como inibição da síntese de ácidos nucleicos, das funções da membrana citoplasmática e do metabolismo energético (Cushine & Lamb, 2005).⁴

Devido ao número de espécies existentes, o potencial farmacológico das plantas representa um vasto campo para a bioprospecção de substâncias com atividade

antibacteriana, estimulando a formulação de novas terapias, principalmente focando em linhagens refratárias aos antibióticos atualmente disponíveis. A etnobotânica fornece fundamentos para a investigação científica do uso de algumas plantas no tratamento de afecções microbianas, a partir do conhecimento acumulado ao longo das civilizações. Muitas espécies são empregadas ainda hoje pelo Homem com as finalidades de curar e manter sua saúde, sendo conhecidas popularmente como plantas e ervas medicinais e/ou aromáticas. Ainda, grande parte da população de países em desenvolvimento não tem acesso a medicamentos padronizados, dependendo da medicina popular como única forma de prevenção e tratamento de doenças.⁵

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é adicionado aos alimentos com a finalidade de se acrescentar sabor e aumentar a validade dos alimentos, além do uso medicinal em prevenção e curas de afecções diversas, como falta de apetite, asma, tonsilite, obstrução nasal e constipação. Constituído essencialmente por monoterpenos, o óleo essencial de alecrim apresenta potencial atividade antifúngica e inibitória sobre o crescimento de bactérias Gram-negativas, e principalmente, Gram-positivas.⁶

Baccharis dracunculifolia, conhecida como alecrim do campo ou vassoura, é um arbusto nativo do Brasil, produtor de uma grande variedade de metabólitos secundários, muitos destes coletados e utilizados por abelhas da espécie *Apis mellifera* na elaboração da consagrada própolis verde brasileira. Tanto a própolis quanto os derivados vegetais (extratos e óleo essencial) do alecrim do campo são reconhecidos medicinalmente por suas ações antiulcerogênica, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica, anestésica, hipotensiva, imunoestimuladora e citostática.⁷

Assim como ocorre com o alecrim do campo, as resinas e exsudatos de assa peixe (*Vernonia polyanthes*) também são coletados por abelhas e utilizados na síntese da própolis negra, originária do estado de Minas Gerais. Na medicina popular, esta espécie é empregada no tratamento de reumatismo, bronquite, tosse, gripe, pneumonia, febres, malária, hipertensão, entre outros.⁸

A camomila (*Matricaria recutita*) é um exemplo de fitoterápico utilizado há séculos no tratamento de uma série de afecções como feridas, úlceras, eczemas, gota, irritações de pele, neuralgias, reumatismo, dores, hemorroida, mastite, assaduras e conjuntivite. A partir dos capítulos florais da camomila é possível a extração de óleo essencial rico em terpenoides, característica que provavelmente contribui com as diversas propriedades da espécie. Os principais compostos presentes no OE incluem α -

bisabolol e óxidos derivados, azulenos (incluindo camazuleno), farneseno, espatulenol e espiro éteres.⁹

Da mesma forma que a camomila, a canela (*Cinnamomum zeylanicum*) tem sido utilizada ao longo da História no tratamento de diversos problemas: diabetes, inflamações, úlceras estomacais, tosses, resfriados, distúrbios gastrointestinais, apresentando também atividade antifúngica, antiparasitária, larvicida e antibacteriana (Saeed & Tariq, 2008). De acordo com as partes utilizadas na extração de óleo essencial, os compostos majoritários se alteram (cânfora da casca de raízes, eugenol das folhas, e cinamaldeído da casca), sugerindo diferentes perfis de atividade (Gruenwald *et al.*, 2010). A atividade antimicrobiana do OE obtido das cascas tem sido relatada contra bactérias, fungos e bolores, com especial interesse na atividade contra patógenos deteriorantes de alimentos (Ağaoğlu *et al.*, 2007; Nanasombat & Wimmutigosol, 2011).¹⁰

O óleo essencial obtido das inflorescências do cravo da Índia (*Caryophyllus aromaticus*) é empregado tradicionalmente com várias finalidades, incluindo produtos para higiene bucal, ação antisséptica, analgésica, antifúngica, antialérgica anticarcinogênica, mutagênica, inseticida e antibacteriana. O eugenol é o principal componente isolado do OE de cravo, sendo a ele atribuída a atividade antimicrobiana descrita por este óleo, sendo que alguns trabalhos sugerem seu uso como conservante natural de alimentos.¹¹

Infusões e decocções das folhas de pitanga (*Eugenia uniflora*) são empregadas medicinalmente no Brasil como antidiarreico, diurético, antirreumático, antifebril, antitussígeno, expectorante, digestivo, carminativo, e no controle da pressão arterial, níveis de colesterol e ácido úrico, e na redução de peso. O uso de dos frutos e folhas no preparo de chás foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA – RDC nº 267, de 22 de setembro de 2005), e o óleo essencial obtido das folhas da pitangueira é empregado na fabricação de xampus, condicionadores, sabonetes e óleos corporais.¹²

Tendo em vista as inúmeras indicações medicinais das espécies de plantas mencionadas acima e a possibilidade de extração do óleo essencial pelo método de hidrodestilação a vapor, este estudo teve por objetivo a investigação do potencial antibacteriano sobre linhagens patogênicas de importância clínica para o ser humano e caracterização química dos óleos essenciais extraídos.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtenção das plantas

As amostras de cravo da Índia (*Caryophyllus aromaticus* L. – inflorescências) e de canela (*Cinnamomum zeylanicum* L. - cascas) foram obtidas em estabelecimento comercial na cidade de Botucatu/SP, Brasil. As amostras de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.) foram obtidas na forma fresca em jardim de plantas medicinais localizado nas instalações da empresa Grupo Centroflora (Botucatu/SP). Esta empresa forneceu também amostras de camomila (*Matricaria recutita* L. – capítulos florais) na forma desidrata. As coletas de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* L. – folhas) e alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia* DC.) foram realizadas no Distrito de Rubião Junior (Botucatu/SP). As plantas que não foram adquiridas comercialmente foram identificadas pelo Prof. Dr. Luiz Roberto Hernandez Bicudo e suas respectivas exsiccatas (BOTU 25794-camomila, BOTU 25795-alecrim do campo, BOTU25796-pitanga e BOTU 25797-assa peixe), depositadas no Herbário Prof^a. Dr^a. Irina Delanova Gemtchujnicov, sob responsabilidade do Departamento de Botânica/IBB/UNESP/Botucatu.

Obtenção dos óleos essenciais e caracterização química

Os óleos essenciais foram obtidos no departamento de Microbiologia e Imunologia/IBB/UNESP, utilizando equipamento tipo Clevenger (Marconi, modelo M480) através da metodologia padrão de arraste por vapor d'água. Após a extração, foram calculados os rendimentos e as densidades dos óleos obtidos. A caracterização química dos óleos foi realizada em espectrofotômetro de massas acoplado a cromatógrafo gasoso (CG-EM), marca Shimazu, modelo QP5050A, de acordo com as condições operacionais: coluna capilar CBP-5 (50m x 0,25mm x 0,25 µm), temperatura do injetor 250°C, e hélio (He) como gás de arraste. A energia de impacto (EI) utilizada na EM foi de 70 eV. A identificação dos compostos presentes nos óleos essenciais foi feita através da análise dos espectros de massa, consulta à biblioteca NIST Mass Spectral Library (National Institute of Standards and Technology) e com base na literatura.¹³

Linhagens bacterianas

Foram testadas bactérias de isolados clínicos, e algumas cepas padrões ATCC, mantidas no depto de Microbiologia e Imunologia congeladas a -70°C , sendo estas *Staphylococcus aureus* (16 metilina resistentes (MRSA), 15 metilina sensíveis (MSSA) e ATCC Sa 25923), *Escherichia coli* (15 linhagens e ATCC Ec 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (15 linhagens e ATCC 27853) e *Salmonella* Typhimurium (15 clínicos e ATCC 14028). No caso da *Salmonella* foram testados também 16 isolados de alimentos (*S. Enteritidis*). As amostras MRSA e MSSA foram identificadas por biologia molecular (gene *mecA*) e submetidas a discos de oxacilina (1 μg) e cefoxitina (30 μg) para confirmação dos resultados.¹⁴ As demais linhagens foram submetidas a testes de pureza e viabilidade antes de serem utilizadas, sendo mantidas em refrigeração (4°C) em Agar nutriente até utilização nos ensaios de sensibilidade. Os ensaios foram realizados com o consentimento do Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo nº 5/2010).

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A sensibilidade das linhagens microbianas frente aos óleos essenciais foi determinada de acordo com as normas instituídas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011)¹⁵, através da metodologia de diluição em Agar, com o emprego de concentrações variadas, dependentes do rendimento/atividade do óleo, e da sensibilidade das bactérias avaliadas. Estes valores variaram de 0,025 até 10% v/v. Os valores em % v/v foram transformados após a obtenção dos valores de densidade dos respectivos óleos essenciais, os quais serão apresentados nos resultados já transformados em mg/ml. Placas de Petri contendo Mueller Hinton Agar (MHA) foram preparadas com a adição das diferentes concentrações dos óleos essenciais (definidas como tratamentos), estipuladas com base na análise de resultados obtidos previamente, acrescidas de 0,5% de Tween 80 com finalidade de diluir os OE de forma homogênea no MHA. As linhagens bacterianas foram inoculadas em caldo Cérebro e Coração (BHI), e incubadas a $37^{\circ}\text{C}/24$ horas, sendo padronizadas posteriormente na escala 0,5 McFarland e diluídas na proporção de 1:20 em BHI para a obtenção de inóculos ao redor de 10^5 Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml). Os experimentos foram realizados em três etapas, sendo inicialmente com as cepas de MSSA e MRSA; *E. coli* e *P. aeruginosa* e finalizado com as linhagens de *Salmonella* isoladas de infecção e

alimentos. As 32 linhagens estudadas por experimento foram inoculadas nas placas de Petri com o auxílio de um multi-inoculador de Steer. A leitura da CIM foi feita através da observação de presença ou ausência de crescimento bacteriano para cada linhagem e estabelecidos os valores da CIM_{90%} para cada grupo de microrganismos avaliados. Como controle positivo dos experimentos, as bactérias foram semeadas em placas com MHA + 0,5% de Tween sem acréscimo de óleos.

Análise estatística

Para a análise comparativa entre os tratamentos, foi empregado o software estatístico SAS (versão 9.0), licenciado pela UNESP (2009). Através do teste de Kruskal-Wallis., foram consideradas diferenças estatísticas significativas nas situações em que $p < 0,05$, evidenciando a diferença de potencial antibacteriano entre os óleos testados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando que os óleos essenciais vêm sendo amplamente estudados, com atenção especial para o uso no controle de processos infecciosos, foram realizados ensaios para verificação da capacidade inibidora de sete óleos essenciais sobre 4 grupos de bactérias.

Conforme amplamente mencionado na literatura sobre o baixo rendimento na produção dos OE, verificamos que o rendimento das extrações variou de 0,15% (assa peixe) a 0,61% (cravo da Índia) (ml/kg) (Tabela 1). O rendimento normalmente é afetado por diversos fatores, incluindo a espécie vegetal considerada, as partes utilizadas e metodologia empregada no processo de extração, variações fisiológicas inerentes à planta (fase de desenvolvimento, ciclo de polinização, variações sazonais, condições de estresse da planta), condições ambientais (clima, poluição atmosférica, características do solo), variações geográficas, características genéticas dos cultivares, entre outros.¹⁶ Considerando que a ação antimicrobiana dos óleos depende da sua composição química, comparamos os compostos majoritários presentes nas amostras de OE testadas segundo análises CG-EM com outros estudos, bem como a resistência intrínseca dos microrganismos testados (CIM_{90%}) para a discussão dos resultados obtidos.

Jiang *et al.*¹⁷ analisaram por CG-EM o óleo essencial de alecrim (*R. officinalis*) e reportaram como compostos majoritários o 1,8-cineol (26,54%), α -pineno (20,14%),

cânfora (12,88%) e canfeno (11,38%). Ao compararem o óleo de alecrim obtido por hidrodestilação (HD) e destilação por micro-ondas, Okoh *et al.*¹⁸ descreveram uma diferença no rendimento final (0,31% e 0,39% respectivamente) além de mencionar também variação nas respectivas composições químicas. Os principais compostos isolados por HD foram verbenona (17,43%), cânfora (16,57%), 1,8-cineol (11,91%) e α -pineno (11,47%). O potencial antibacteriano do OE obtido por hidrodestilação foi avaliado, para o qual se obtiveram valores de CIM de 3,75 mg/ml para *S. aureus* (ATCC 6538) e 7,5 mg/ml para *E. coli* (ATCC 8739). Apesar de se tratar da uma mesma espécie de planta, a análise do óleo extraído em nosso laboratório apresentou rendimento (0,58%) e composição distinta, ou seja, cânfora (27,51%), limoneno (21,01%), mirceno (11,19%), α -pineno (10,37%) e β -pineno (5,27%) como compostos majoritários. Ao comparar os valores de CIM frente a *S. aureus* e *E. coli*, também observam-se resultados distintos (8,65 e 9,17 mg/ml respectivamente), tal fato pode ter relação tanto com a composição do OE, quanto com o perfil bacteriano das cepas que foram testadas, uma vez que os isolados clínicos tendem a apresentar resistência superior aos antimicrobianos pela exposição frequente quando presente em ambiente hospitalar.¹⁹

Tendo em vista que o processo de hidrodestilação pode promover alterações na composição química do OE resultante, especialmente por ocorrer em altas temperaturas que por vezes podem ocasionar a perda de compostos mais voláteis, Schossler *et al.*²¹ compararam o OE de alecrim do campo (*B. dracunculifolia*) obtido por este método com o óleo obtido por microextração em fase sólida no modo *headspace* (processo no qual, segundo Meng *et al.*²², o equilíbrio da amostra do analito ocorre entre três fases: a amostra analisada (líquida ou gasosa), a fase de vapor sobre a amostra líquida (*headspace*) e a fase extrativa (sólido adsorvente ou líquido polimérico)). Segundo os autores, com a extração por HD os compostos majoritários presentes no OE foram: nerolidol (22,16%), β -pineno (12,17%), espatulenol (8,81%) e α -pineno (8,0%). Com um rendimento de 0,6%, Parreira *et al.*²³ relataram para alecrim do campo a presença de nerolidol (33,51%), espatulenol (16,24%), α -muurolol (4,66%) e δ -cadineno (3,66%) como compostos majoritários. Embora tendo apresentado um rendimento menor (0,31%, ml/kg), verificamos uma caracterização química semelhante para o OE de alecrim do campo (25,84% de nerolidol, 13,14% de espatulenol, 7,62% de germacreno B e 7,09% de germacreno D) (Tabela 2). Apesar de ter avaliado o potencial antibacteriano do OE de alecrim do campo por outra metodologia, ou seja, por difusão

em discos, Ferronato *et al.*²⁴ reportaram atividade inibitória sobre linhagens *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Da mesma forma, a amostra de OE de alecrim do campo apresentou atividade antibacteriana, principalmente sobre as linhagens de MRSA (Tabela 3).

Embora o OE seja ainda pouco caracterizado na literatura, já existem relatos sobre o potencial da assa peixe (*V. polyanthes*), principalmente com extratos, sobre atividades antiulcerogênica, anti-fúngica e anti-leishmânica.²⁵ A caracterização química do OE desta planta revelou como compostos majoritários o germacreno D (27,79%), ϵ -cariofileno (16,02%), germacreno B (15,01%), elemeno (9,39%) e copaeno (3,59%). Os ensaios antibacterianos demonstraram que o OE de assa peixe, em comparação com os demais testados, foi mais ativo contra as bactérias Gram-negativas que sobre Gram-positivas (Tabela 3).

A camomila tem sido empregada ao longo de várias gerações sob diferentes preparos e para diversas finalidades. Mais de 120 compostos já foram identificados no OE de camomila. Ao analisar 13 amostras de diferentes regiões da Europa, Orav *et al.*²⁶ identificaram 39 compostos diferentes, sendo os principais: óxido de bisabolol A (3,1–56,0%), α -bisabolol (0,1–44,2%), óxido de bisabolol B (3,9–27,2%), cis-eninabiclo éter (8,8–26,1%), óxido de bisabolona A (0,5–24,8%), camazuleno (0,7–15,3%), espatulenol (7–4,8%) e (*E*)- β -farneseno (2,3–6,6%). Além disso, relataram diferenças no rendimento da extração do OE em relação ao peso da planta sendo estas entre 0,6 ml a 7,6 ml/kg. Ganzera *et al.*²⁷ ressaltam que pela existência de diversas variedades constituindo a espécie *M. recutita*, a caracterização química do OE de camomila pode resultar em perfis distintos, até mesmo na cor (variando de azul escuro à tonalidades verdes).

Matos *et al.*²⁸, em trabalho cujo objetivo foi determinar a composição química de amostra de camomila (*C. recutita*) originária do estado do Paraná/Brasil, reportaram como compostos majoritários óxido de bisabolol B (23%), óxido de bisabolol A (17%), (*Z*)- β -farneseno (16%), α -bisabolol (13%), camazuleno (8%) e espiro-éter (5%). Conforme Tabela 2, verifica-se que alguns destes compostos também foram identificados na amostra utilizada neste estudo, sendo os teores de camazuleno (31,48%), α -bisabolol e óxido de bisabolona (15,71%), cariofileno (13,59%) e óxido de bisabolol (11,98%) os mais significativos. A ação antimicrobiana descrita na literatura para o OE de camomila varia de acordo com os métodos de avaliação empregados e os microrganismos avaliados, sendo que alguns trabalhos descrevem resultados

conflitantes.²⁹ Através da metodologia de difusão em Agar por discos e em tubos, Owlia *et al.* (2007) avaliaram a atividade anti-estreptocócica do OE de camomila, obtendo concentrações inibitórias de 0,1 a 7,0 mg/ml, dependendo da espécie testada. Os resultados obtidos demonstram uma atividade deste óleo, com valores de CIM variando de 25,8 a 54,42 mg/ml (Tabela 3).

O gênero *Cinnamomum* é composto por cerca de 250 espécies, sendo a espécie *C. zeylanicum* uma das mais importantes devido o valor apresentado pelos OE extraído tanto das folhas como da casca.³⁰ O principal composto presente no OE das folhas é o eugenol, ao passo que da casca é o cinamaldeído.³¹ Seguindo o padrão para os resultados reportados na literatura, neste estudo o OE de canela foi um dos mais eficientes, sendo seu valor de CIM_{90%} igual a 0,23 mg/ml para todas as bactérias testadas, com exceção das cepas de *P. aeruginosa*, cujo valor foi de 0,83 mg/ml. Na análise por CG-EM, os compostos presentes em maiores quantidades foram cinamaldeído (86,31%), acetato de cinamila (4,83%) e eucaliptol (1,19%) (Tabela 2). Unlu *et al.*³², também estudando o OE extraído da casca da canela, verificaram a presença de 68,95% de cinamaldeído, 9,94% de benzaldeído e 7,44% de acetato de cinamila, ao passo que as CIM obtidas variaram de 0,56 mg/ml para *S. aureus* (ATCC 29213) e 0,28 mg/ml para *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

O OE de cravo da Índia (*C. aromaticus*) tem demonstrado excelente potencial antibacteriano, tendo sua eficácia associada ao composto eugenol.³³ Com a extração de maior rendimento (0,61 ml/kg), a análise do OE de cravo apontou como compostos majoritários o eugenol (75,85%) e acetato de eugenila (16,38%) e atividade antibacteriana em concentrações que variaram entre 2,4 a 3,0 mg/ml, exceto para *P. aeruginosa*, com valor de 30,03 mg/ml. Embora não tenha sido realizada a caracterização química, Silva *et al.*³⁴ reportaram também que o OE de cravo da Índia foi o mais efetivo em inibir *S. aureus* e *E. coli*, com valores de CIM_{90%} de 0,095 e 0,895 %v/v, respectivamente. Ao avaliarem a CIM de diversos óleos essenciais sobre bactérias patogênicas isoladas de alimentos, Zago *et al.*³⁵ relataram o potencial antibacteriano do OE de cravo da Índia (0,095%v/v) e a atividade ainda maior do OE de canela sobre cepas de *S. aureus* (0,047%v/v). Estes dados estão próximos aos obtidos neste estudo, onde foi verificada a maior ação antimicrobiana para os óleos essenciais extraídos destas duas plantas (Tabela 4).

A partir de hidrodestilação de folhas frescas de pitanga (*E. uniflora*), Lago *et al.*³⁶ obtiveram um óleo essencial caracterizado pela presença de atractilona (26,78%),

curzereno (17,96%), germacreno B (9,31%) e zerumbona (4,18%), cuja atividade antimicrobiana descrita foi variada, tendo algum efeito inibitório sobre fungos e bactérias Gram-positivas (CIM de 0,11 a 7,5 mg/ml), e nenhum efeito sobre bactérias Gram-negativas. Ao comparar as atividades dos OE de frutos com o de folhas de pitanga, Oguwande *et al.*³⁷ identificou como compostos majoritários curzereno (19,7%), selina 1,3,7 (11) trien-8-ona (17,8%), atractilona (16,9%) e furanodiona (9,6%) no óleo das folhas. A CIM estabelecida foi de 0,156 mg/ml para *S. aureus* ATCC 29213, 0,625 mg/ml para *E. coli* ATCC 25922 e 0,685 mg/ml sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853. Os valores de CIM_{90%} obtidos variaram de 50,82 a 92,4 mg/ml, bastante superiores àqueles obtidos nos demais trabalhos. Uma explicação pode estar relacionada à origem das linhagens bacterianas testadas, sendo na maioria isolados de casos clínicos humanos e em ambiente hospitalar, onde o contato frequente com antimicrobianos contribui para a disseminação de mecanismos de resistência entre os microrganismos.³⁸

Quanto a caracterização química da pitanga, os compostos majoritários foram a selina 1,3,7 (11) trien-8-ona (30,10%), epóxido de selina 1,3,7 (11) trien-8-ona (21,89%), β -cariofileno (6,51%) e β -elemeno (4,11%). Segundo Costa *et al.*³⁹, houve variação sazonal quanto a presença de compostos no OE de pitanga quando comparadas análises químicas de amostras de OE obtidos a partir de folhas coletadas na estação seca e na estação úmida. Desta forma, é possível inferir que variações na composição química, como já citado anteriormente, podem justificar diferenças na potencial antimicrobiano de uma mesma espécie de planta.

Todos os óleos testados demonstraram ação antimicrobiana, evidenciando assim o potencial do uso dessas plantas como agentes antibacterianos. Dependendo da espécie vegetal, e das linhagens bacterianas testadas, esta ação pode ser classificada como bacteriostática ou bactericida. Existem algumas explicações possíveis para as diferenças observadas na atividade antibacteriana dos óleos: as características estruturais das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a composição química e concentrações testadas de cada óleo, e variações na composição química dos OE de acordo com as condições de crescimento da planta, a época de coleta e características do processo de extração.⁴⁰

Normalmente, as bactérias Gram-positivas apresentam uma maior sensibilidade quando expostas aos óleos essenciais *in vitro* que as bactérias Gram-negativas. As Gram-negativas possuem parede bacteriana diferenciada, apresentando uma membrana

externa composta por lipopolissacarídeos (LPS), conferindo maior resistência por evitar a difusão e acúmulo de OE na célula bacteriana.⁴¹

Como verificado anteriormente, a composição química dos OE também interfere com o seu potencial antimicrobiano, sendo esta atividade associada com o conteúdo de terpenóides presente no óleo, principalmente compostos fenólicos.⁴² De acordo com os resultados obtidos na análise química (CG-EM) dos óleos utilizados neste estudo, foi possível demonstrar que os principais compostos isolados são, em sua maioria, terpenos ou derivados desta classe (Tabela 2).

Embora não tenha havido diferença significativa, observamos que para a maioria dos OE testados, as cepas MSSA foram mais resistentes, ou apresentaram a mesma sensibilidade que as cepas MRSA. Brady *et al.*⁴³ obtiveram resultados parecidos ao avaliarem a susceptibilidade de cepas MRSA e MSSA ao OE de tea tree (*Melaleuca alternifolia*), onde apesar da CIM ter variado de 0,25-2,0% v/v e 0,5%-2,0% v/v, respectivamente, com o cálculo da CIM_{90%} e análise estatística, não houve diferenças consideráveis nos resultados finais. O OE de hortelã pimenta (*Mentha piperita*) demonstrou atividade antibacteriana nas concentrações de 0,064-0,128 mg/ml para cepas MSSA e de 0,064 a 0,256 mg/ml para cepas MRSA, porém, mais uma vez após análise estatística, todas as cepas apresentaram como CIM_{90%} valor igual a 0,128 mg/ml.⁴⁴

Na avaliação de possíveis diferenças no perfil de sensibilidade de linhagens de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos e de infecções humanas, também não houve diferenças significativas (Tabela 3). Ao investigar a atividade antibacteriana dos OE extraídos de sete espécies de citros sobre 11 linhagens de *Salmonella* spp., O'Bryan *et al.*⁴⁵ descreveram valores de CIM diferentes, embora não estatisticamente significativos. Na literatura, outros trabalhos avaliando o potencial anti-*Salmonella* de OE reportam essa indiferença nas concentrações inibitórias para *Salmonella* Enteritidis e *S.* Typhimurium. Por outro lado, alguns autores mencionam diferenças nas CIM obtidas para cepas destes sorovares.⁴⁶

Embora estudos mais recentes apresentem sempre a composição química da amostra do óleo essencial utilizado, inferimos que, embora neste estudo também seja apresentado uma caracterização química dos óleos essenciais, nem sempre a atividade antibacteriana está relacionada com os compostos majoritários, e, portanto, não é possível relacionar a atividade antibacteriana do OE com determinados compostos com exata precisão. Existem ainda estudos que relatam a bioatividade de alguns óleos como

sendo produto da interação de vários compostos, e não apenas devido ação de substâncias isoladas.⁴⁷ Assim sendo, concluímos que todos os óleos testados apresentaram ação antibacteriana, sendo esta atividade maior ou menor em função da composição de cada óleo e bactéria testada. Assim sendo, sugerimos que estudos futuros sejam realizados com o objetivo de investigar isoladamente o potencial antibacteriano dos principais compostos presentes nos OE.

AGRADECIMENTOS

À agência de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro oferecido e aos Prof. Dr. Margarida Juri Saeki e Julio Toshimi Doyama do Departamento de Química e Bioquímica do IBB pelas análises dos óleos essenciais.

REFERÊNCIAS

1. Martinez J. L., Fajardo A., Garmendia L., Hernandez A., Linares J. F., Martínez-Solano L., Sánchez M. B.; *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, *33*, 44; Rice, L. B. ; *Curr. Opin. Microbiol.* **2009**, *12*, 476.
2. Hsuesh, P. R.; *JFMA* **2011**, *110*, 213.
3. Mahesh, B., Satish S.; *World J. Agric, Sci.* **2008**, *4S*, 839.
4. Dorman H. J., Deans S. G.; *J. Appl. Microbiol.* 2000, *88*, 308; Cushnie T. P., Lamb A. J.; *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, *26*, 343.
5. McClatchey W. C., Mahady G. B., Bennett B. C., Shiels L., Savo V.; *Pharmacol. Ther.* **2009**, *123*, 239; http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch18_wTraditionalMed.pdf, acessada em Setembro 2011.
6. Bai N., He K., Roller M., Lai C., Shao X., Pan M., Ho C.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5363; Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Jovin E.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7879.
7. da Silva Filho A. A., Resende D. O., Fukui M. J., Santos F. F., Pauletti P. M., Cunha W. R., Silva M. L., Gregório L. E., Bastos J. K., Nanayakkara N. P.; *Fitoterapia* **2009**, *80*, 478; Resende F. A., Alves J. M., Munari C. C., Senedese J. M., Sousa J. P., Bastos J. K., Tavares D. C.; *Mutat. Res.* **2007**, *634*, 112.

8. Bastos E. M., Simone M., Jorge D. M., Soares A. E., Spivak M.; *J. Invertebr. Pathol.* **2008**, 97, 273; Barbastefano V., Cola M., Luiz-Ferreira A., Farias-Silva E., Hiruma-Lima C. A., Rinaldo D., Vilegas W., Souza-Brito A. R.; *Fitoterapia* **2007**, 78, 545; Brito, M. R., Senna-Valle, L.; *Acta Bot. Bras.* **2011**, 25, 363.
9. Srivastava J. K., Shankar E., Gupta S.; *Mol. Med. Report* **2010**, 3, 895; Gupta V., Mittal P., Bansal P., Khokra S. L., Kaushik D.; *Int. J. Pharm. Sci. Drug. Res.*; **2010**, 2, 12; McKay D. L., Blumberg J. B.; *Phytother. Res.* **2006**, 20, 519.
10. Saeed S., Tariq P.; *Int. J. Biol. Biotechnol.* **2008**, 5, 17; Gruenwald J., Freder .J, Armbruester N.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, 50, 822 ; Nanasombat S., Wimmutigosol P.; *Food Sci. Biotechnol.* **2011**, 20, 45.
11. Santos A. L, Chierice G.O., K. S. Alexander, Riga A., Matthews E.; *JTAC* **2009**, 96, 821.
12. Brito, M. R., Senna-Valle, L.; *Acta Bot. Bras.* **2011**, 25, 363; Amorim A. C., Lima C. K., Hovell A. M., Miranda A. L., Rezende C. M.; *Phytomedicine* **2009**, 16, 923.
13. Adams, RP. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4^a ed. Illinois, EUA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.
14. Al-Ruaily M. A., Khalil O. M.; *JMGG* **2011**, 3, 41.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. CLSI/NCCLS document M 100-S21 Wayne, PA, 2011.
16. Figueiredo A. C., Barroso J. G., Pedro L. G., Scheffer J. J. C.; *Flavour Frag. J.* **2008**, 23, 213.
17. Jiang Y., Wu N., Fu Y. J., Wang W., Luo M., Zhao C.J. , Zu Y. G., Liu X. L.; *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2011, 32, 63.
18. Okoh O.O., Sadimenko A.P., Afolayan A.J.; *Food Chem.* **2010**, 120, 308.
19. Nikaido H.; *Annu. Ver. Biochem.*; **2009**, 78, 119.
20. Schossler P., Schneider G. L., Wunsch D., Soares G. L. G., Zini C. A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, 277.
21. Meng Y., Pino V., Anderson J. L.; *Anal. Chem.* **2009**, 81, 7107.
22. Parreira N. A., Magalhães L. G., Morais D. R., Caixeta S. C., de Sousa J. P., Bastos J. K., Cunha W. R., Silva M. L., Nanayakkara N. P., Rodrigues V., da Silva Filho A. A.; *Chem. Biodivers.* **2010**, 7, 993.

23. Ferronato R., Marchesan E. D., Pezenti E., Bednarski F. Onofre S. B.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 224.
24. Braga F. G., Bouzada M. L., Fabri R. L., de O. Matos M., Moreira F. O., Scio E., Coimbra E. S.; *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 396.
25. Orav A., Raal A., Arak E.; *Nat. Prod. Res.* **2010**, *24*, 48.
26. Ganzera M., Schneider P., Stuppner H.; *Life Sci.* **2006**, *78*, 856.
27. Matos F.J.A., Machado M.I.L., Alencar J.W., Craveiro A.A.; *J. Essent. Oil Res.* **1993**, *5*, 337.
28. Kamatou G. P. P., Viljoen A. M.; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2010**, *87*, 1.
29. Jayaprakasha G. K., Rao L. J.; *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 547.
30. Yang Y. C., Lee H. S., Lee S. H., Clark J. M., Ahn Y. J.; *Int. J. Parasitol.* **2005**, *35*, 1595; Pawar V. C., Thaker V. S.; *Mycoses* **2006**, *49*, 316. Singh G., Maurya S., DeLampasona M. P., Catalan C. A.; *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 1650.
31. Unlu M., Ergene E., Unlu G. V., Zeytinoglu H. S., Vural N.; *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 3274.
32. Politeo O., Jukic M., Milos M.; *J. Food Biochem.*, **2010**, *34*, 129.
33. Silva, M.T.N.; Ushimaru, P.I.; Barbosa, L.N.; Cunha, M.L.R.S.; Fernandes Junior, A.; *Rev. Bras. Plantas Med.* **2009**, *11*, 257.
34. Zago J. A. A., Ushimaru P. I., Barbosa L. N., Fernandes Junior, A.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, *19*, 828.
35. Lago J. H., Souza E. D., Mariane B., Pascon R., Vallim M. A., Martins R. C., Baroli A. A., Carvalho B. A., Soares M. G., dos Santos R. T., Sartorelli P. *Molecules* **2011**, *16*, 9827.
36. Ogunwande I.A., Olawore N.O., Ekundayo O., Walker T.M., Schmidt J.M., Setzer W.N.; *Int. J. Aromat.* **2005**, *15*, 147.
37. Tacconelli E.; *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2009**, *22*, 352.
38. Costa D. P., Santos S. C., Seraphin J. C., Ferri P. H.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1287.
39. Marino M., Bersani C., Comi G.; *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *67*, 187.
40. Sivasothy Y., Chong W. K., Hamid A., Eldeen I. M., Sulaiman S. F., Awang K.; *Food Chem.*, **2011**, *124*, 514; Bezić N., Skocibusić M., Dunkić V., Radonić A.; *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 1037.
41. Imelouane, B., Amhamdi H., Wathelet J.P., Ankit M., Khedid K., El Bachiri, A.; *Int. J. Agric. Biol.* **2009**, *11*, 205.

42. Brady A., Loughlin R., Gilpin D., Kearney P., Tunney M.; *J. Med. Microbiol.* **2006**, *55*, 1375.
43. Li J., Dong J., Qiu J. Z., Wang J. F., Luo M. J., Li H. E., Leng B. F., Ren W. Z., Deng X. M.; *Molecules* **2011**, *16*, 1642.
44. O'Bryan C. A., Crandall P. G., Chalova V. I., Ricke S. C.; *J. Food Sci.* **2008**, *73*, M264.
45. Bajpai V. K., Al-Reza S. M., Choi U. K., Lee J. H., Kang S. C.; *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 1876; Gao C., Tian C., Lu Y., Xu J., Luo J., Guo X.; *Food Control* **2011**, *22*, 517.
46. Santana-Rios G., Orner G. A., Amantana A., Provost C., Wu S. Y., Dashwood R. H.; *Mutat. Res.* **2001**, *495*, 61; Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.; *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446.

Tabela 1. Valores obtidos para Densidade (mg/ml) e rendimento (%) para os óleos essenciais e partes utilizadas das plantas na produção dos óleos essenciais.

Parâmetros	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)	<i>Baccharis dracunculifolia</i> (Alecrim do campo)	<i>Vernonia polyanthes</i> (Assa peixe)	<i>Matricaria recutita</i> (Camomila)	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Canela)	<i>Caryophyllus aromaticus</i> (Cravo da Índia)	<i>Eugenia uniflora</i> (Pitanga)
Densidade (mg/mL)	865	932	850	907	1035	1001	924
Rendimento (%)	0,58	0,31	0,15	0,17	0,35	0,61	0,19
Partes utilizadas	folhas	folhas e flores	folhas e flores	capítulos florais	casca	inflorescências	folhas

Tabela 2. Compostos identificados e quantificados (%) presentes em cada óleo através da metodologia de CG-EM (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa).

Óleos essenciais	Compostos (%)
<i>R. officinalis</i> (Alecrim)	cânfora (27,51), limoneno (21,01), mirceno (11,19), α -pineno (10,37), β -pineno (5,27), β -cariofileno (4,60), canfeno (3,64), verbenona (3,0), isoborneol (2,10), γ -terpineno (1,71), linalol (1,15), α -felandreno (0,21)
<i>B. dracunculifolia</i> (Alecrim do campo)	nerolidol (25,84), espatulenol (13,14), germacreno B (7,62), - germacreno D (7,09), limoneno (6,93), β -pineno (4,24), δ -cadinol (4,11), β -cariofileno (3,23), α -pineno (2,53), β -mirceno (1,22), isocariofileno (1,21)
<i>V. polyanthes</i> (Assa peixe)	germacreno D (27,79), ϵ -cariofileno (16,02), germacreno B (15,01), 10- α -cariofileno (14,34), elemeno (9,39), copaeno (3,59), β -pineno (0,96), espatulenol (0,96), carvacrol (0,74), δ -cadinol (0,52)
<i>M. recutita</i> (Camomila)	camazuleno (31,48), α -bisabolol e óxido de bisabolona (15,71), cariofileno (13,59), óxido de bisabolol (11,98), α -farneseno (3,04), espatulenol (0,80), germacreno (0,78), azuleno (0,38), β -elemeno (0,38)
<i>C. zeylanicum</i> (Canela)	cinamaldeído (86,31), acetato de cinamila (4,83), eucaliptol (1,19), α -terpineol (0,75), terpinen-4-ol (0,58), α -pineno (0,38), limoneno (0,33), borneol (0,23), eugenol (0,23), β -pineno (0,21), canfeno (0,18)
<i>C. aromaticus</i> Cravo da Índia	eugenol (75,85), acetato de eugenila (16,38), β -cariofileno (4,84), α -humuleno (2,10)
<i>E. uniflora</i> (Pitanga)	selina 1,3,7 (11) trien-8-ona (30,10), epóxido de selina 1,3,7 (11) trien-8-ona (21,89), β -cariofileno (6,51), β -elemeno (4,11), terpinoleno (0,56), espatulenol (0,50), ocimeno (0,38), α -cariofileno (0,31), β -mirceno (0,28)

Tabela 3. Valores da CIM_{90%} para as bactérias testadas (em mg/ml).

Bactérias	Óleos essenciais						
	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)	<i>Baccharis dracunculifolia</i> (Alecrim do campo)	<i>Vernonia polyanthes</i> (Assa peixe)	<i>Matricaria recutita</i> (Camomila)	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Canela)	<i>Caryophyllus aromaticus</i> (Cravo da Índia)	<i>Eugenia uniflora</i> (Pitanga)
<i>S. aureus</i> (geral)	8,65	7,15	26,26	26,52	0,23	2,75	55,62
MRSA	8,65	6,72	26,25	25,8	0,23	2,71	56,0
MSSA	8,65	8,39	26,35	26,62	0,23	3,0	50,82
<i>Salmonella</i> (geral)	9,18	55,92	25,5	54,42	0,23	2,4	92,4
<i>S. Enteritidis</i> (alimentos)	9,17	55,92	25,5	54,42	0,23	2,36	92,4
<i>S. Typhimurium</i> (infecção)	9,19	55,92	25,5	54,42	0,23	2,5	92,4
<i>E. coli</i>	9,17	55,92	51,01	54,42	0,23	3,0	84,36
<i>P. aeruginosa</i>	8,66	55,92	51,01	54,42	0,83	30,03	92,4

Tabela 4. Comparação da sensibilidade dos diferentes perfis bacterianos frente aos OE testados.

Bactéria	Espectro de ação dos óleos essenciais em ordem de atividade antimicrobiana
<i>S. aureus</i> Meticilina resistente (MRSA)	Cravo da Índia = Canela > Alecrim do campo > Alecrim = Camomila = Pitanga = Assa peixe
<i>S. aureus</i> Meticilina sensível (MSSA)	Cravo da Índia > Canela > Alecrim do campo > Alecrim > Assa peixe = Camomila = Pitanga
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Cravo da Índia = Canela > Assa Peixe > Camomila > Alecrim do campo = Alecrim > Pitanga
<i>Salmonella</i> Typhimurium)	Cravo da Índia = Canela > Assa Peixe > Camomila > Alecrim do campo > Alecrim > Pitanga
<i>E. coli</i>	Canela > Cravo da Índia > Assa Peixe > Camomila > Alecrim do campo > Alecrim > Pitanga
<i>P. aeruginosa</i>	Canela > Cravo da Índia > Assa Peixe > Camomila > Alecrim do campo > Alecrim > Pitanga

Os resultados foram considerados de acordo com análise estatística, para $p < 0,05$.

MATERIAL SUPLEMENTAR
LISTA DE FIGURAS:

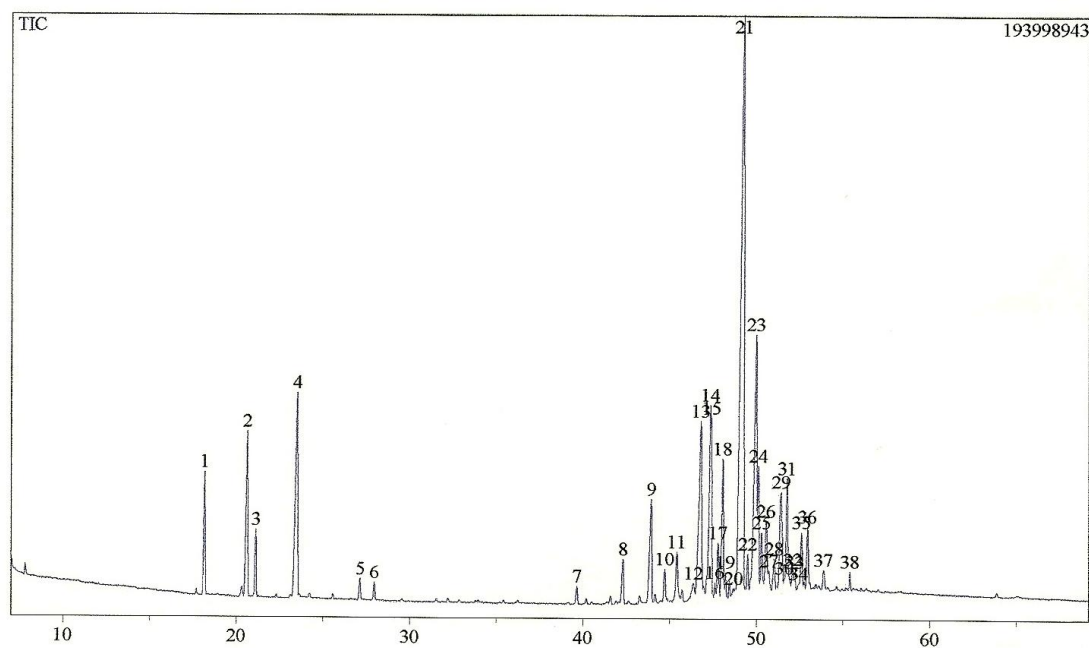


Figura 1: Cromatograma do OE de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- α -pineno (2,53), 2- β -pineno (4,24), 3- β -mirceno (1,22), 4- limoneno (6,93), 9- β -cariofileno (3,23), 11- isocariofileno (1,21), 13- germacreno D (7,09), 14- germacreno B (7,62), 21- nerolidol (25,84), 23-espatulenol (13,14), 29- δ -cadinol (4,11).

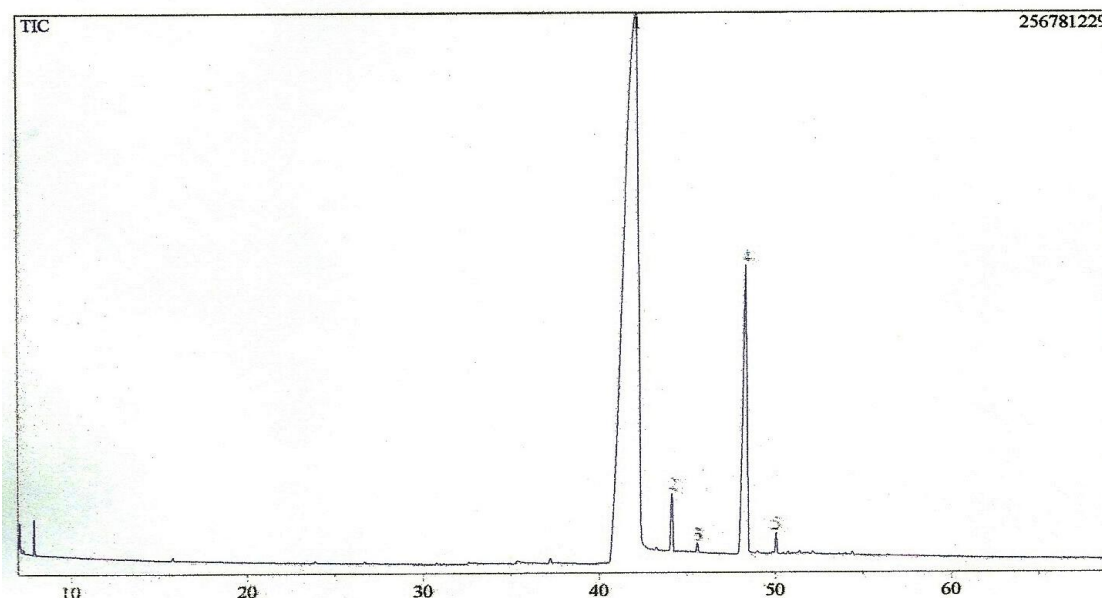


Figura 2: Cromatograma do OE de *Caryophyllus aromaticus* (cravo da Índia) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- eugenol (75,85), 2- β -cariofileno (4,84), 3- α -humuleno (2,10), 4-acetato de eugenila (16,38).

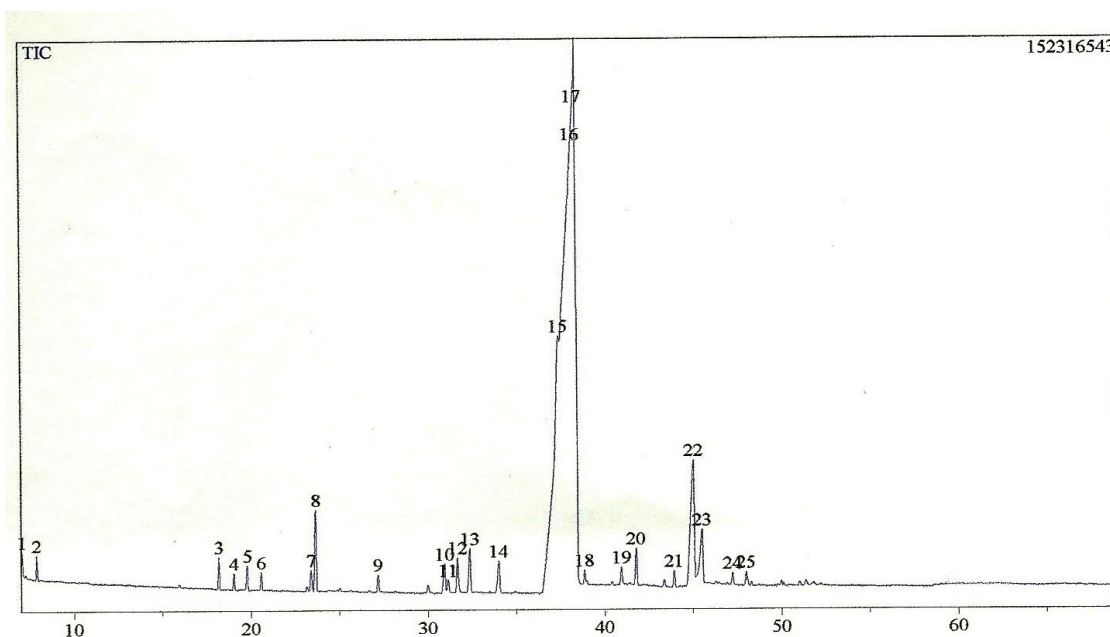


Figura 3: Cromatograma do OE de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 3- α -pineno (0,38), 4- canfeno (0,18), 6- β -pineno (0,21), 7- limoneno (0,33), 8 - eucaliptol (1,19), 9- linalol (0,21), 11- borneol (0,23), 12- terpinen-4-ol (0,58), 13- α -terpineol (0,75), 15, 16, 17- cinamaldeído (86,31), 19- eugenol (0,23), 22- acetato de cinamila (4,83).

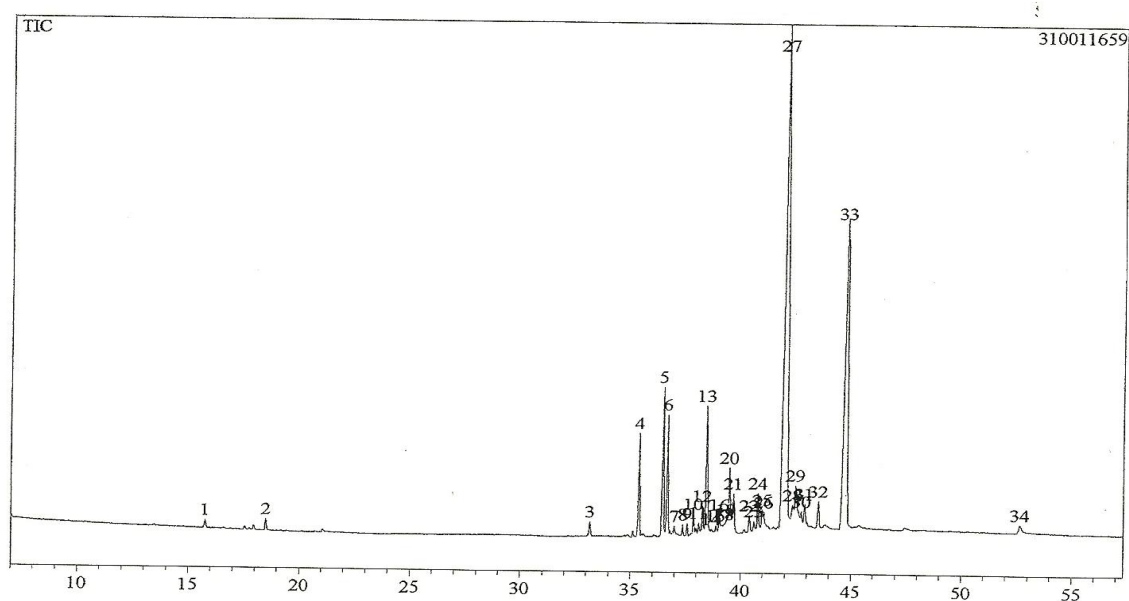


Figura 4: Cromatograma do OE de *Eugenia uniflora* (pitanga) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- β -mirceno (0,28), 2- ocimeno (0,38), 3-terpinoleno (0,56), 4- β -elemeno (4,11), 5- β -cariofileno (6,51), 8- α -cariofileno (0,31), 23- espatulenol (0,50), 27 - selina 1,3,7 (11) trien-8-ona (30,10), 33-epóxido de selina 1,3,7 (11) trien-8-ona (21,89).

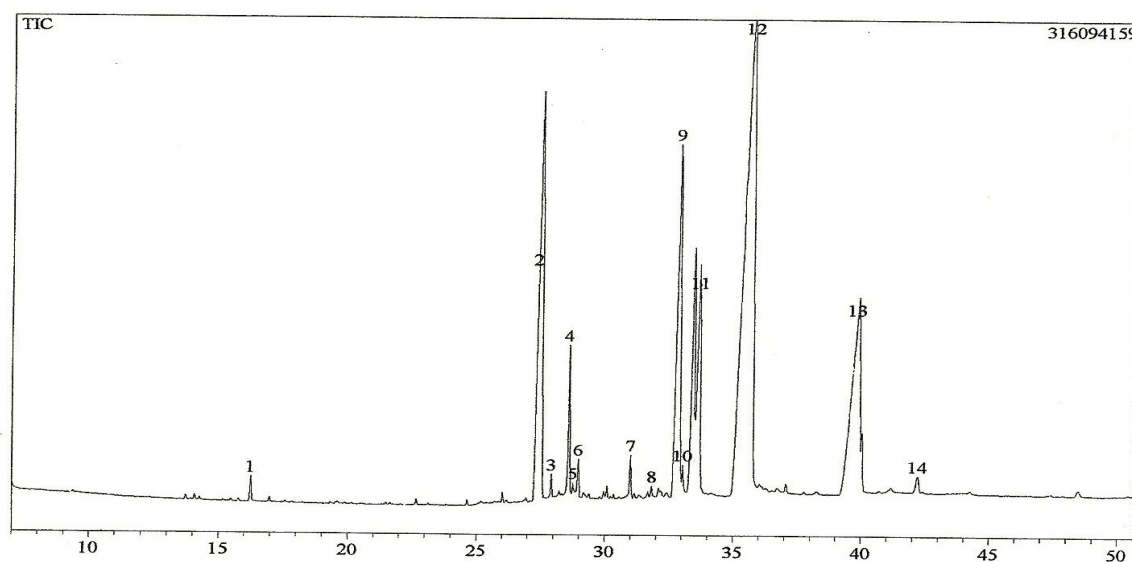


Figura 5: Cromatograma do OE de *Matricaria recutita* (camomila) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- β -elemeno (0,38), 2- cariofileno (13,59), 4- α -farneseno (3,04), 5- azuleno (0,38), 6- germacreno (0,78), 7- espatulenol (0,80), 9- óxido de bisabolol (11,98), 11- α -bisabolol e óxido de bisabolona (15,71), 12- camazuleno (31,48).

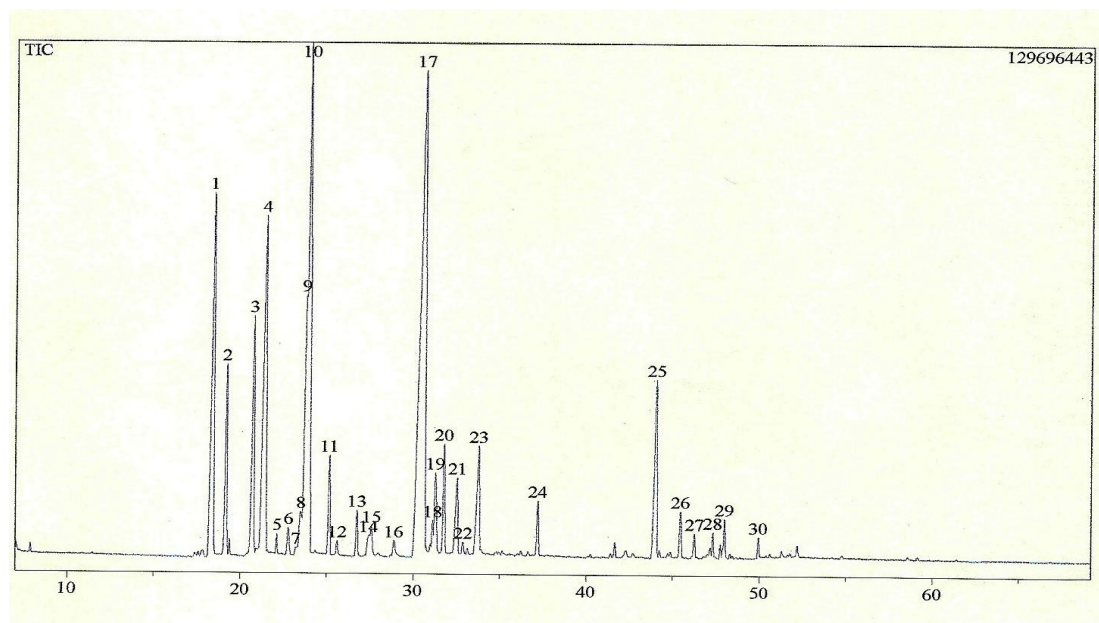


Figura 6: Cromatograma do OE de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- α -pineno (10,37), 2- canfeno (3,64), 3- β -pineno (5,27), 4- mirceno (11,19), 5- α -felandreno (0,21), 10- limoneno (21,01), 11- γ -terpineno (1,71), 14, 15- linalol (1,15), 17- cânfora (27,51), 19- isoborneol (2,10), 23- verbenona (3,0), 25- 25- β -cariofileno (4,60).

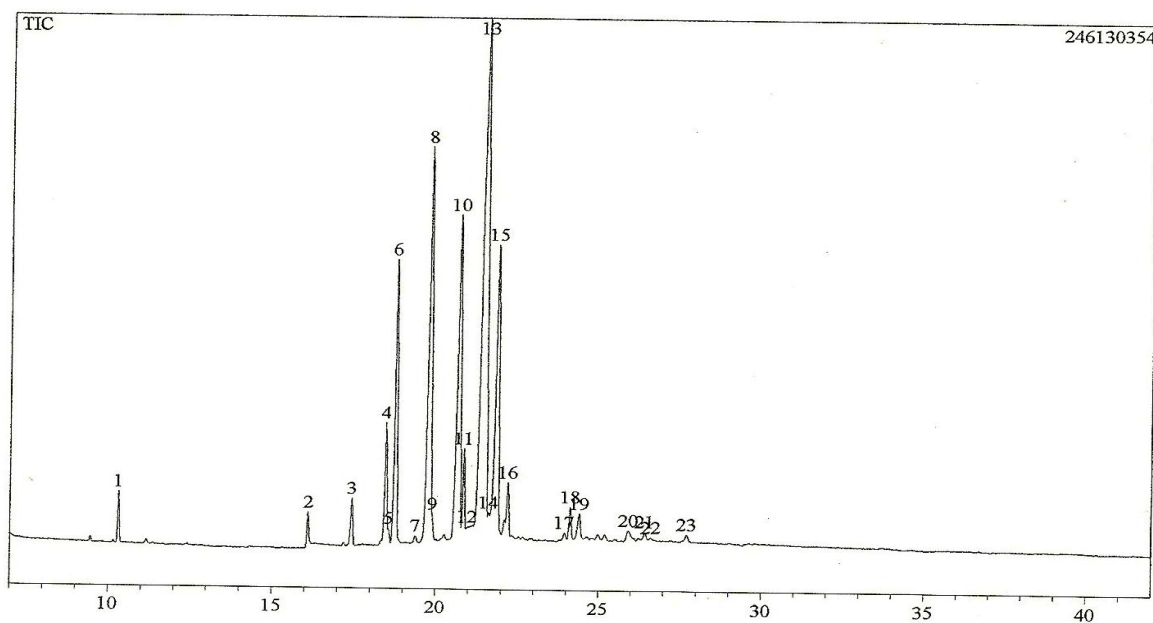


Figura 7: Cromatograma do OE de *Vernonia polyanthes* (assa peixe) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- β -pineno (0,96), 2- carvacrol (0,74), 4- copaeno (3,59), 6- elemeno (9,39), 8- ϵ -cariofileno (16,02), 10- α -cariofileno (14,34), 13- germacreno D (27,79), 15- germacreno B (15,01), 18- espatulenol (0,96), 20- δ -cadinol (0,52).

CAPÍTULO II

* Escrito de acordo com as normas estipuladas pela Revista *Natural Product Research*.

Sinergismo do efeito inibidor do crescimento bacteriano entre óleos essenciais e antibióticos

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

^aDepartamento de Microbiologia e Imunologia, ^bDepartamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Junior, s/n, 18618-970 Botucatu – SP, Brasil

*Autor correspondente - Email- isasprobst@gmail.com

Derivados vegetais têm sido investigados como possíveis fontes de tratamento para os mecanismos de multirresistência bacteriana relatados, com destaque para os óleos essenciais. A combinação entre antibióticos pode aumentar a atividade destas substâncias comparada com o espectro alcançado por cada uma isoladamente, da mesma forma, o emprego de óleos essenciais (OE) combinados entre si ou com drogas sintéticas representa uma alternativa à antibioticoterapia. Este estudo teve como objetivo avaliar a ação de quatro OE isolados, combinados entre si (em diferentes concentrações) e combinados com dois antibióticos, sobre cepas ATCC e isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O OE de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) apresentou a melhor ação antimicrobiana (CIM_{90%} de 0,23 mg/ml para *S. aureus* e *E. coli*, e 0,83 mg/ml para *P. aeruginosa*). Através da metodologia de difusão por discos, as melhores combinações ocorreram entre os discos contendo 15 µl de OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e os OE de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) (frente *S. aureus*) e cravo (*Caryophyllus aromaticus*) (frente *E. coli*) diluídos na proporção de $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} em MHA, enquanto para *P. aeruginosa*, a melhor combinação se deu entre os discos contendo OE de *B. dracunculifolia* e *C. aromaticus* ($\frac{1}{4}$ CIM_{90%}) diluído no MHA. Quando empregada a microdiluição, observa-se que os melhores índices de sinergismos ocorreram nas combinações com os OE de *C. aromaticus* e *C. zeylanicum* frente a *S. aureus* e *E. coli*, e de *C. aromaticus* frente *P. aeruginosa*. Com a realização de curvas de sobrevivência para as cepas ATCC, observamos atividade bactericida principalmente para os OE de *C. aromaticus* e *R. officinalis*, sozinhos ou combinados (na proporção equivalente a $\frac{1}{4}$ da CIM_{90%} de cada óleo) sobre todas espécies bacterianas testadas.

Palavras chave: bactérias patogênicas, GC-EM, ação antimicrobiana, produtos naturais, drogas antimicrobianas.

1. Introdução

Durante várias décadas, os antibióticos têm sido fundamentais nos processos de tratamento das doenças infecciosas causadas por bactérias e outros microrganismos, sendo considerados uma das principais causas para o aumento da expectativa média de vida no século XX. No entanto, bactérias patogênicas têm desenvolvido resistência a estas drogas antimicrobianas, tornando-se um problema de saúde pública de grandes proporções (Odonkor & Addo, 2011).

A incidência de surtos bacterianos associada a taxas crescentes de resistência bacteriana têm preocupado as autoridades da saúde, representando gastos econômicos e perda de produtividade para as populações. Ainda, o fluxo de pessoas, bens de consumo e alimentos característicos de um mercado globalizado aumentam as possibilidades destes surtos alcançarem grandes proporções rapidamente ao redor do mundo (Bush *et al.*, 2011). Além disto, as condições precárias de saneamento e habitação, falta de infraestrutura, desnutrição, alimentos contaminados, sistemas de saúde ausentes ou deficientes, e o uso de antibióticos sem prescrição adequada são fatores que contribuem para a seleção e propagação de cepas bacterianas resistentes, cuja susceptibilidade à antimicrobianos pode ser alterada por mutações espontâneas (de novo) ou transferência horizontal de genes de resistência (Alvan *et al.*, 2011).

Atualmente, os óleos essenciais (OE) são definidos como produtos naturais voláteis complexos normalmente caracterizados por apresentarem odor forte e produzidos durante o metabolismo secundários de plantas aromáticas. Na natureza, os OE desempenham um papel importante na fisiologia e comportamento das plantas. Os compostos voláteis presentes atuam como uma linguagem que as plantas utilizam para comunicação e interação com o ambiente circundante. Um total de 1700 compostos voláteis já foi isolado de mais de 90 famílias de plantas. Estes compostos são liberados a partir de folhas, flores e frutas para a atmosfera e de raízes no solo, tendo como objetivo defender as plantas contra herbívoros e patógenos ou fornecer uma vantagem reprodutiva, atraindo polinizadores e dispersores de sementes. De maneira geral, os compostos voláteis das plantas constituem cerca de 1% de seus metabólitos secundários (Dudareva *et al.*, 2006).

Também chamados de óleos voláteis ou “*quinta essentia*”, são misturas complexas geralmente constituídas por terpenos e terpenoides, e em menores quantidades, hidrocarbonetos, aldeídos, alcoóis, ésteres, lactonas, cumarinas e outros compostos (Dorman & Deans, 2000). O potencial antimicrobiano de compostos fenólicos, alcaloides e saponinas também tem sido investigado em estudos recentes, sendo o conhecimento etnobotânico ferramenta importante no *screening* de compostos vegetais para o desenvolvimento de novas drogas, incluindo antibióticos (Fawole *et al.*, 2009). Segundo Bakkali *et al.* (2008), os OE

podem conter cerca de 2-60 componentes em concentrações muito diferentes, e são caracterizados por dois ou três componentes principais presentes em concentrações bastante elevadas (20-70%, em comparação com os outros componentes presentes em traços), e que geralmente determinam as propriedades biológicas dos óleos.

O alecrim (*R. officinalis*) é um arbusto nativo do Mediterrâneo, empregado na medicina popular como tratamento para ansiedade, enxaqueca, hipertensão, dores musculares, reumatismo, doenças hepáticas, fadigas, entre outros. Além disso, o óleo essencial obtido das folhas é valorizado pela indústria alimentícia e de cosméticos devido suas propriedades organolépticas e farmacêuticas (Jalali-Heravi *et al.*, 2011).

B. dracunculifolia, conhecida por alecrim do campo, “vassoura” e “vassourinha” é empregada popularmente no Brasil como anti-inflamatório, antisséptico, antipirético, afecções de pele e distúrbios gastrointestinais, sendo a fonte vegetal de maior importância da própolis verde brasileira. O OE obtido das folhas é valorizado pela indústria pela sua aplicação em remédios, cosméticos e defensivos agrícolas, além de exibir atividade contra fungos, bactérias e protozoários (Parreira *et al.*, 2010).

À *C. zeylanicum* são reportadas várias atividades: analgésica, antisséptica, afrodisíaca, adstringente, carminativa, inseticida, entre outras, justificando seu uso ao longo da História na perfumaria, culinária e medicina tradicional. Apresentando geralmente o eugenol como composto majoritário, o OE de *C. zeylanicum* tem demonstrado potencial antimicrobiano, inclusive frente a cepas bacterianas multirresistentes (Carmo *et al.*, 2008).

O *C. aromaticus* tem sido bastante investigado por ser popularmente conhecida, de fácil acesso, e por conter render altas quantidades de OE, sendo o eugenol seu principal constituinte. Apresenta importância para a indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos, tendo a literatura reportado diversas propriedades medicinais, com destaque para anticariogênica, antifúngica e antibacteriana (Machado *et al.*, 2011).

Combinações entre OE podem alcançar o mesmo potencial descrito para óleos isolados, porém em concentrações menores, favorecendo o emprego como antimicrobianos de uso clínico e na conservação de alimentos, sendo que a ação conjunta dos diferentes compostos químicos pode fornecer alternativa para o controle de bactérias multirresistentes. Tais informações são pontuadas por Gutierrez *et al.*(2008), que testaram combinações dos OE de manjeriço, erva-cidreira, manjerona, orégano, sálvia e tomilho contra bactérias de origem alimentar, obtendo os melhores resultados nas combinações de orégano com tomilho, manjeriço e manjerona frente a *E. coli*. Fu *et al.* (2007) avaliaram o efeito de combinações entre os OE de cravo e alecrim (nas proporções de 1:5, 1:7 e 1:9), observando atividade

aditiva (frente *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Proteus vulgaris*), sinérgica (frente *Candida albicans*) e antagônica (frente *Aspergillus niger*).

Desta forma, e considerando a amplitude dos conhecimentos acumulados pela medicina popular, no presente estudo objetivou-se determinar o potencial antimicrobiano de quatro óleos essenciais isoladamente e também combinados entre si visando ação sinérgica entre eles além de testar também sinergismo destes com duas drogas antimicrobianas de uso na terapêutica de doenças infecciosas.

2. Resultados e discussão

Como todos os óleos essenciais e misturas mostraram alguma atividade inibitória, nenhum dos tratamentos foi considerado inativo. De acordo com a análise de seis amostras de óleos essenciais obtidas de duas variações de alecrim (*R. officinalis*), Zaouali *et al.* (2010) reportaram como compostos majoritários 1,8-cineol (40%), cânfora (17,9%), α -pineno (10,3%) e canfeno (6,3%). O grupo de pesquisa determinou também a CIM para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e com exceção de *P. aeruginosa*, que não foi inibida por nenhum OE testado, não relataram diferenças estatísticas nos valores obtidos para os dois grupos. Por outro lado, Pintore *et al.* (2002), ao avaliarem duas amostras de óleo de alecrim, observaram que as bactérias Gram-positivas testadas apresentaram maior susceptibilidade que as Gram-negativas (CIM de 2,5 e 4,0 mg/ml, respectivamente). Além disso, as caracterizações químicas dos OE estudadas apontaram α -pineno (13,7-24,6%), acetato de bornila (11,3-17%), verbenona (4,4-24,9%) e 1,8-cineol (3,4-11,3%) como principais constituintes, perfil qualitativo semelhante ao obtido na análise do OE obtido em nosso laboratório (cânfora-27,51%, limoneno-21,01%, mirceno-11,19%, α -pineno-10,37% e β -pineno -5,27%) (Tabela 1). De fato, as concentrações inibitórias para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas não apresentaram diferenças significativas, embora as quantidades necessárias (>8,6 mg/ml – Tabela 3) tenham sido maiores que as descritas em outros trabalhos (Pintore *et al.*, 2002; Jiang, Y *et al.*, 2011). De acordo com Celiktas *et al.* (2007), estas diferenças podem ter relação com aspectos tais como a origem geográfica das plantas, variações de temperatura às quais as plantas foram expostas durante seu crescimento, estação do ano em que ocorreu a coleta das plantas e sensibilidade das cepas bacterianas testadas.

Tabela 1. Compostos identificados e quantificados (%) presentes em cada óleo através da metodologia de CG-EM (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa).

Óleos essenciais	Compostos (%)
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)	cânfora (27,51), limoneno (21,01), mirceno (11,19), α -pineno (10,37), β -pineno (5,27), β -cariofileno (4,60), canfeno (3,64), verbenona (3,0), isoborneol (2,10), γ -terpineno (1,71), linalol (1,15), α -felandreno (0,21)
<i>Baccharis dracunculifolia</i> (Alecrim do campo)	nerolidol (25,84), espatulenol (13,14), germacreno B (7,62), - germacreno D (7,09), limoneno (6,93), β -pineno (4,24), δ -cadinol (4,11), β -cariofileno (3,23), α -pineno (2,53), β -mirceno (1,22), isocariofileno (1,21)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Canela)	cinamaldeído (86,31), acetato de cinamila (4,83), eucaliptol (1,19), α -terpineol (0,75), terpinen-4-ol (0,58), α -pineno (0,38), limoneno (0,33), borneol (0,23), eugenol (0,23), β -pineno (0,21), canfeno (0,18)
<i>Caryophyllus aromaticus</i> (Cravo da Índia)	eugenol (75,85), acetato de eugenila (16,38), β -cariofileno (4,84), α -humuleno (2,10)

Tabela 2. Compostos identificados e quantificados (%) através da metodologia de CG-EM para as misturas de 1:1 dos óleos essenciais.

Mistura dos OE	Compostos (%)
<i>R. officinalis</i> + <i>B. dracunculifolia</i> (Alecrim + alecrim do campo)	limoneno (14,26), nerolidol (13,57), cânfora (11,88), α -pineno (6,75), mirceno (6,06), β -pineno (4,95), espatulenol (4,71), β -cariofileno (3,88), canfeno (1,95), δ -cadinol (1,71), verbenona (1,24), δ -terpineno (0,74), isoborneol (0,70)
<i>R. officinalis</i> + <i>C. zeylanicum</i> (Alecrim + canela)	cinamaldeído (46,87), cânfora (11,98), limoneno (9,23), mirceno (4,89), α -pineno (4,81), acetato de cinamila (2,95), β -cariofileno (2,59), β -pineno (2,48), canfeno (1,75), verbenona (1,32), isoborneol (0,58), eugenol (0,15)
<i>R. officinalis</i> + <i>C. aromaticus</i> (Alecrim + cravo)	eugenol (45,56), cânfora (9,68), acetato de eugenila (8,77), limoneno (6,84), β -cariofileno (4,35), mirceno (3,90), α -pineno (3,53), β -pineno (1,96), verbenona (1,23), isoborneol (0,77)
<i>B. dracunculifolia</i> + <i>C. zeylanicum</i> (Alecrim do campo + canela)	cinamaldeído (40,25), nerolidol (13,21), espatulenol (5,69), germacreno D (5,05), germacreno B (4,94), limoneno (2,64), acetato de cinamila (2,67), δ -cadinol (2,21), β -cariofileno (2,03), β -pineno (1,59), α -pineno (0,96), eucaliptol (0,55), β -mirceno (0,45), eugenol (0,38), α -terpineol (0,37), terpinen-4-ol (0,29), linalol (0,26), borneol (0,22)
<i>B. dracunculifolia</i> + <i>C. aromaticus</i> (Alecrim do campo + cravo)	eugenol (42,04), nerolidol (15,02), espatulenol (5,11), germacreno D (4,90), germacreno B (4,66), acetato de eugenila (3,47), β -cariofileno (2,91), limoneno (2,34), δ -cadinol (1,52), β -pineno (1,42), α -pineno (0,77), β -mirceno (0,42)
<i>C. zeylanicum</i> + <i>C. aromaticus</i> (Canela + cravo)	eugenol (39,44), cinamaldeído (38,22), acetato de eugenila (7,80), acetato de cinamila (3,96), β -cariofileno (1,30), eucaliptol (0,49), α -pineno (0,16)

Tabela 3. Valores de CIM_{90%} (mg/ml) obtidos para as diferentes espécies bacterianas de acordo com os óleos essenciais testados.

Bactérias	<i>R. officinalis</i> (Alecrim)	<i>B. dracunculifolia</i> (Alecrim do campo)	<i>C. zeylanicum</i> (Canela)	<i>C. aromaticus</i> (Cravo da Índia)
<i>S. aureus</i> (n=32)	8,65	7,15	0,23	2,75
<i>E. coli</i> (n=16)	9,17	55,92	0,23	3,00
<i>P. aeruginosa</i> (n=16)	8,66	55,92	0,83	30,03

Parreira *et al.* (2010) não observaram inibição no crescimento de cepas ATCC de *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, MRSA e *Mycobacterium intracellulare* pelo OE de *B. dracunculifolia*, tendo identificado a presença de nerolidol (33,51%), espatulenol (16,24%), α -murolool (4,66%) e δ -cadineno (3,66%). Contraditoriamente, embora sem a caracterização química, Ferronato *et al.* (2007) reportaram atividade antibacteriana para cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 de acordo com a metodologia dos discos, obtendo halos de inibição respectivamente de 14,63 mm, 18,92 mm e 8,32 mm quando foram testados discos contendo 10 μ l de OE de *B. dracunculifolia*. Segundo a análise por CG-EM, observamos como compostos majoritários o nerolidol (25,84%), espatulenol (13,14%), germacreno B (7,62%) e germacreno D (7,09%). A CIM_{90%} obtida para as cepas de *S. aureus* foi de 7,15 mg/ml e 55,92 mg/ml para *E. coli* e *P. aeruginosa*, embora não tenha ocorrido a formação de halo de inibição com os testes pela metodologia dos discos impregnados com 15 μ l deste OE (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação das medianas (n=10) dos halos de inibição (em mm) obtidos para os óleos sozinhos (controle) em relação às combinações.

<i>R. officinalis</i> (Alecrim)^D	<i>S. aureus</i> *	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controle	14,3 ^{ab}	0 ^a	0 ^a
<i>B. dracunculifolia</i> ^A	20,1 ^b	0 ^a	0 ^a
<i>C. zeylanicum</i> ^A	11,3 ^a	10 ^{ab}	0 ^a
<i>C. aromaticus</i> ^A	12,5 ^{ab}	26 ^b	0 ^a
<i>B. dracunculifolia</i> (Alecrim do campo)^D	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controle	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>R. officinalis</i> ^A	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>C. zeylanicum</i> ^A	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>C. aromaticus</i> ^A	0 ^a	0 ^a	11,5 ^b
<i>C. zeylanicum</i> (Canela)^D	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controle	36 ^a	31 ^{ab}	21 ^b
<i>R. officinalis</i> ^A	36 ^a	30 ^a	21 ^b
<i>B. dracunculifolia</i> ^A	44 ^a	27 ^a	21 ^b
<i>C. aromaticus</i> ^A	37 ^a	39 ^b	0 ^a
<i>C. aromaticus</i> (Cravo)^D	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controle	12 ^a	15 ^a	0 ^a
<i>R. officinalis</i> ^A	14,5 ^a	19 ^a	0 ^a
<i>B. dracunculifolia</i> ^A	20,5 ^c	18 ^a	0 ^a
<i>C. zeylanicum</i> ^A	15,5 ^b	19 ^a	0 ^a
Oxacilina (OXA)^D	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controle	6 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>R. officinalis</i> ^A	10 ^b	0 ^a	0 ^a
<i>B. dracunculifolia</i> ^A	24,5 ^c	0 ^a	0 ^a
<i>C. zeylanicum</i> ^A	10,5 ^{ab}	0 ^a	0 ^a
<i>C. aromaticus</i> ^A	25 ^c	0 ^a	0 ^a
Tetracilina (TET)^D	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controle	19,5 ^a	24,5 ^a	15 ^b
<i>R. officinalis</i> ^A	19 ^a	31 ^b	14 ^b
<i>B. dracunculifolia</i> ^A	34,5 ^b	25,5 ^{ab}	15 ^b
<i>C. zeylanicum</i> ^A	22 ^{ab}	34 ^{ab}	13,5 ^b
<i>C. aromaticus</i> ^A	37,5 ^b	30 ^{ab}	0 ^a

* comparação feita com os valores das médias, uma vez que as medianas não forneceram homogeneidade de variâncias e normalidade adequadas. ^a, ^b, ^{ab}, ^c – letras iguais indicam ausência de diferença estatística significativa; letras diferentes indicam diferença estatística. ^D – substâncias em discos; 15 µl para os OE, 1 µg para OXA e 30 µg para TET. ^A – OE diluídos no Agar, na concentração equivalente a ¼ da CIM_{90%}.

As propriedades do OE de canela (*C. zeylanicum*) têm sido investigadas, incluindo o potencial antimicrobiano, atribuído ao cinamaldeído, composto presente em grandes quantidades (97,7%) de acordo com Singh *et al.* (2007), que reportaram também valores de halo de inibição 56,7±0,1, 35,1±0,3 e 60, ± 0,3 mm frente a cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Unlu *et al.* (2010) relataram como compostos majoritários também o cinamaldeído (68,95%), benzaldeído (9,94%), acetato de cinamila (7,44%) e limoneno (4,42%), sendo que para esta amostra de óleo de canela, os valores de CIM e halo de inibição foram de: 0,56 mg/ml e >40 mm sobre *S. aureus* ATCC 29213, 1,12 mg/ml e 26 mm sobre *E. coli* ATCC 25922 e 0,28 mg/ml e 18 mm frente a *P. aeruginosa* ATCC 2785). Observamos uma composição qualitativa parecida na análise do OE de *C. zeylanicum*: cinamaldeído (86,31%), acetato de cinamila (4,83%), eucaliptol (1,19%) e α -terpineol (0,75%). No entanto, a CIM de 0,23 mg/ml para *S. aureus* e *E. coli*, e 0,83 mg/ml para *P. aeruginosa*, e halos de inibição (36 mm para *S. aureus*, 31 mm para *E. coli* e 21 mm para *P. aeruginosa*) divergem dos anteriormente investigados, e isto pode estar relacionado com a composição quantitativa do OE, bem como com a origem hospitalar das cepas bacterianas testadas neste estudo.

Em artigo de revisão, Chaieb *et al.* (2007) descrevem a composição e atividades biológicas do OE de *C. aromaticus*, tendo retratado diversos perfis de sensibilidade bacteriana: 10 a 19,66±0,57 mm para 32 cepas de *S. epidermidis*, 14,66±1,15 mm para *S. aureus* ATCC 25923, 13,66±0,57 mm para *E. coli* ATCC 35218, 9 mm para *P. aeruginosa* ATCC 27853. Na caracterização de uma amostra deste tipo de óleo, reportaram presença de eugenol (88,58%), acetato de eugenila (5,62%), β -cariofileno (1,39%) e 2-heptanona (0,93%).

Ainda, ao investigar o potencial antibacteriano do OE de *C. zeylanicum* *in vivo* sobre cepas de *Listeria monocytogenes* inoculadas em salmão fresco, Miladi *et al.* (2007) observaram ação bacteriostática, para as concentrações de 1% e 2%, nas temperaturas de refrigeração (4°C) e ambiente (25°C). A amostra utilizada apresentou como compostos principais eugenol (88,6%), acetato de eugenila (5,6%), β -cariofileno (1,9%) e 2-heptanona (0,9%), composição semelhante àquela obtida neste estudo (eugenol (75,85), acetato de eugenila (16,38), β -cariofileno (4,84), α -humuleno (2,10)). Frente a cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, obtivemos valores de CIM e halos variados (2, 75 mg/ml e 12 mm, 3 mg/ml e 15mm, e 30,03 mg/ml e 0 mm, respectivamente).

Isoladamente, cada OE apresenta diversos compostos, e quando dois óleos são combinados, a interação entre as diversas substâncias químicas pode provocar sinergismo, adição ou efeitos antagônicos, resultados observados por Fu *et al.* (2007), com combinações

entre o óleo de alecrim (*R. officinalis*) e cravo (*C. aromaticus*). Por combinações entre OE e entre OE com antibióticos poderem alcançar a mesma atividade antibacteriana que os compostos isolados, porém em concentrações mais baixas, o que pode sugerir menores impactos nos efeitos colaterais para o organismo tratado e menores alterações organolépticas considerando a área de alimentos.

Através da metodologia de difusão por discos (Tabela 4), observa-se que as melhores combinações ocorreram entre os discos contendo 15 µl de OE de *R. officinalis* e os OE de *B. dracunculifolia* (frente *S. aureus*) e *C. aromaticus* (frente *E. coli*) diluídos na proporção de $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} em MHA. Nenhuma atividade inibidora ou sinérgica foi verificada para as cepas de *P. aeruginosa*. Situação contrária foi verificada nas associações com os discos contendo OE de *B. dracunculifolia*, para os quais não se formaram halos de inibição frente *S. aureus* e *E. coli*. A exceção ficou por conta da combinação de discos contendo OE de *B. dracunculifolia* e *C. aromaticus* na proporção de $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} no MHA, cuja mediana dos halos de inibição para a combinação dos dois OE foi de 11,5 mm, porém, individualmente, nenhuma das substâncias demonstrou potencial antimicrobiano, através desta metodologia. Frente a *S. aureus*, o OE de *C. zeylanicum* sozinho e combinado apresentou o mesmo potencial inibitório, assim como para *P. aeruginosa*, que só não apresentou atividade combinado com o OE de *C. aromaticus* diluído em MHA. Curiosamente, a associação de OE de *C. zeylanicum* (disco) e *C. aromaticus* diluído no MHA, apresentou a melhor atividade entre as combinações testadas sobre a cepa de *E. coli*, com mediana dos halos igual a 39 mm. Na avaliação do OE de *C. aromaticus* no disco, tanto isoladamente como combinado com os demais OE diluídos no MHA, os halos obtidos foram estatisticamente iguais frente a *E. coli*, e ausentes para as cepas de *P. aeruginosa*. Frente a *S. aureus*, a maior atividade (20,5 mm) ocorreu com *C. aromaticus* (disco) + *B. dracunculifolia* (no MHA). Embora o maior potencial antibacteriano tenha sido alcançado pelos OE de *C. zeylanicum* e *C. aromaticus*, podemos inferir também que a associação destes óleos com os dois outros de menor atividade também alcançaram resultados positivos. Segundo Lis-Balchin *et al.* (1997), na mistura de um OE com elevada atividade inibitória e outro de atividade moderado pode ocorrer efeito inibidor significativo, ao passo que combinações entre OE de atividades inibidoras elevadas podem não apresentar qualquer aumento da ação antibacteriana.

A administração conjunta de antibióticos e OE pode ser uma alternativa no tratamento de infecções causadas por cepas bacterianas multirresistentes. Embora *P. aeruginosa* e *E. coli* sejam naturalmente resistentes à droga oxacilina (OXA), testamos discos de 1 µg de OXA combinados com os OE, objetivando mudança na atividade do antibiótico, porém, não ocorreu

interação entre as substâncias e nem a formação de halo de inibição. Frente às cepas MRSA (resistentes à OXA), no entanto, com o uso dos discos da droga na presença do OE de *B. dracunculifolia* e *C. aromaticus* diluídos no MHA, houve atividade sinérgica com formação de halos aproximadamente quatro vezes maior àqueles obtidos com o uso do antibiótico sozinho. Verificou-se sinergismo também entre TET e OE de *B. dracunculifolia* e *C. aromaticus* quando estes foram diluídos no MHA, tendo obtidos valores das medianas de 34,5 e 37,5 mm, respectivamente, frente *S. aureus* (Tabela 5). Embora sem diferenças estatísticas, ocorreram situações em que o Controle (quando a substância foi empregada sozinha) apresentou efeito inibitório maior que algumas combinações, como verificado nos ensaios com discos de *R. officinalis* frente a *S. aureus* e *C. zeylanicum* frente a *E. coli*, e TET frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*. D'Arrigo *et al.* (2010) reportaram que o sinergismo entre OE e antibióticos pode ser resultante de ação dos OE sobre a membrana bacteriana, permitindo uma maior interação do antibiótico com o microrganismo, embora a ação resultante dos efeitos causados sobre várias moléculas alvo da bactéria ao mesmo tempo também possa ter um efeito de indiferença ou mesmo antagonismo sobre o efeito inibidor.

Tabela 5. Inibição reportada para as combinações entre OE frente a *S. aureus* (n=10).

<i>S. aureus</i>	Combinações	Taxa de inibição
CIM _{90%} <i>C. aromaticus</i> (Cravo)	as três concentrações dos OE de canela, alecrim e alecrim do campo	100%
½ CIM _{90%} <i>C. aromaticus</i>	CIM _{90%} canela	100%
	CIM _{90%} alecrim do campo	80%
	½ e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	60%
	½ e ¼ de CIM _{90%} canela, CIM _{90%} e ½ CIM _{90%} alecrim	40%
	¼ CIM _{90%}	30%
¼ CIM _{90%} <i>C. aromaticus</i>	CIM _{90%} canela	100%
	CIM _{90%} alecrim do campo	80%
	½ e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	60%
	¼ CIM _{90%} canela	20%
	½ CIM _{90%} canela, ½ CIM _{90%} alecrim CIM _{90%} e ¼ CIM _{90%} alecrim	10%
	0%	0%
CIM _{90%} <i>C. zeylanicum</i> (Canela)	as três combinações dos OE de alecrim e alecrim do campo	100%
½ CIM _{90%} <i>C. zeylanicum</i>	CIM _{90%} alecrim do campo	40%
	½ CIM _{90%} alecrim do campo	20%
	CIM _{90%} , ½ e ¼ CIM _{90%} alecrim, ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	10%
	0%	0%
¼ CIM _{90%} <i>C. zeylanicum</i>	CIM _{90%} alecrim do campo	40%
	½ e ¼ CIM _{90%} alecrim, ½ e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	10%
	0%	0%
CIM _{90%} <i>R. officinalis</i> (Alecrim)	CIM _{90%} alecrim do campo	70%
	0%	0%
½ CIM _{90%} <i>R. officinalis</i>	½ CIM _{90%} alecrim do campo	40%
	¼ CIM _{90%} alecrim do campo	10%
	CIM _{90%} alecrim do campo	70%
	½ CIM _{90%} alecrim do campo	20%
¼ CIM _{90%} <i>R. officinalis</i>	¼ CIM _{90%} alecrim do campo	10%
	CIM _{90%} alecrim do campo	70%
	½ CIM _{90%} alecrim do campo	20%
	CIM _{90%} alecrim do campo	0%

Tabela 6. Inibição reportada para as combinações entre OE frente a *E. coli* (n=10).

<i>E. coli</i>	Combinações	Taxa de inibição
CIM _{90%} <i>C. aromaticus</i> (Cravo)	CIM _{90%} , ½ e ¼ CIM _{90%} canela e alecrim	100%
	¼ CIM _{90%} alecrim do campo	50%
	½ CIM _{90%} alecrim do campo	10%
	CIM _{90%} alecrim do campo	0%
½ CIM _{90%} <i>C. aromaticus</i>	CIM _{90%} , ½ e ¼ CIM _{90%} canela e alecrim	100%
	CIM _{90%} , ½ e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	0%
¼ CIM _{90%} <i>C. aromaticus</i>	CIM _{90%} canela, CIM _{90%} , ½ e ¼ CIM _{90%} alecrim	100%
	¼ CIM _{90%} canela	90%
	½ CIM _{90%} canela	80%
	CIM _{90%} , ½ e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	0%
CIM _{90%} <i>C. zeylanicum</i> (Canela)	CIM _{90%} e ½ CIM _{90%} alecrim, ½ e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	100%
	¼ CIM _{90%} alecrim	90%
	CIM _{90%} alecrim do campo	40%
½ CIM _{90%} <i>C. zeylanicum</i>	CIM _{90%} e ½ CIM _{90%} alecrim	100%
	¼ CIM _{90%} alecrim	90%
	CIM _{90%} , ½ e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	0%
¼ CIM _{90%} <i>C. zeylanicum</i>	CIM _{90%} e ½ CIM _{90%} alecrim	100%
	¼ CIM _{90%} alecrim	70%
	CIM _{90%} , ½ e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	0%
CIM _{90%} <i>R. officinalis</i> (Alecrim)	¼ CIM _{90%} alecrim do campo	60%
	½ CIM _{90%} alecrim do campo	50%
	CIM _{90%} alecrim do campo	20%
½ CIM _{90%} <i>R. officinalis</i>	¼ CIM _{90%} alecrim do campo	10%
	CIM _{90%} e ½ CIM _{90%} alecrim do campo	0%
¼ CIM _{90%} <i>R. officinalis</i>	CIM _{90%} , ½ e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	0%

Tabela 7. Inibição reportada para as combinações entre OE frente a *P. aeruginosa* (n=10).

<i>P. aeruginosa</i>	Combinações	Taxa de inibição
CIM _{90%} <i>C. aromaticus</i> (Cravo)	½ CIM _{90%} canela	100%
	CIM _{90%} canela	90%
	¼ CIM _{90%} alecrim	80%
	¼ CIM _{90%} canela, CIM _{90%} alecrim, ½ CIM _{90%} alecrim do campo	70%
	½ CIM _{90%} alecrim, CIM _{90%} e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	60%
½ CIM _{90%} <i>C. aromaticus</i>	CIM _{90%} canela	100%
	½ CIM _{90%} canela	80%
	¼ CIM _{90%} canela, ¼ CIM _{90%} alecrim, ½ CIM _{90%} alecrim do campo	70%
	CIM _{90%} alecrim do campo	60%
	com CIM _{90%} e ½ CIM _{90%} alecrim, ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	50%
¼ CIM _{90%} <i>C. aromaticus</i>	CIM _{90%} e ½ CIM _{90%} canela	90%
	¼ CIM _{90%} canela	60%
	¼ CIM _{90%} alecrim	50%
	CIM _{90%} e ½ CIM _{90%} alecrim, ½ CIM _{90%} alecrim do campo	40%
	CIM _{90%} e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	30%
CIM _{90%} <i>C. zeylanicum</i> (Canela)	CIM _{90%} e ¼ CIM _{90%} alecrim	50%
	½ CIM _{90%} alecrim	40%
	CIM _{90%} e ½ CIM _{90%} alecrim do campo	20%
	¼ CIM _{90%} alecrim do campo	10%
½ CIM _{90%} <i>C. zeylanicum</i>	CIM _{90%} e ½ CIM _{90%} alecrim, CIM _{90%} alecrim do campo	20%
	¼ CIM _{90%} alecrim, ½ e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	10%
¼ CIM _{90%} <i>C. zeylanicum</i>	CIM _{90%} e ¼ CIM _{90%} alecrim	20%
	¼ CIM _{90%} alecrim, CIM _{90%} e ½ CIM _{90%} alecrim do campo	10%
	¼ CIM _{90%} alecrim do campo	0%
CIM _{90%} <i>R. officinalis</i> (Alecrim)	CIM _{90%} alecrim do campo	20%
	½ e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	10%
½ CIM _{90%} <i>R. officinalis</i>	CIM _{90%} , ½ e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	0%
¼ CIM _{90%} <i>R. officinalis</i>	CIM _{90%} , ½ e ¼ CIM _{90%} alecrim do campo	0%

Frente a *E. coli* (Tabela 6), verifica-se melhor atividade para as combinações que incluem os OE de *C. aromaticus* e *C. zeylanicum*. Entretanto, algumas misturas que alcançaram 100% de inibição das cepas apresentam quantidades correspondentes à CIM_{90%} de OE, o que tornam mais promissores os resultados equivalentes obtidos com o emprego de menores concentrações de OE. É o caso das combinações de $\frac{1}{2}$ CIM_{90%} *C. aromaticus* + $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} *C. zeylanicum*, $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} *C. aromaticus* + $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} *R. officinalis*, $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} *C. zeylanicum* + $\frac{1}{2}$ CIM_{90%} *R. officinalis*. Estas observações reforçam que a competição de várias substâncias por uma mesma molécula alvo pode resultar em atividade antagônica, diminuindo o efeito antibacteriano dos OE misturados em grandes proporções (D'Arrigo *et al.*, 2010).

Apesar da maioria dos trabalhos na literatura descreva uma maior sensibilidade à ação de bactérias Gram-positivas frente a produtos naturais em comparação com Gram-negativas, observa-se na Tabela 5 que as cepas de *S. aureus* testadas só foram 100% inibidas por misturas contendo a quantidade equivalente à CIM_{90%} de pelo menos um dos óleos, não sendo possível afirmar que a ação antimicrobiana ocorreu pela ação dos dois OE ou só daquele presente em maior quantidade, embora algumas cepas não tenham sido inibidas pela CIM_{90%} obtida previamente ao serem testadas através de microdiluição. Assim sendo, os melhores resultados desconsiderando aqueles obtidos nestas condições foram os obtidos pela mistura de $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} de *C. aromaticus* + $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} de *B. dracunculifolia*, com inibição de 60% das cepas testadas. As combinações $\frac{1}{2}$ CIM_{90%} de *C. aromaticus* + $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} de *B. dracunculifolia* e $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} de *C. aromaticus* + $\frac{1}{2}$ CIM_{90%} de *B. dracunculifolia* também mostraram o mesmo resultado, porém com o emprego de concentrações maiores de OE.

Por geralmente apresentar resistência a antimicrobianos, a espécie *P. aeruginosa* demonstrou sensibilidade de 100% somente nas combinações contendo a concentração equivalente à CIM_{90%} de pelo menos um dos OE testados (Tabela 7). Como o objetivo do estudo foi identificar as combinações com baixas concentrações e com alto potencial de ação inibidora, as misturas $\frac{1}{2}$ CIM_{90%} de *C. aromaticus* + $\frac{1}{2}$ CIM_{90%} de *C. zeylanicum* e $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} de *C. aromaticus* + $\frac{1}{2}$ CIM_{90%} de *C. zeylanicum* apresentaram as melhores atividades, com inibição de 80 e 90% das linhagens, respectivamente.

As combinações entre os OE de *C. aromaticus* e *C. zeylanicum* mostraram maior atividade antibacteriana frente às cepas Gram-positivas e Gram-negativas, o que concorda com os resultados apresentados na literatura. Gruenwald *et al.* (2010) descrevem o potencial antimicrobiano do OE de *C. zeylanicum* e do cinamaldeído, principal componente majoritário do óleo, frente a diversas espécies bacterianas. Ambas as substâncias são sugestivamente bactericidas por provocarem danos na membrana das bactérias. Da mesma forma, o OE de *C.*

aromaticus e seu principal constituinte, usualmente o eugenol, apresentam forte atividade microbiana, tendo sido testados em ensaios *in vitro* contra bactérias patogênicas, obtendo resultados significativos também contra bactérias Gram-positivas e negativas (Chaieb *et al.*, 2007). Tais afirmações podem ser comprovadas através das curvas de sobrevivência descritas para estes dois OE frente cepas ATCC (Figuras 1, 2 e 3), que demonstraram perfil bactericida em período de 24 horas, tendendo a zerar a contagem de UFC/ml em alguns casos (OE de *C. aromaticus* isolado e combinação de $\frac{1}{4}$ CIM_{90%} de *C. aromaticus* + *C. zeylanicum* para *S. aureus*, e OE de *C. zeylanicum* para *E. coli*).

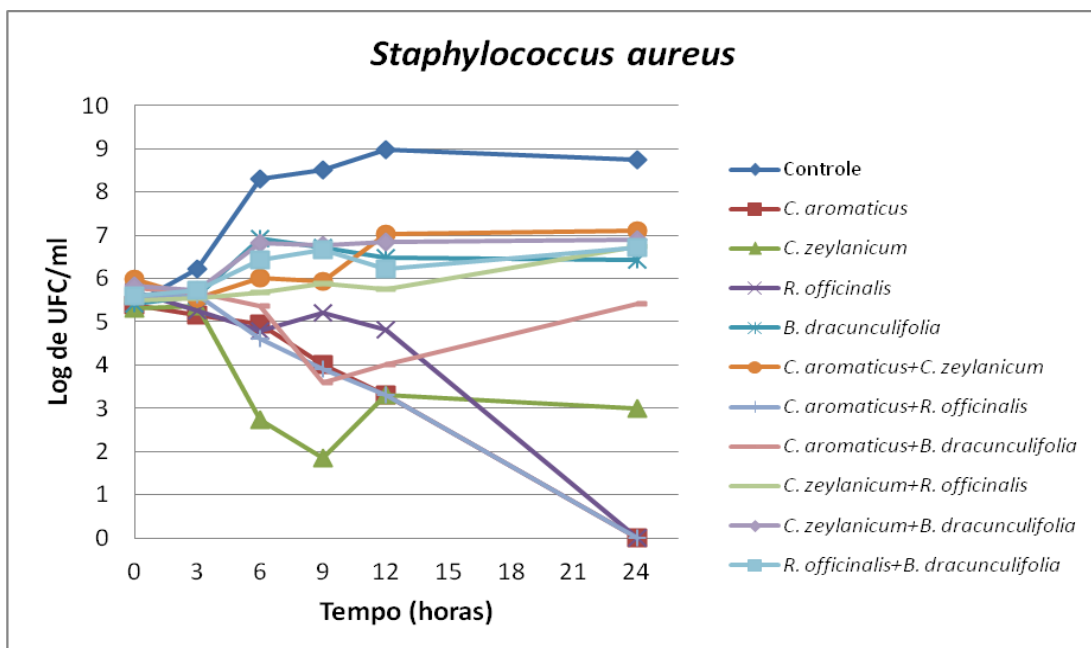


Figura 1. Curva de sobrevivência descrita para *S. aureus* (ATCC 25923) frente aos óleos essenciais e suas misturas nas proporções de $\frac{1}{4}$ dos respectivos valores de CIM_{90%}.

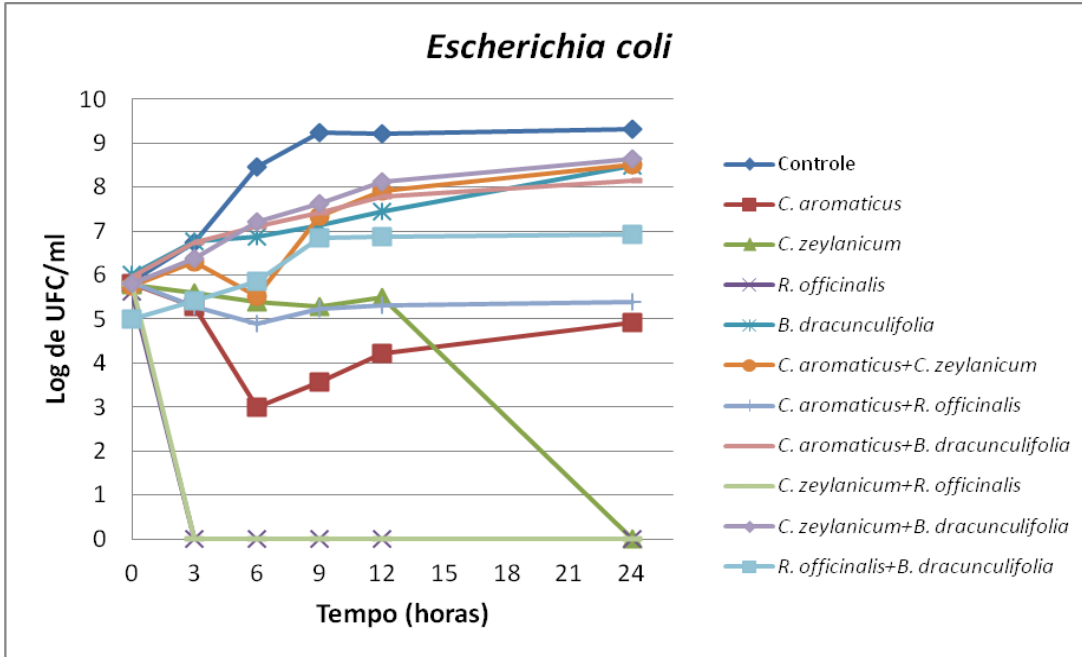


Figura 2. Curva de sobrevivência descrita para *E. coli* (ATCC 25922) frente aos óleos essenciais e suas misturas nas proporções de $\frac{1}{4}$ dos respectivos valores de CIM_{90%}.

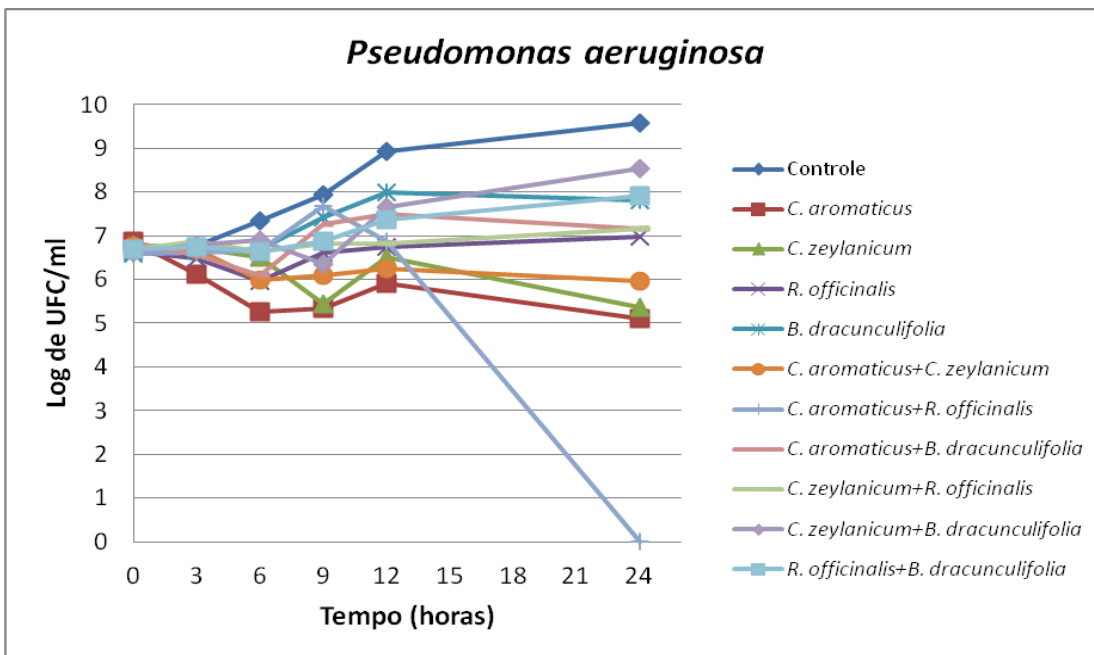


Figura 3. Curva de sobrevivência descrita para *P. aeruginosa* (ATCC 27853) frente aos óleos essenciais e suas misturas nas proporções de $\frac{1}{4}$ dos respectivos valores de CIM_{90%}.

Assim, o presente estudo demonstrou o potencial de sinergismo entre os óleos essenciais, sendo a combinação entre amostras de um mesmo OE uma possível solução para se alcançar a padronização dos princípios ativos de fitoterápicos. Ainda, combinações entre OE de diferentes espécies de plantas cuja atividade isolada é fraca podem favorecer o desenvolvimento de antimicrobianos com potencial antimicrobiano significativo, como demonstrado nas misturas de *Rosmarinus officinalis* e *Baccharis dracunculifolia* sobre *S. aureus*. Novas combinações entre OE devem ser testadas, bem como podem ser realizados ensaios utilizando-se compostos isolados de óleos essenciais, principalmente os considerados majoritários.

3. Parte experimental

3.1. Obtenção das plantas

As amostras de cravo da Índia (*Caryophyllus aromaticus* L. – inflorescências) e de canela (*Cinnamomum zeylanicum* L. - cascas) foram adquiridas em estabelecimento comercial na cidade de Botucatu/SP, Brasil. A amostra de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) foram coletadas na forma fresca em jardim de plantas medicinais pertencente à empresa Grupo Centroflora, da cidade de Botucatu, São Paulo, enquanto a coleta de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia* DC.) foi realizada em área no distrito de Rubião Junior, Botucatu/SP. As amostras que não foram obtidas no comércio foram identificadas pelo Prof. Dr. Luiz Roberto Hernandez Bicudo, e suas exsiccatas (BOTU 26038-alecrim e BOTU 25795-alecrim do campo) foram depositadas no Herbário Prof^ª. Dr^ª. Irina Delanova Gemtchujnicov, sob responsabilidade do Departamento de Botânica/IBB/ UNESP/Botucatu.

3.2. Óleos essenciais (OE) e caracterização química

Os OE foram obtidos através da metodologia de hidrodestilação por arraste a vapor, realizada em equipamento tipo Clevenger, (marca Marconi, modelo M480) (Solórzano-Santos & Miranda-Novales, 2011). Após a extração, foram calculados o rendimento e a densidade dos óleos extraídos (Xavier *et al.*, 2011). Considerando que no estudo propusemos a verificação de sinergismo entre óleos essenciais, foram preparadas misturas empregando-se os valores correspondentes a ¼ da CIM_{90%} obtidos para cada óleo, de forma a serem preparadas misturas equivalentes a 1:1. Desta forma, a caracterização química de cada OE, e respectivas misturas, foi realizada em espectrofotômetro de massas acoplado a um cromatógrafo gasoso (CG-EM), marca Shimadzu, modelo QP5050A, de acordo com as condições operacionais: coluna capilar CBP-5 (50m x 0,25mm), temperatura do injetor 250°C, temperatura da coluna 250°C, e hélio

(He) como gás de arraste. A energia de impacto (EI) utilizada na EM foi de 70 eV. A identificação dos compostos presentes nos óleos essenciais foi feita através da análise dos espectros de massa, consulta à biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology - Mass Spectral Library) e com base na literatura (Adams, 2007).

3.3. Linhagens bacterianas

Foram testadas bactérias de isolados clínicos, e cepas padrões ATCC, mantidas congeladas a -70°C no Departamento de Microbiologia e Imunologia/IBB/UNESP, sendo estas *Staphylococcus aureus* (16 meticilina resistentes (MRSA), 15 meticilina sensíveis (MSSA) e ATCC 25923), *Escherichia coli* (15 linhagens e ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (15 linhagens e ATCC 27853). As amostras MRSA e MSSA foram identificadas por biologia molecular (gene *mecA*) e fenotipicamente, com o uso de discos de oxacilina (1µg) e cefoxitina (30 µg) (Al-Ruaily & Khalil, 2011). As demais linhagens foram submetidas a testes de pureza e viabilidade antes de serem utilizadas, sendo mantidas em refrigeração (a 4°C), em estoque de caldo de cérebro e coração (BHI) acrescido de Agar.

3.4. Ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A sensibilidade das linhagens microbianas frente aos óleos essenciais foi determinada através da diluição em Agar Mueller Hinton (MHA-Difco), de acordo com as normas instituídas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011). Foram elaboradas placas de Petri com MHA e concentrações de 0,025% a 10%v/v de OE e 0,5% de Tween 80, visando a diluição dos óleos de forma homogênea dos OE no meio de cultura. As linhagens bacterianas foram inoculadas em caldo Cérebro e Coração (BHI-Difco) e incubadas a 37°C/24 horas, sendo padronizadas posteriormente na escala 0,5 McFarland para a obtenção de suspensões com cerca de 10⁵ Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml). As linhagens estudadas foram inoculadas nas placas de Petri com o auxílio de um multi-inoculador de Steer, e a leitura da CIM foi feita após 37°C/24 horas, pela observação de presença ou ausência de colônias para cada linhagem. Os dados obtidos foram transformados em mg/ml, sendo calculados os valores de CIM_{90%} para cada grupo de microrganismos avaliado. Como controle positivo, as bactérias foram semeadas em placas de MHA contendo 0,5% de Tween 80, sem acréscimo dos OE. Foram testadas 16 cepas para cada espécie bacteriana, sendo 15 cepas isoladas de casos clínicos, e uma cepa ATCC.

3.5. Sinergismo entre os óleos essenciais e com drogas antimicrobianas convencionais

Nos ensaios para verificação de sinergismo entre os OE foram utilizadas 10 cepas escolhidas levando em conta a proximidade com o valor de CIM obtido para a cepa, e o valor de CIM_{90%} obtido para cada uma das três espécies mencionadas, sendo que para *S. aureus* foram testados quatro MRSA, cinco MSSA e ATCC 25923, nove *E. coli* e ATCC 25922, e nove *P. aeruginosa* e ATCC 27853. O sinergismo entre os quatro óleos essenciais foi avaliado segundo adaptação da metodologia de difusão em discos (Kirby & Bauer) e da microdiluição em caldo Cérebro e Coração (BHI), enquanto para avaliar o sinergismo entre os OE e dois antimicrobianos convencionais (oxacilina - OXA e tetraciclina - TET) foi utilizada apenas a metodologia da difusão através de discos. Ainda, como forma de acompanhar a atividade dos óleos isoladamente e combinados entre si, foram realizados ensaios para obtenção das curvas de sobrevivência, sendo nesta ocasião testadas apenas as respectivas cepas padrões ATCC empregadas nos outros ensaios.

3.5.1. Metodologia dos discos (Kirby & Bauer)

Foram preparados cinco grupos de placas de Petri contendo Mueller Hinton Agar (MHA) e 0,5% de Tween 80. O primeiro grupo foi considerado como controles positivos do experimento, pois não houve acréscimo de óleo essencial no MHA. Após semeadura de cada cepa selecionada (10 ao todo para cada bactéria) foram colocados na superfície destas placas discos de papel de filtro (6 mm) contendo volume de 15 µl de cada óleo além de um disco de cada droga selecionadas (OXA e TET- OXOID). Todos os ensaios desta etapa seguiram a padronização utilizada em Kirby e Bauer, ou seja, crescimento em BHI a 37°C/18-24 horas; padronização na escala 0,5 de McFarland; incubação a 37°C/24 horas e leitura dos halos de inibição (em milímetros). Quanto aos quatro grupos de placas restantes, foram feitas mistura de cada um dos quatro óleos com o MHA em concentrações correspondentes a ¼ da CIM_{90%} obtidas previamente para cada OE. Tal como feito com o grupo controle, cada grupo de placa foi semeado com uma cepa de cada bactéria, seguido da colocação dos discos de papel (6 mm) contendo 15 µl de óleo essencial, com exceção daquele já misturado ao MHA, ou seja, três discos no total, e um disco de OXA (1 µg) e um de TET (30 µg), seguida de incubação e leitura dos halos de inibição.

3.5.2. Metodologia da microdiluição

Nesta etapa do estudo utilizou-se a metodologia da microdiluição para avaliar o sinergismo entre os óleos, através da mistura entre os óleos essenciais para obter combinações como

CIM_{90%} + CIM_{90%}, CIM_{90%} + ½ CIM_{90%}, CIM_{90%} + ¼ CIM_{90%}, ½ CIM_{90%} + ¼ CIM_{90%}, e ¼ CIM_{90%} + ¼ CIM_{90%}. Assim, cada *well* (poço) da placa utilizado era preenchido com 200 µl de BHI acrescido de 0,5% de Tween 80, as concentrações dos óleos de cada combinação (em µl) e dois µl das suspensões bacterianas na escala 0,5 McFarland. Após incubação (37°C/24 horas), a leitura foi feita pela adição de 50 µl de solução de resazurina a 0,01%, sendo em seguida verificada a mudança de cor, ou seja, os poços que mantiveram a coloração azul foram considerados livres de crescimento bacteriano e os poços nos quais houve mudança, a coloração rosa indicou crescimento bacteriano (Andreu *et al.*, 2011; Oldoni *et al.*, 2011).

3.5.3. *Curvas de sobrevivência*

Finalizando os estudos para verificação de sinergismo, foram realizados ensaios para obtenção de curvas de sobrevivência testando-se a atividade dos OE isoladamente e combinados frente às respectivas cepas padrões ATCC de cada espécie bacteriana. Foram preparados erlenmeyers contendo volumes finais de 20 ml, sendo este volume a somatória de BHI acrescido de 0,5% v/v de Tween 80, os OE nas concentrações relativas à CIM_{90%} (para os óleos isoladamente) e ¼ da CIM_{90%} de cada óleo (nas respectivas combinações entre os óleos testados). Como controle dos experimentos, foi utilizado erlenmeyer com BHI e 0,5% de Tween 80, sem o acréscimo de óleo. Cada erlenmeyer foi inoculado com dois µl de suspensão bacteriana padronizada na escala 0,5 McFarland, para obtenção de concentração bacteriana ao redor de 10⁵-10⁶ UFC/mL e alíquotas de 0,1 ml foram tomadas nos tempos 0, 1,5, 3, 6, 9, 12 e 24 horas de incubação (37°C/24 horas), sendo feitas diluições em salina (1 ml: 9 ml) quando necessário, seguida de plaqueamento pela técnica em profundidade (Pour Plate) em placas de MHA. Após incubação destas sub-culturas (37°C/24 horas) foram realizadas leituras objetivando a contagem das colônias utilizando contador de colônias (marca Phoenix), e cálculos dos respectivos log de UFC/ml. Os resultados foram plotados em gráficos para comparação entre os valores obtidos para os controles, frente aos OE isoladamente e nas combinações previstas.

3.6. *Análise estatística*

Para a análise comparativa entre os tratamentos, foi empregado o software estatístico SAS (versão 9.0), licenciado pela UNESP (2009). Através do teste de Kruskal-Wallis., foram consideradas diferenças estatísticas significativas nas situações em que p<0,05, evidenciando a diferença de potencial antibacteriano entre os óleos testados.

Agradecimentos

À agência de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro oferecido.

Referências

- Adams, R. P. (2007). Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4^a ed. Illinois, EUA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- Al-Ruaily, M. A. & Khalil, O. M. (2011). Detection of (*mecA*) gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at Prince A / Rhman Sidery Hospital, Al-Jouf, Saudi Arabia. *Journal of Medical Genetics and Genomics*, 3, 41-45.
- Alvan, G., Edlund, C., & Hedding, A. (2011). The global need for effective antibiotics - a summary of plenary presentations. *Drug Resistance Updates*, 14, 70-76.
- Andreu, N., Fletcher, T., Krishnan, N., Wiles, S., & Robertson, B. D. (2011). *et al.* Rapid measurement of antituberculosis drug activity *in vitro* and in macrophages using bioluminescence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, disponível em: <http://jac.oxfordjournals.org/content/early/2011/11/17/jac.dkr472.full.pdf+html>.
- Bakkali, F. Averbeck S., Averbeck D., & Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–47.
- Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., Jacoby, G. A., Kishony, R., Kreiswirth, B. N., Kutter, E., Lerner, S. A., Levy, S., Lewis, K., Lomovskaya, O., Miller, J. H., Mobashery, S., Piddock, L. J. V., Projan, S., Thomas, C. M., Tomasz, A., Tulkens, P. M., Walsh, T. R., Watson, J. D., Witkowski, J., Witte, W., Wright, G., Yeh, P., & Zgurskaya, H. I. (2011). Tackling antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 894-896.
- Carmo, E. S., Lima, E. O., Souza, E. L., & Sousa, F. B. (2008). Effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 91-97.
- Celiktas, O. U., Kocabas, E. E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., & Baser, K. H. (2007). C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, v100, 553-539.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*, 21, 501-506.

- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. CLSI/NCCLS document M 100-S21 Wayne, PA.
- D'Arrigo, M., Ginestra, G., Mandalari, G., Furneri, P. M., & Bisignano, G. (2010). Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Phytomedicine*, *17*, n.5, 317-322.
- Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, *88*, p. 308-31.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., & Orlova, I. (2006). *Plant volatiles: recent advances and future perspectives*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *25*, 417-440.
- Fawole, O. A., Ndhala, A. R., Amoo, S. O., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2009) Anti-inflammatory and phytochemical properties of twelve medicinal plants used for treating gastrointestinal ailments in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, *123*, p. 237-243.
- Ferronato, R., Marchesan, E. D., Pezenti, E., Bednarski, F., & Onofre S. B. (2007) Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C.(Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *17*, 224-230.
- Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., & Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, *21*, 989-994.
- Gruenwald, J., Freder, J., & Armbruster, N. (2010). Cinnamon and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *50*, 822-834.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, *124*, 91-97.
- Jalali-Heravi, M., Moazeni, R. S., & Sereshti, H. (2011). Analysis of Iranian rosemary essential oil: application of gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometrics. *Journal of Chromatography A*, *1218*, 2569-2576.
- Jiang Y., Wu N., Fu Y. J., Wang W., Luo M., Zhao C.J. , Zu Y. G., & Liu X. L. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *32*, 63-68.
- Lis-Balchin, M., Deans, S., & Hart, S. (2007). A study of the changes in the bioactivity of essential oils used singly and as mixtures in aromatherapy. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, *3*, 249-256.

- Machado, M., Dinis, A. M., Salgueiro, L., Custódio, J. B., Cavaleiro, C., & Sousa M. C. (2011). Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. *Experimental Parasitology*, *127*, 732-739.
- Miladi, H., Cjaieb, K., Anmar, E., & Bakhrouf, A. (2010) Inhibitory effect of clove oil (*Syzyium aromaticum*) against *Listeria monocytogenes* cells incubated in fresh-cut salmon. *Journal of Food Safety*, *30*, 432-442.
- Odonkor, S. & Addo, K. (2011). Bacteria resistance to antibiotics: recent trends and challenges. *International Journal of Biological & Medical Research*, *2*, 1204-1210.
- Oldoni, T. L. C., Cabral, I. S. R., d'Arce, M. A. B. R., Rosalen, P. R., Ikegaki, M, Nascimento, A. M., & Alencar, S. M. (2011). Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Separation and Purification Technology*, *77*, 208-213.
- Parreira N. A., Magalhães L. G., Morais D. R., Caixeta S. C., de Sousa J. P., Bastos J. K., Cunha W. R., Silva M. L., Nanayakkara N. P., Rodrigues V., & da Silva Filho A. A. (2010). Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chemistry and Biodiversity*, *7*, 993-1001.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., & Casanova, J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, *17*, n.1, 15-19.
- Singh, G., Maurya, S., DeLampasona, M, P.,& Catalan, C. A. (2007). A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and chemical Toxicology*, *45*, 1650-1661.
- Solórzano-Santos, F. & Miranda-Novales, M. G. (2011). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, *23*, 1-6.
- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G. V., Zeytinoglu, H. S., & Vural N. (2010). Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 3274-3280.
- Xavier, V. B., Vargas, R. M. F., Cassel, E., Lucas, A. M., Santos, M. A., Mondin, C. A, Santarem, E. R., Astaria, L. V., & Sartor, T. (2011) Mathematical modeling for extraction of essential oil from *Baccharis* spp. by steam distillation, 599-604.
- Zaouali, Y., Bouzaine, T., & Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 3144-3152.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, IN & Mazzafera, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, n.3, p. 241-8, 2005.

Bakkali, F et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p. 446-75, 2008.

Balunas, MJ & Kinghorn, AD. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.8, n.5, p. 431-41, 2005.

Biswas, KK *et al.* Essential oil production: relationship with abundance of glandular trichomes in aerial surface of plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.31, n.1, p. 13-19, 2009.

Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p. 317-38, 1998.

Boppré, M. Redefining “pharmacophagy”. **Journal of Chemical Ecology**, v.10, n.7, p. 1151-51, 1984.

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p. 223-53, 2004.

Chen, MS. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. **Insect Science**, v.15, n.2, p. 101-114, 2008.

Claudot, AC et al. Chalcone synthase activity and polyphenolic compounds of shoot tissues from adult and rejuvenated walnut trees. **Planta**, v.203, n.3, p. 275-82, 1997.

Croteau, R, Kutchan, TM; Lewis, NG. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B; Gruissem, W; Jones R (Eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: Courier Companies, Inc., 2000. p. 1250-318.

Di Pasqua, R et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v.10, n.5, p. 1040-9, 2010.

Dorda, C. Foliar application of calcium and magnesium improves growth, yield, and essential oil yield of oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*). **Industrial Crops and Products**, v.29, n.2-3, p. 299-608, 2009.

Edris, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v.21, p.308-323, 2007.

El-Sayed, M & Verpoorte, R. Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. **Phytochemistry reviews**, v.6, n.2-3, p. 277-305, 2007.

Enfissi, EMA *et al.* Metabolic engineering of the mevalonate and nonmevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. **Plant Biotechnology Journal**, v.3, n.1, p. 17-27, 2005.

Fabricant, DS & Farnsworth, NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.1, p. 69-75, 2001.

Facchini, PJ & De Luca, V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. **The Plant Journal**, v.54, n.4, p. 763-84, 2008.

Figueiredo, AC *et al.* Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.23, n.4, p. 213-26, 2008.

Galindo, LA, Pultrini, AM, Costa, M. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. **Journal of Natural Medicines**, v.64, n.4, p. 436-41, 2010.b

Ganzera, M et al. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Matricaria chamomilla* cv. BONA. **Planta Medica**, v.74, n.4, p. 453-7, 2008.

García-García, R, López-Malo, A, Palou, E. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, v.76, n.2, p. M95-100, 2011.

Gobbo-Neto, L & Lopes, NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 374-81, 2007.

González-Lamothe, R *et al.* Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.8, p. 3400-19, 2009.

Greay, SJ & Hammer, KA. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, abr. 2011, disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/g3125722r4132346/>>. Acesso em 17 de nov. 2011.

Guinoiseau, E *et al.* Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.29, n.7, p. 873-9, 2010.

Gupta, RN & Spencer, ID. Biosynthesis of the piperidine nucleus. **The Journal of Biological Chemistry**, v.244, n.1, p. 88-94, 1969.

Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p.1-93, 2006.

Halberstein, RA. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v.15, n.9, p. 686-99, 2005.

Hartmann, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.80, n.1, p. 177-88, 1996.

Herrmann, KM. The Shikimate Pathway as an Entry to Aromatic Secondary Metabolism. **Plant Physiology**, v.107, n.1, p. 7-12, 1995.

Huffman, MA. Current evidence for self-medication in primates: a multidisciplinary perspective. **American Journal of Physical Anthropology**, v.104, n.25, p. 171-200, 1997.

Hussain, AI *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v.108, n.3, p. 86-95, 2008.

Itenov, K; Molgaard P.; Nyman U. Diurnal fluctuations of the alkaloid concentration in latex of poppy *Papaver somniferum* is due to day–night fluctuations of the latex water content. **Phytochemistry**, v.52, n.7, p. 1229-34(6), 1999.

Jaleel, CA *et al.* Water deficit stress effects on reactive oxygen metabolism in *Catharanthus roseus*; impacts on ajmalicine accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.62, n.1, 2008.

Kosuge, T. The role of phenolic in host response to infection. **Annual Review of Phytopathology**, v.7, p. 195-222, 1969.

Kretschmar, FS *et al.* Elevated CO₂ atmosphere enhances production of defense-related flavonoids in soybean elicited by NO and a fungal elicitor. **Environmental and Experimental Botany**, v.65, n.2-3, p. 319-29, 2009.

Kutchan, TM. Alkaloid biosynthesis – the basis for metabolic engineering of medicinal plants. **Plant Cell**, v.7, n.7, p. 1059-70, 1995.

Li, JWH & Vederas, JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v.325, n.5837, p. 161-65, 2009.

Liu, H *et al.* Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge. **Industrial Crops and Products**, v.33, n.1, p. 84-88, 2011.

Lv, F *et al.* In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, v.44, n.9, p. 3057-64, 2011.

Montanari, CA & Bolzani, VS. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v.24, n.1, p. 105-11, 2001.

Newman, DJ. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, n.9, p. 2589-99, 2008.

Palaniappan, K & Holley, RA. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.140, n.2-3, p. 164-8, 2010.

Papageorgiou *et al.* Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.16, p. 7254-64, 2008.

Qiu, J *et al.* Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v.6, n.1, jan. 2011, disponível em: < <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0016160>>. Acesso em 23 out. 2011.

Phillips, MA *et al.* The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. **Trends in Plant Science**, v.13, n.12, p. 619-23, 2008.

Quideau, S *et al.* Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v.50, n.3, p. 586-621, 2011.

Raskin, I *et al.* Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v.20, n.12, p. 522-31, 2002.

Rezende, FM & Furlan, CM. Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees. **Chemosphere**, v.76, n.10, p. 1445-50, 2009.

Ryan, D & Robards, K. Phenolic compounds in olives. **Analyst**, v.123, p. 31R-44R, 1998.

Sangwan, NS *et al.* Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v.34, n.1, p. 3-21, 2001.

Sato, F et al. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.1, p. 367-72, 2001.

Shi, Q; Li, C; Fuzuo, Z. Nicotine synthesis in *Nicotiana tabacum* L. induced by mechanical wounding is regulated by auxin. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.11, p. 2899–2907, 2006.

Silva, F *et al.* Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal of Medical Microbiology**, ago. 2011, disponível em: <<http://jmm.sgmjournals.org/content/early/2011/08/23/jmm.0.034157-0>>. Acesso em 17 nov. 2011.

Silva, NCC *et al.* Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research**, 2011. Acessado em 10/11/2011, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2011.564582>.

Simões, M; Bennett, RN; Rosa, EAS. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Products Report**, v.26, n.6, p. 746-57, 2009.

Solórzano-Santos, F & Miranda-Novales, MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, p.1-6, 2011.

Souza, AB et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytotherapy Research**, v.25, n.2, p. 215-20, 2011.

Spitaler, R *et al.* Altitudinal variation of phenolic contents in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO: a 3-year comparison. **Journal of Chemical Ecology**, v.34, n.3, p. 369-75, 2008.

Stermitz, FR *et al.* Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. **PNAS**, v.97, n.4, p. 1433-7, 2000.

The World Medicines Situation. Traditional medicines: global situations, issues, and challenges. Geneva, **World Health Organization**, 2011, disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch18_wTraditionalMed.pdf>. Acesso em 29 out. 2011.

Tounekti, T *et al.* Influence of ionic interactions on essential oil and phenolic diterpene composition of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, n.10-11, p. 213-21, 2010.

Trombetta, D. *et al.* Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.6, p.2474-2478, jun. 2005.

Van Vuuren, S & Viljoen, A. Plant-based antimicrobial studies – methods and approaches to study the interaction between natural products. **Planta Medica**, v.77, n.11, p. 1168-82, 2011.

Vázquez-Flota, F *et al.* Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, n.7-8, p. 623-8, 2004.

Walsh, CT & Fischbach, MA Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v.132, n.8, p. 2469-93, 2010.

Yang, L & Stöckigt, J. Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. **Natural Products Reports**, v.27, n.10, p. 1469-79, 2010.

Zhang, WJ & Björn, LO. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. **Fitoterapia**, v.80, n. 4, p. 207-18, 2009.

ANEXOS



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



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



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de fevereiro de 2.010

OF. 016/2010-CEP

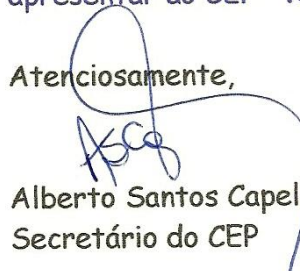
Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Ary Fernandes Junior
Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências do
Campus de Botucatu

Prezado Prof. Ary,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa, (Protocolo CEP 3426-2010) Atividade antibacteriana e verificação e sinergismo entre os óleos essenciais de plantas medicinais, que será conduzido por Isabella da Silva Probst, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 01 de fevereiro de 2.010.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Conectado: isasp369

Meus Dados

Desconectar

Página do Autor
Nova Submissão
Gerador PDF

[tmp_9416] - Detalhes do Manuscrito

Detalhes do Manuscrito

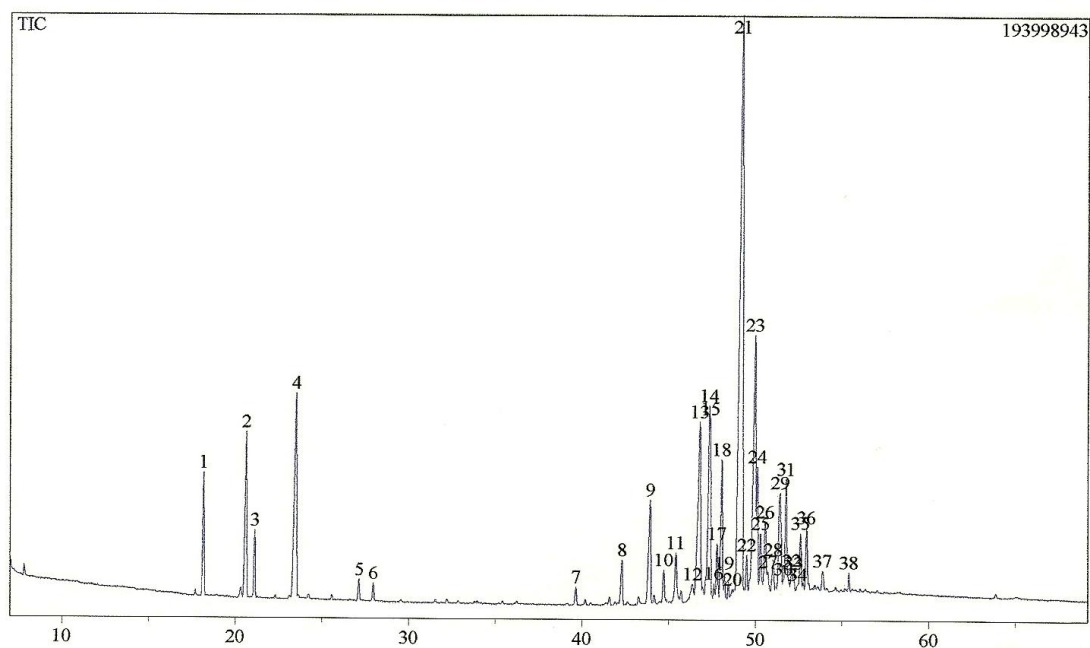
Número: **tmp_9416**
 Título: Composição química e atividade antibacteriana de óleos essenciais
 Status: Em Avaliação
 Tipo: Artigo Original
 Palavras-Chave: ação antibacteriana, óleos essenciais, produtos naturais, resistência bacteriana
 Carta: Aos Editores da Química Nova,

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente e avaliar a atividade antibacteriana de sete plantas empregadas na medicina popular brasileira, sendo nativas ou não. A partir da extração de óleo essencial das espécies por hidrodestilação, e caracterização por CG-EM. Com estes dados, será realizado um segundo estudo, com o emprego dos quatro óleos de maior atividade microbiana em concentrações diferentes, com a finalidade de se observar possível sinergismo entre os compostos.

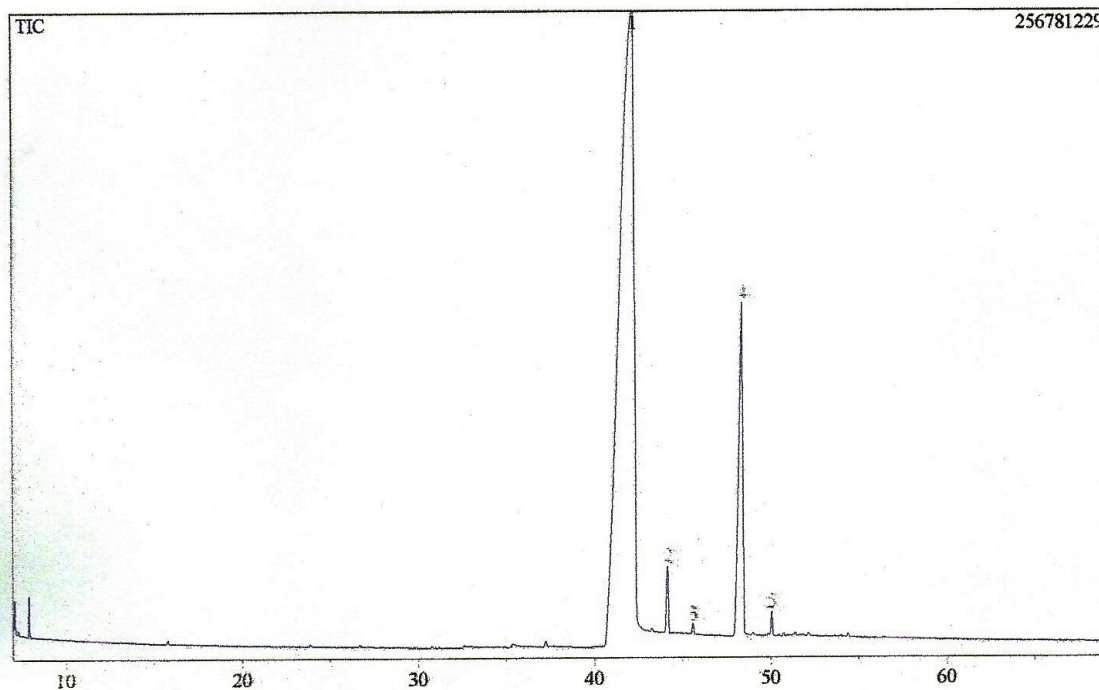
Arquivo PDF: [tmp_qn_9416.pdf](#)

Autor 1

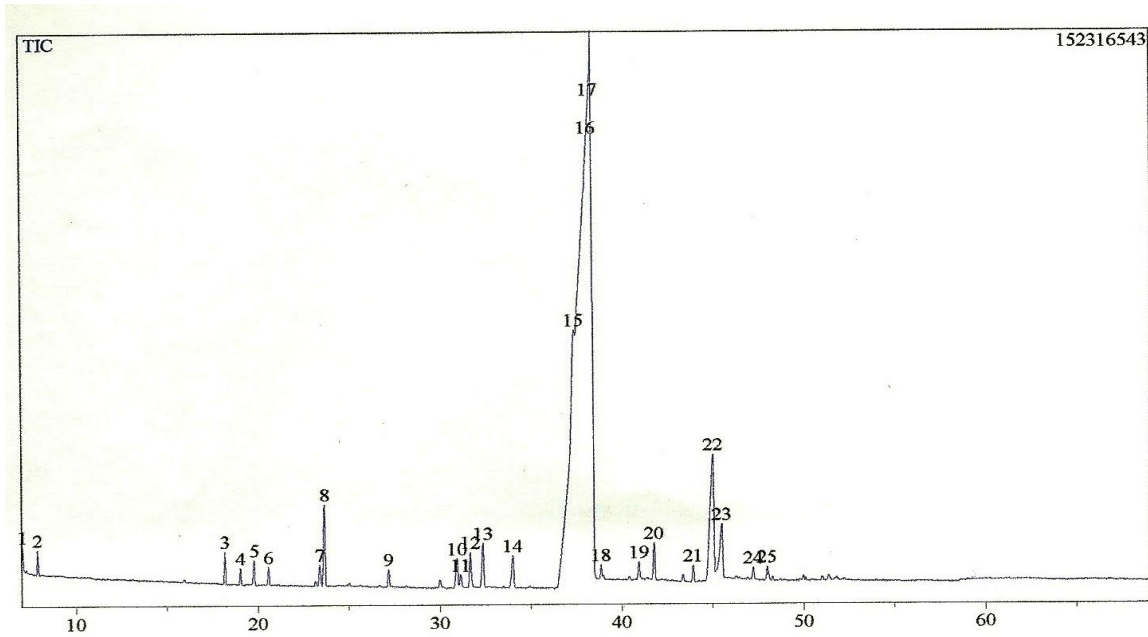
Nome: Isabella
 Nome do Meio(Iniciais): S
 Sobrenome: Probst



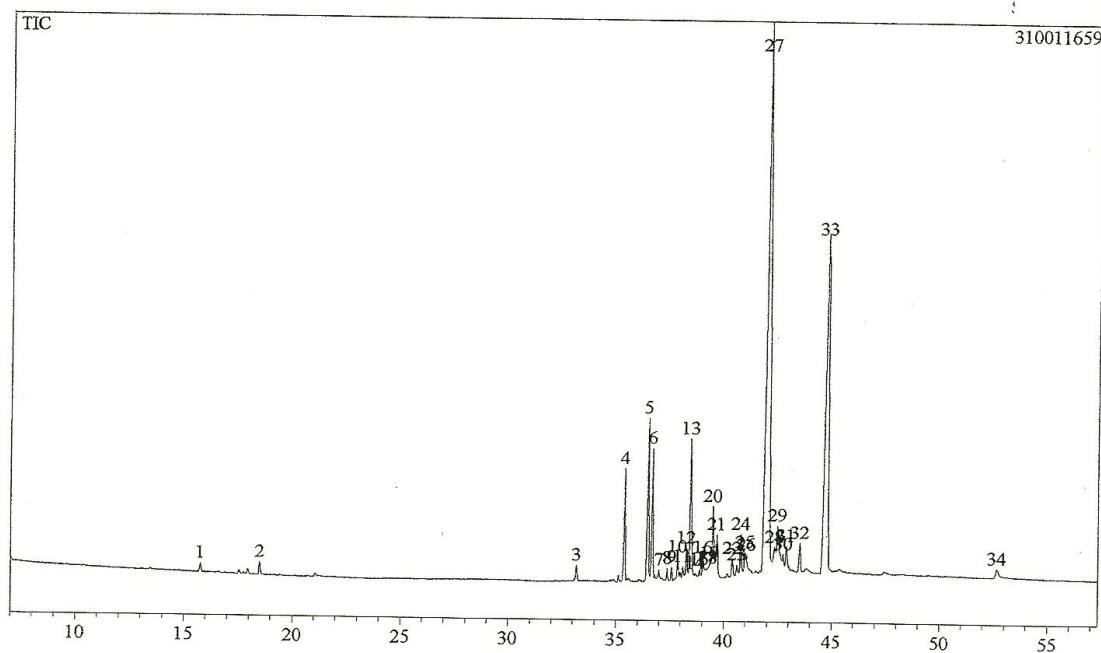
Anexo 1: Cromatograma do OE de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- α -pineno (2,53), 2- β -pineno (4,24), 3- β -mirceno (1,22), 4- limoneno (6,93), 9- β -cariofileno (3,23), 11- isocariofileno (1,21), 13- germacreno D (7,09), 14- germacreno B (7,62), 21- nerolidol (25,84), 23- espatulenol (13,14), 29- δ -cadinol (4,11).



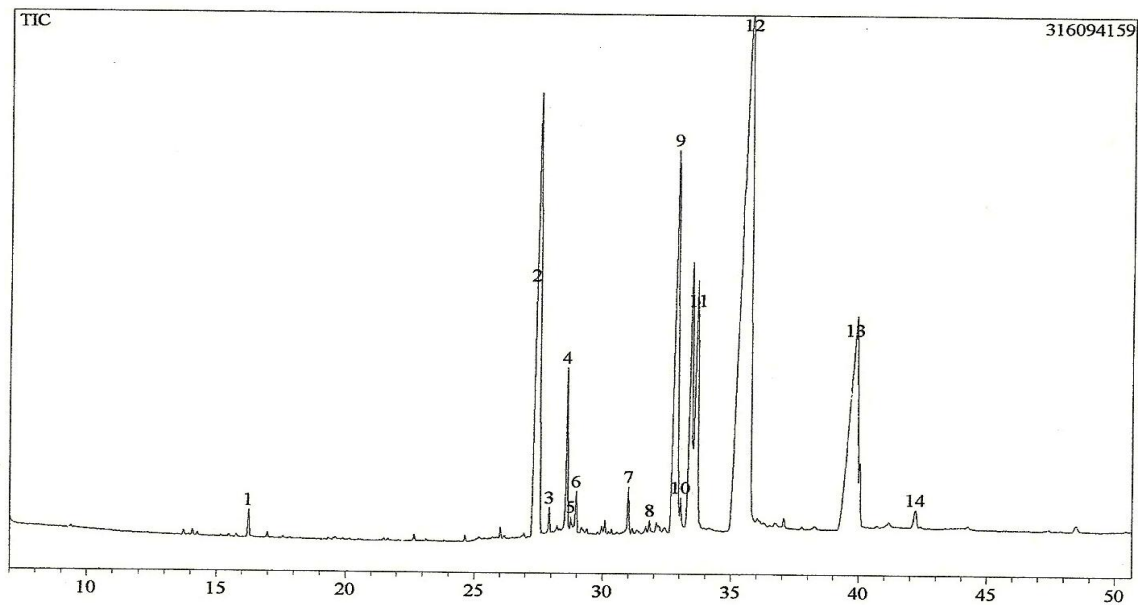
Anexo 2: Cromatograma do OE de *Caryophyllus aromaticus* (cravo da Índia) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- eugenol (75,85), 2- β -cariofileno (4,84), 3- α -humuleno (2,10), 4- acetato de eugenila (16,38).



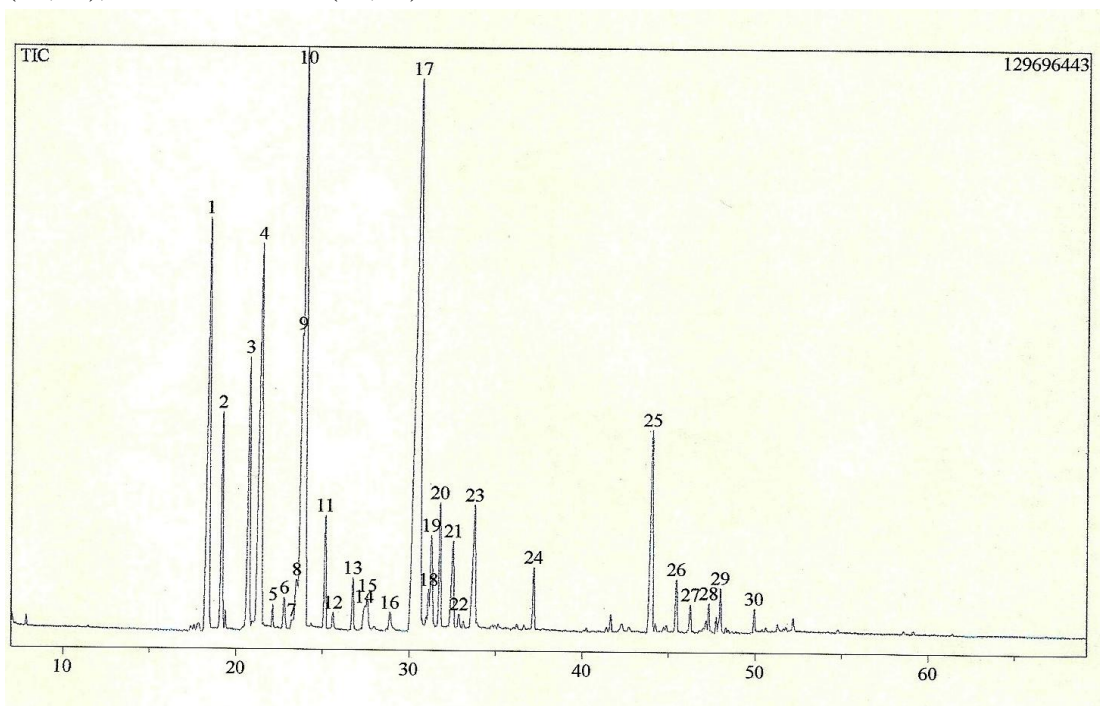
Anexo 3: Cromatograma do OE de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 3- α -pineno (0,38), 4- canfeno (0,18), 6- β -pineno (0,21), 7- limoneno (0,33), 8 - eucaliptol (1,19), 9- linalol (0,21), 11- borneol (0,23), 12- terpinen-4-ol (0,58), 13- α -terpineol (0,75), 15, 16, 17- cinamaldeído (86,31), 19- eugenol (0,23), 22- acetato de cinamila (4,83).



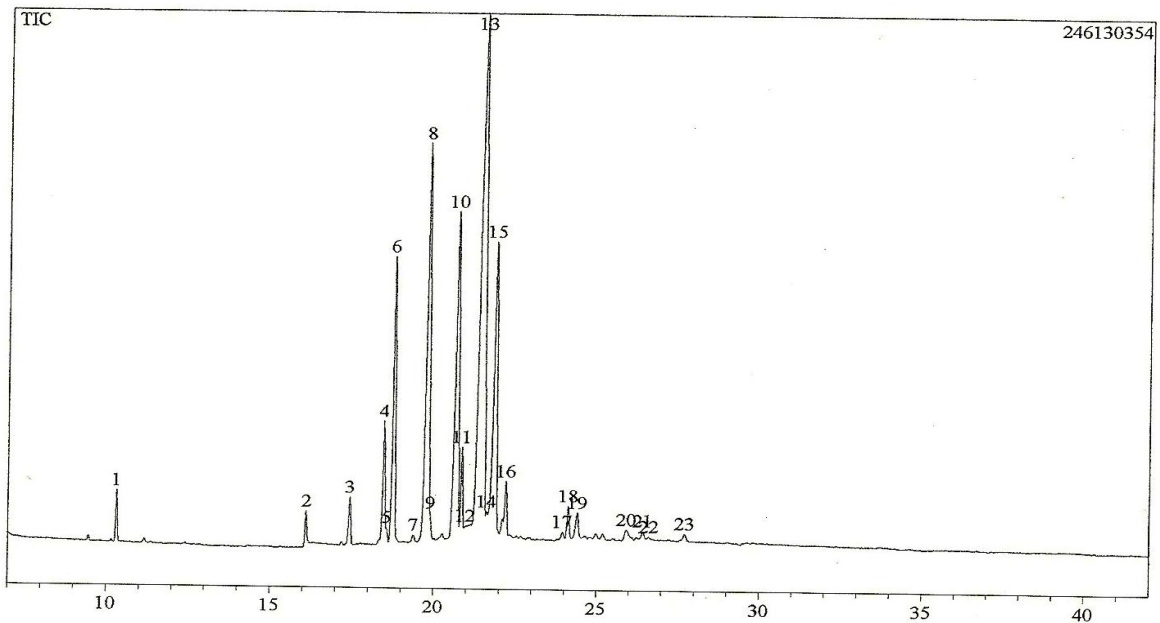
Anexo 4: Cromatograma do OE de *Eugenia uniflora* (pitanga) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- β -mirreno (0,28), 2- ocimeno (0,38), 3-terpinoleno (0,56), 4- β -elemeno (4,11), 5- β -cariofileno (6,51), 8- α -cariofileno (0,31), 23- espatulenol (0,50), 27 - selina 1,3,7 (11) trien-8-ona (30,10), 33- epóxido de selina 1,3,7 (11) trien-8-ona (21,89).



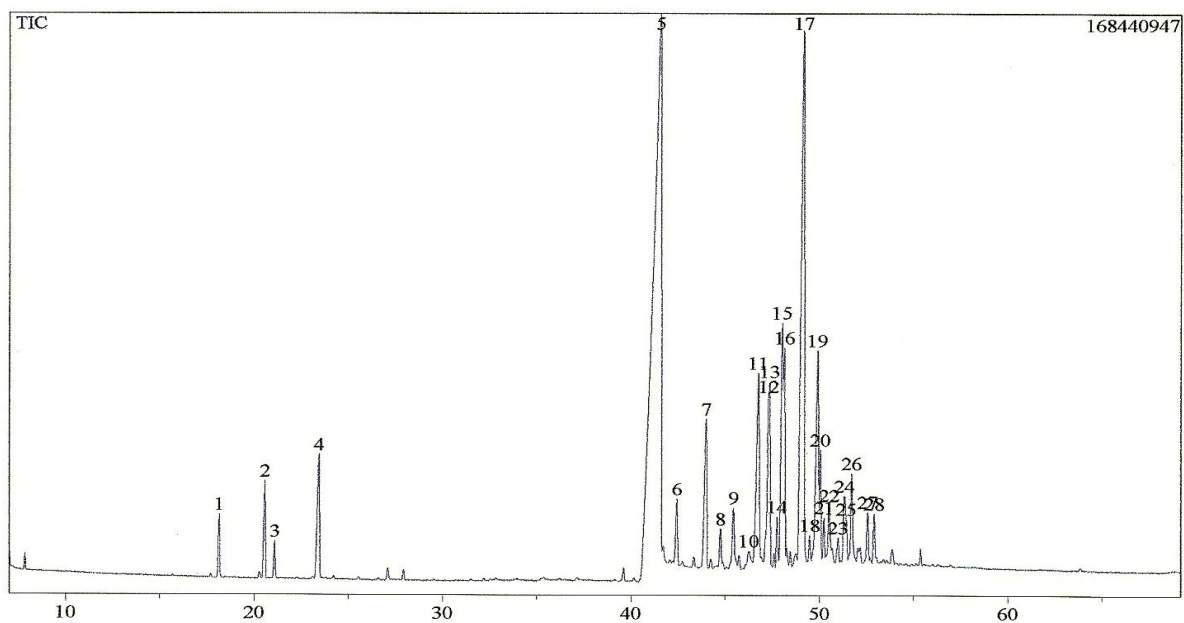
Anexo 5: Cromatograma do OE de *Matricaria recutita* (camomila) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- β -elemeno (0,38), 2- cariofileno (13,59), 4- α -farneseno (3,04), 5- azuleno (0,38), 6- germacreno (0,78), 7- espatulenol (0,80), 9- óxido de bisabolol (11,98), 11- α -bisabolol e óxido de bisabolona (15,71), 12- camazuleno (31,48).



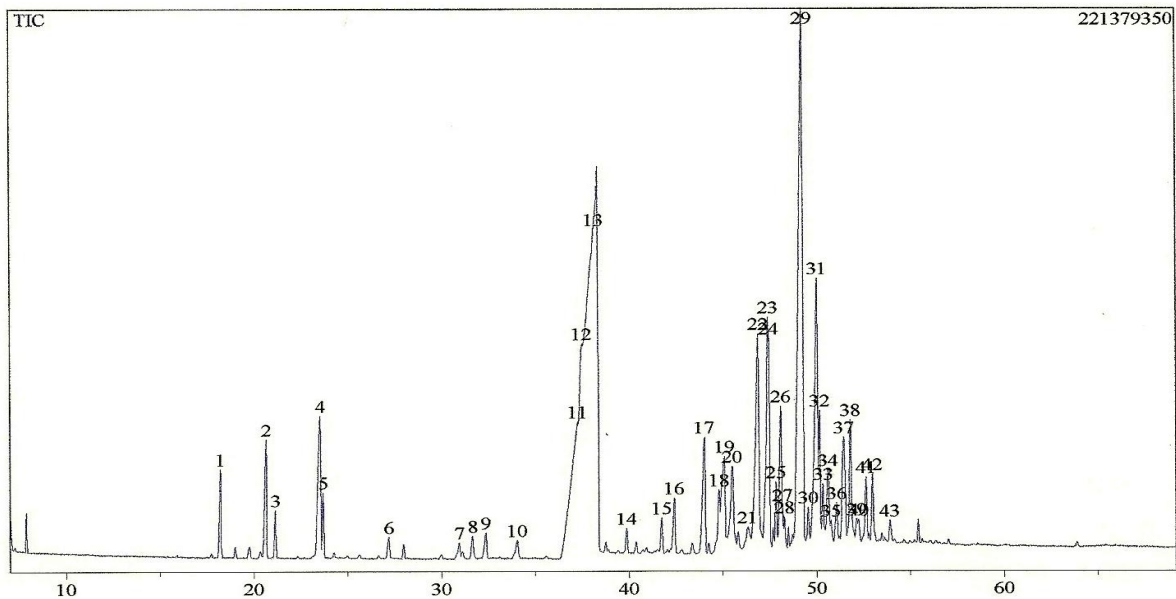
Anexo 6: Cromatograma do OE de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- α -pineno (10,37), 2- canfeno (3,64), 3- β -pineno (5,27), 4- mirceno (11,19), 5- α -felandreno (0,21), 10- limoneno (21,01), 11- γ -terpineno (1,71), 14, 15- linalol (1,15), 17- cânfora (27,51), 19- isoborneol (2,10), 23- verbenona (3,0), 25- 25- β -cariofileno (4,60).



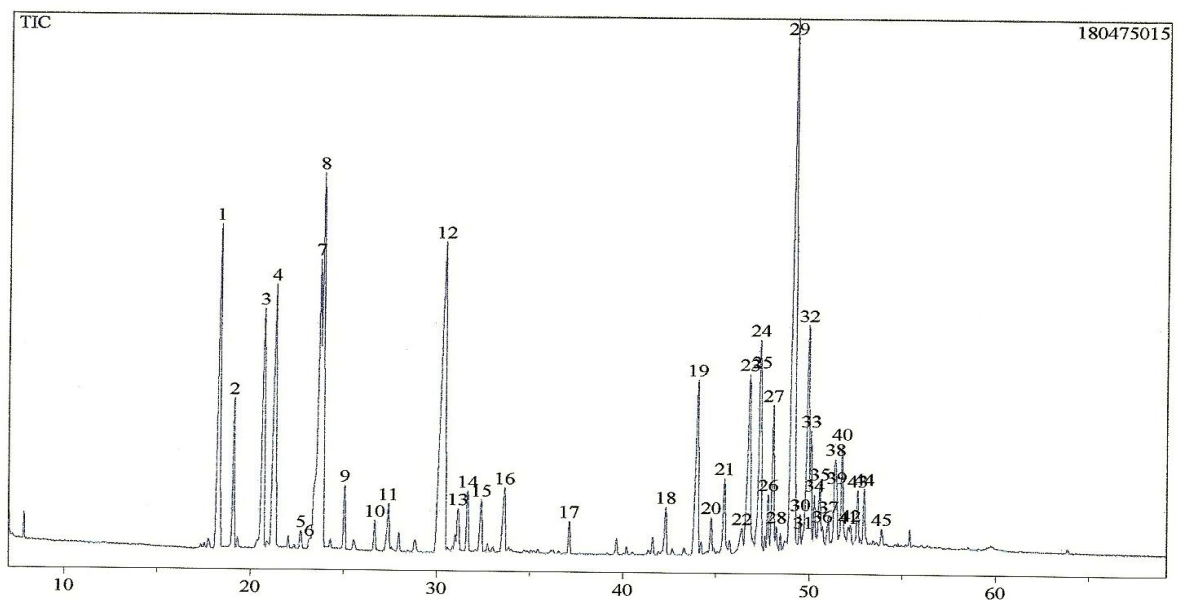
Anexo 7: Cromatograma do OE de *Vernonia polyanthes* (assa peixe) obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- β -pineno (0,96), 2- carvacrol (0,74), 4- copaeno (3,59), 6- elemeno (9,39), 8- ϵ -cariofileno (16,02), 10- α -cariofileno (14,34), 13- germacreno D (27,79), 15- germacreno B (15,01), 18- espatulenol (0,96), 20- δ -cadinol (0,52).



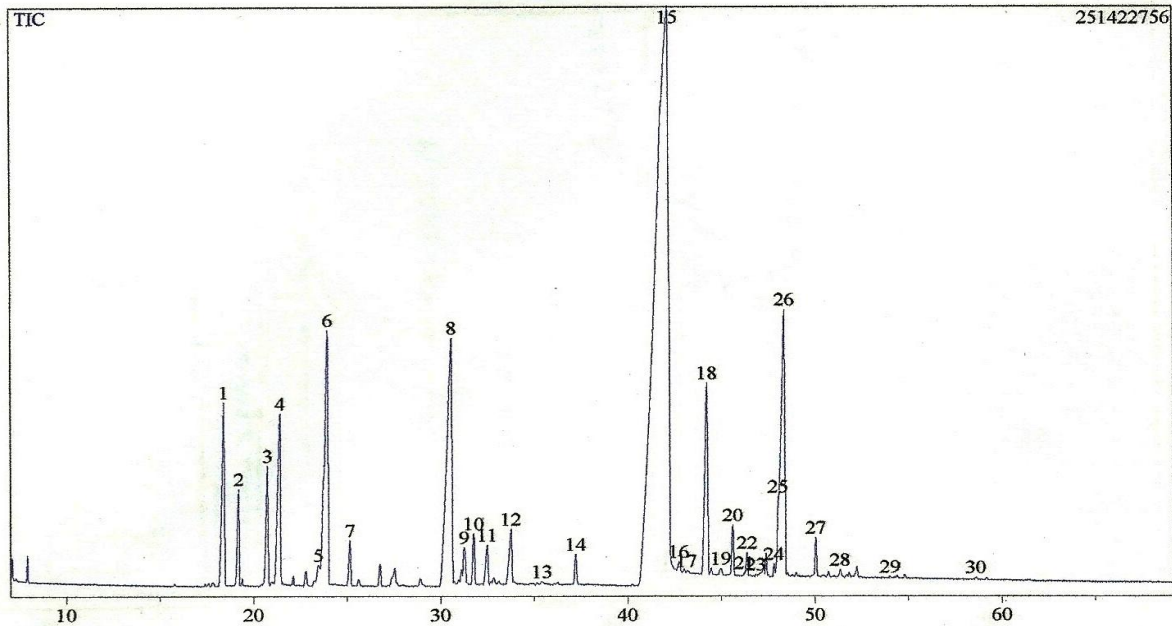
Anexo 8: Cromatograma da combinação entre os OE de *B. dracunculifolia* e *C. aromaticus* obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- α -pineno (0,77), 2- β -pineno (1,42), 3- β -mirceno (0,42), 4- limoneno (2,34), 5- eugenol (42,04), 7- β -cariofileno (2,91), 11- germacreno D (4,90), 13- germacreno B (4,66), 16- acetato de eugenila (3,47), 17- nerolidol (15,02), 19- espatulenol (5,11), 24- δ -cadinol (1,52).



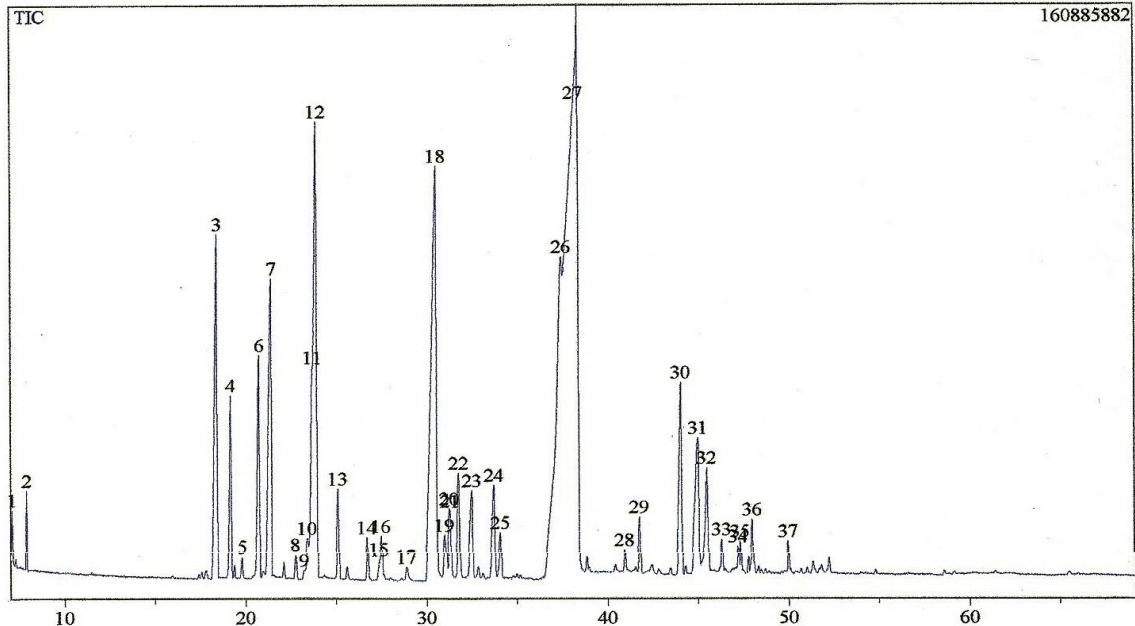
Anexo 9: Cromatograma da combinação entre os OE de *B. dracunculifolia* e *C. zeylanicum* obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- α -pineno (0,96), 2- β -pineno (1,59), 3- β -mirceno (0,45), 4- limoneno (2,64), 5- eucaliptol (0,55), 6- linalol (0,26), 7- borneol (0,22), 8- terpinen-4-ol (0,29), 9- α -terpineol (0,37), 11, 12, 13- cinamaldeído (40,25), 15- eugenol (0,38), 17- β -cariofileno (2,03), 19- acetato de cinamila (2,67), 22-germacreno D (5,05), 23- germacreno B (4,94), 29- nerolidol (13,21), 31- espatulenol (5,69), 37- δ -cadinol (2,21).



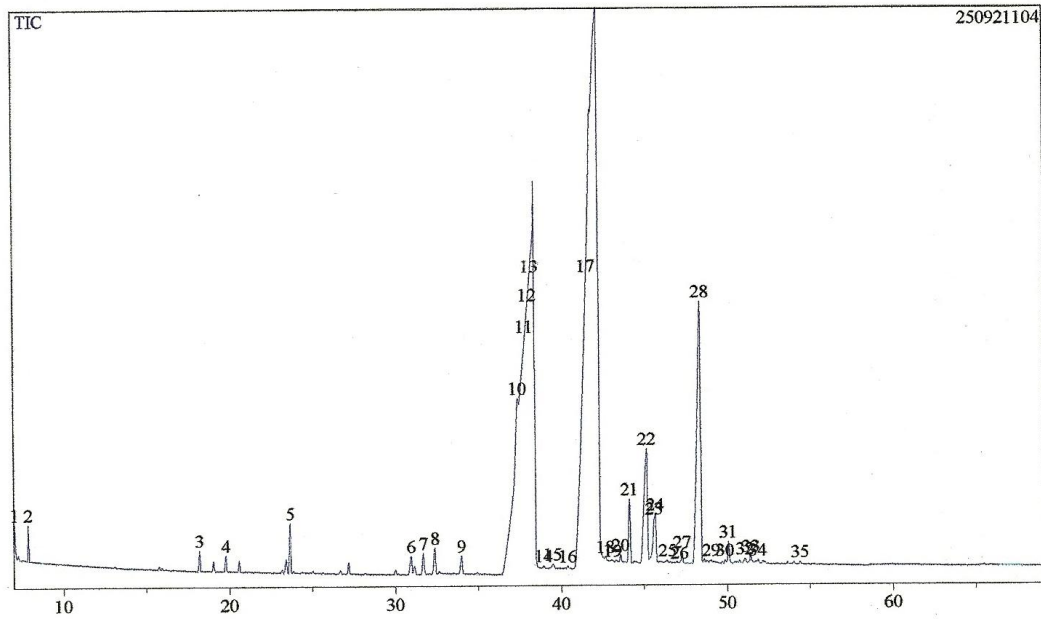
Anexo 10: cromatograma da combinação entre os OE de *B. dracunculifolia* e *R. officinalis* obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- α -pineno (6,75), 2- canfeno (1,95), 3- β -pineno (4,95), 4- mirceno (6,06), 8- limoneno (14,26), 9- δ -terpineno (0,74), 12- cânfora (11,88), 13- isoborneol (0,70), 16- verbenona (1,24), 19- β -cariofileno (3,88), 29- nerolidol (13,57), 32- espatulenol (4,71), 38- δ -cadinol (1,71).



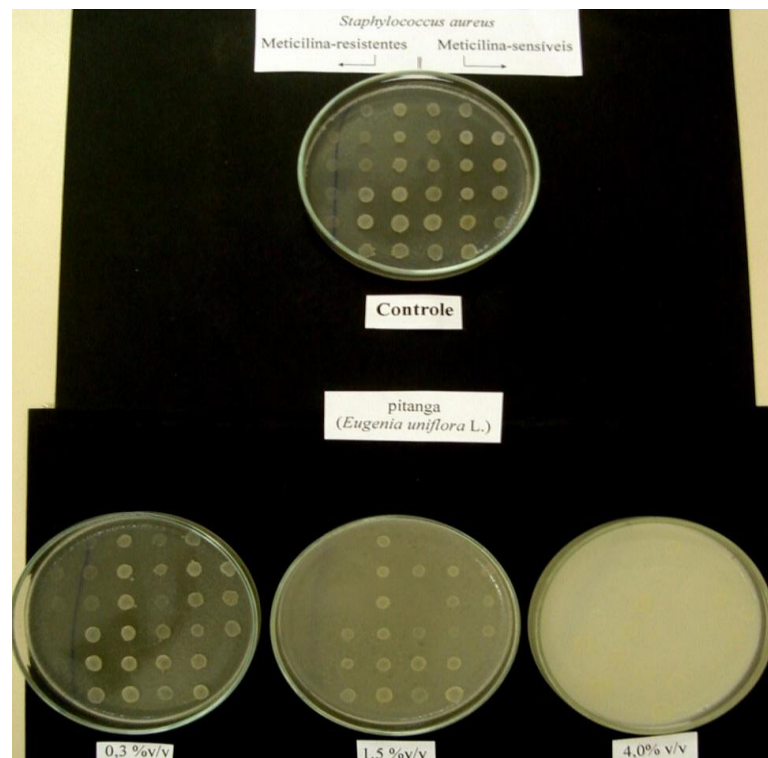
Anexo 11: cromatograma da combinação entre os OE de e *R. officinalis* e *C. aromaticus* obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 1- α -pineno (3,53), 3- β -pineno (1,96), 4- mirceno (3,90), 6- limoneno (6,84), 8- cânfora (9,68), 10- isoborneol (0,77), 12- verbenona (1,23), 15- eugenol (45,56), 18- β -cariofileno (43,35), 26- acetato de eugenila (48,77).



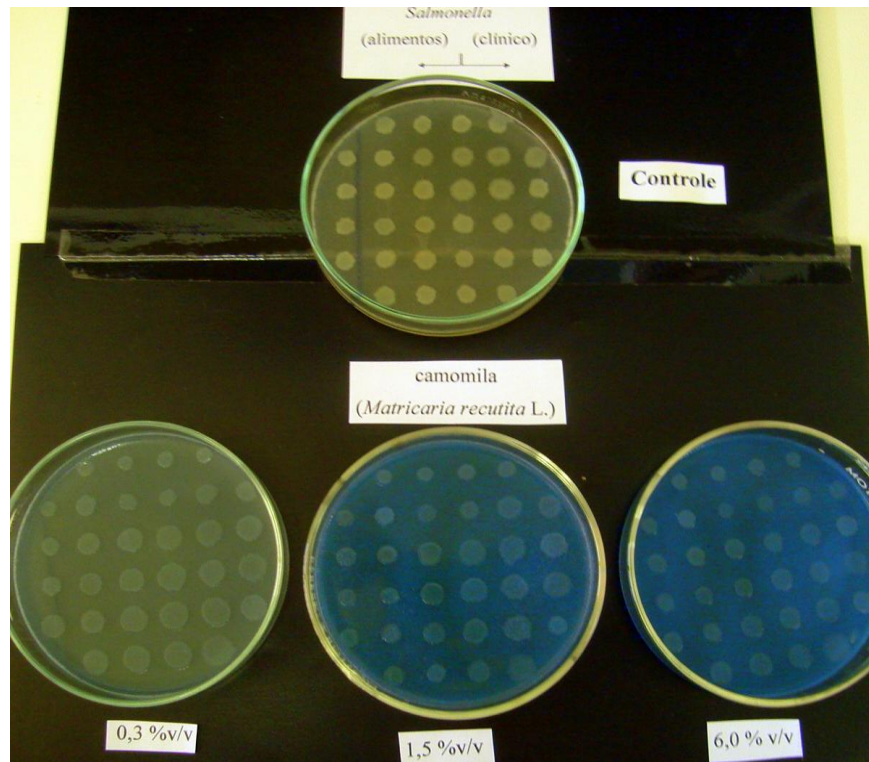
Anexo 12: Cromatograma da combinação entre os OE de e *R. officinalis* e *C. zeylanicum* obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 3- α -pineno (4,81), 4- cânfeno (1,75), 6- β -pineno (2,48), 7- mirceno (4,89), 12- limoneno (9,23), 18- cânfora (11,98), 20- isoborneol (0,58), 24- verbenona (1,32), 26, 27- cinamaldeído (46,87), 28- eugenol (0,15), 30 - β -cariofileno (2,59), 31- acetato de cinamila (2,95).



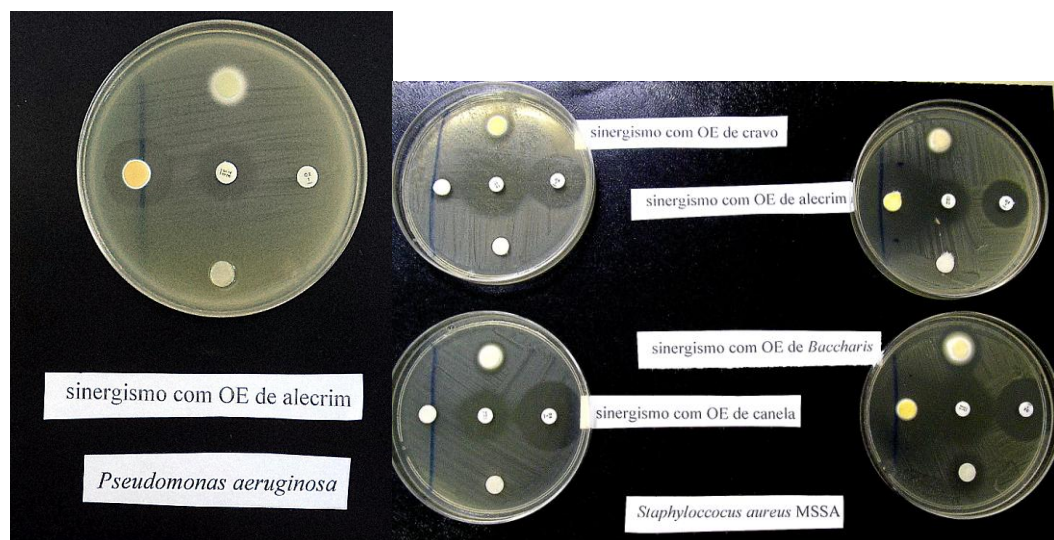
Anexo 13: cromatograma da combinação entre os OE de e *C. aromaticus* e *C. zeylanicum* obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). 3- α -pineno (0,16), 5- eucaliptol (0,49), 11, 12, 13- cinamaldeído (38,22), 17- eugenol (39,44), 21- β -cariofileno (1,30), 22- acetato de cinamila (3,96), 28- acetato de eugenila (7,80).



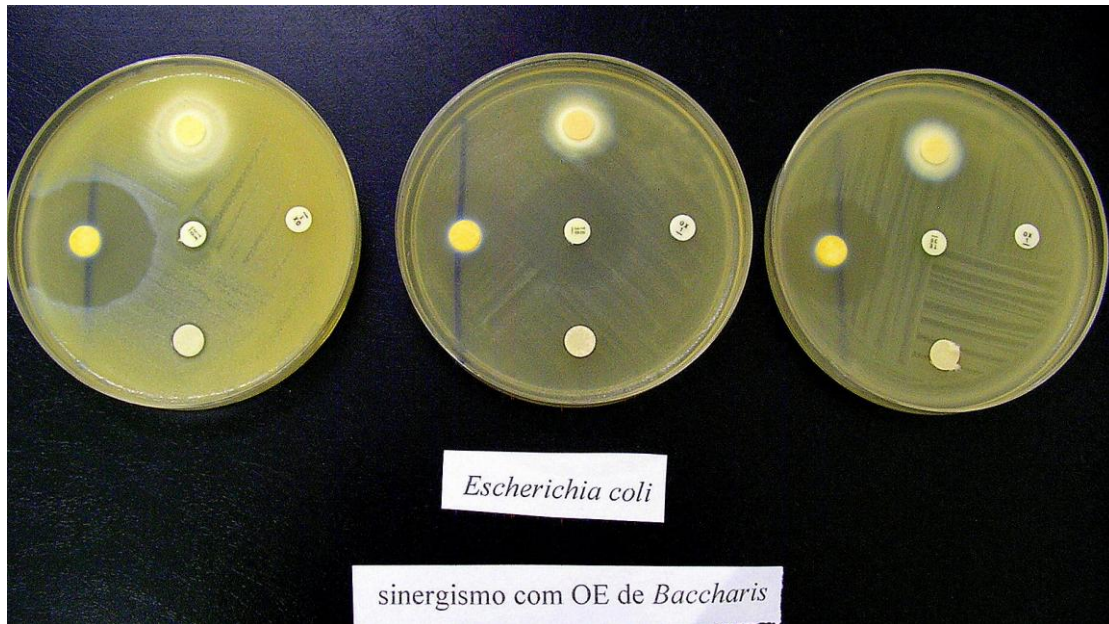
Anexo 14: Foto do ensaio para avaliação da concentração inibitória mínima do OE de *E. uniflora* frente *S. aureus*.



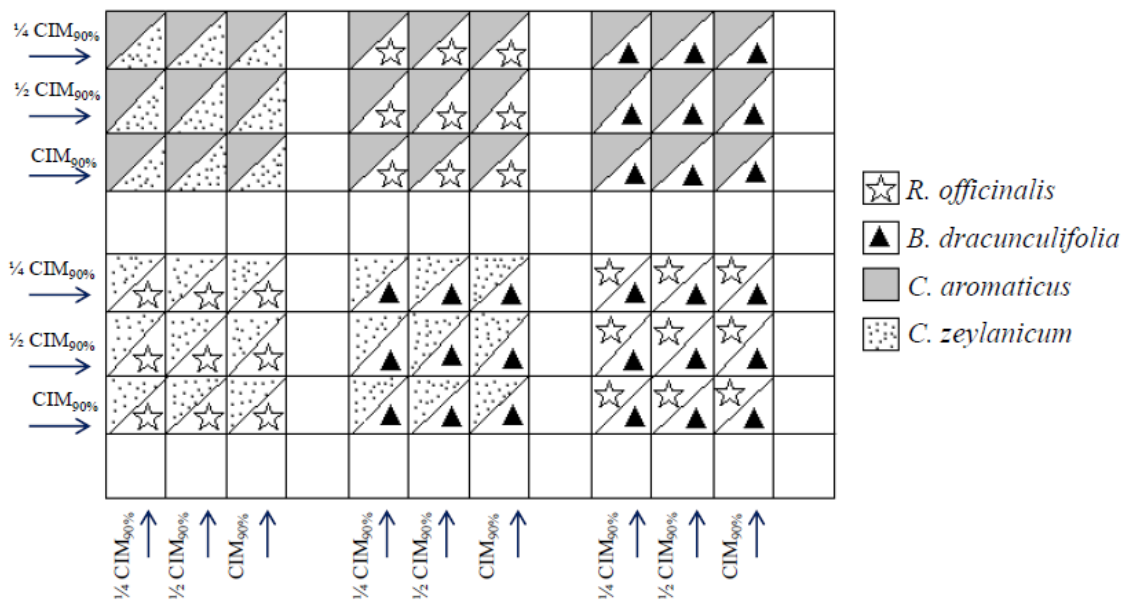
Anexo 15: Foto do ensaio para avaliação da concentração inibitória mínima do OE de *M. recutita* frente a *Salmonella* spp.



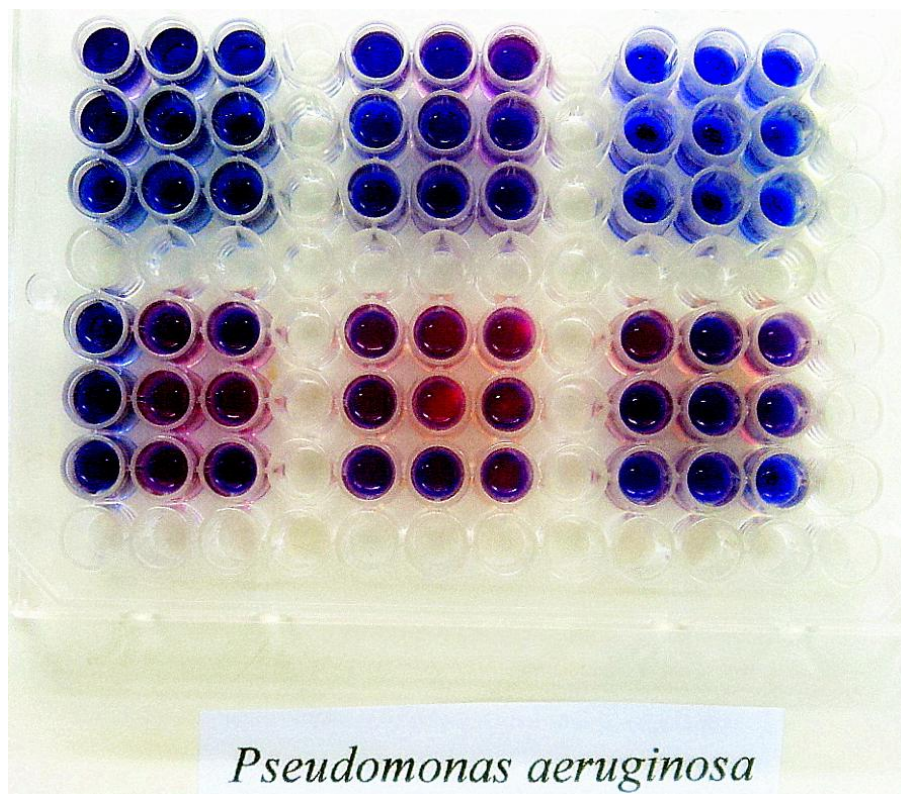
Anexo 16: Foto dos ensaios para verificação de sinergismo com o OE de *R. officinalis* frente a *P. aeruginosa* (esquerda) e com os OE de *B. dracunculifolia*, *C. aromaticus*, *C. zeylanicum* e *R. officinalis* frente a cepa MSSA (direita).



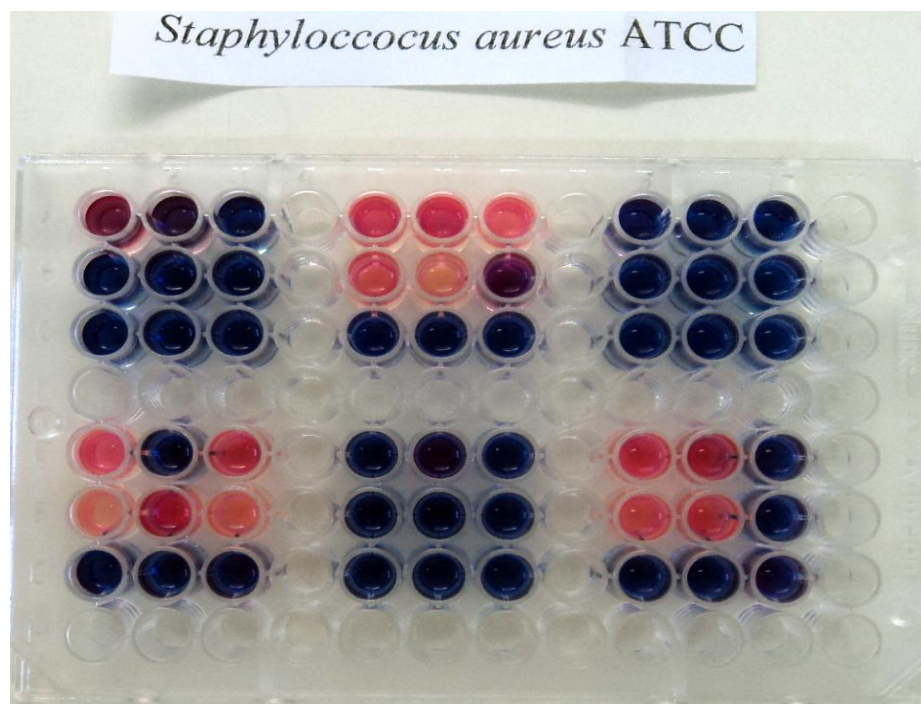
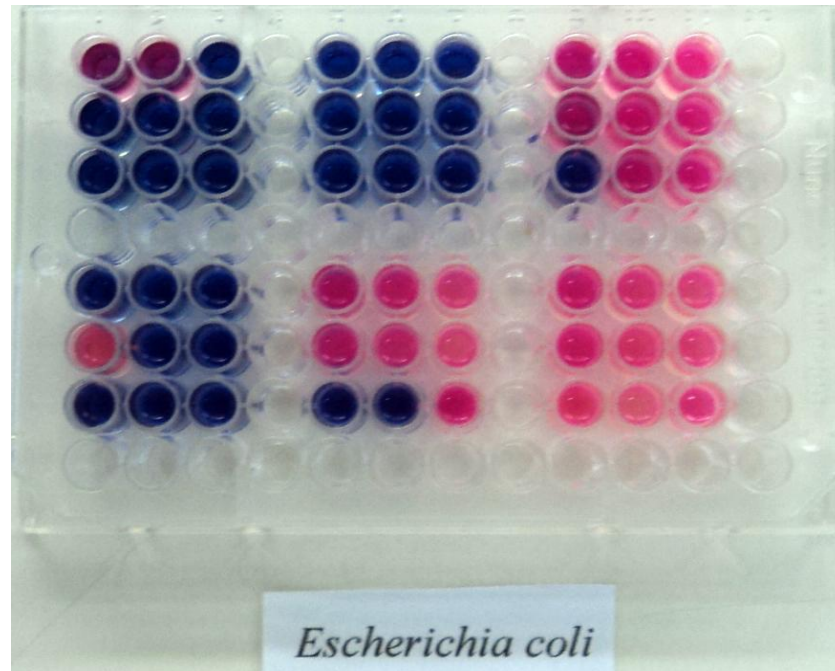
Anexo 17: Foto do ensaios para verificação de sinergismo com o OE de *B. dracunculifolia* frente a cepa *E. coli*. Observação: em todas as placas que não as do ensaio Controle (sem diluição de OE no Agar), a disposição dos discos, a partir da seta, segue: OE de *C. aromaticus*, oxacilina (OXA), OE de *B. dracunculifolia*, OE de *R. officinalis*, OE de *C. zeylanicum*, e ao centro, tetraciclina (TET).



Anexo 18: Diagramação dos ensaios para verificação do sinergismo entre os OE de *B. dracunculifolia*, *C. aromaticus*, *R. officinalis*, e *C. zeylanicum*, onde foram testadas 10 linhagens de *S aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* através da metodologia da microdiluição.



Anexo 19: Foto de placa do ensaio para cepa de *P. aeruginosa* S2693/10 antes de ser revelada com a resazurina (figura no alto), e depois de revelada, onde se observa o crescimento bacteriano (nos poços róseos – figura de baixo).



Anexo 20: Foto de placa do ensaio para cepa de *E. coli* EC9 (figura acima) e *S. aureus* ATCC 25923 (figura de baixo). A seguir, as leituras feitas para todas as cepas testadas.

Anexo 21. Planilha com resultados obtidos para *Staphylococcus aureus* nos ensaios de sinergismo utilizando a metodologia da diluição em microplacas de 96 poços.

		R1	R2	R3	R4	S1	S2	S3	S4	S5	ATCC
cravo 1	can 1	N	N	N	N	N		N	N	N	N
	can ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	can ¼	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ¼	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	bac 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	bac ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
cravo ½	can ¼	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	can ½	N	P	P	N	N	P	P	P	P	N
	can ¼	N	P	P	N	N	P	P	P	P	N
	ale 1	N	N	N	N	P	P	P	P	P	P
	ale ½	N	N	N	P	P	P	P	N	P	P
	ale ¼	N	N	N	P	P	P	P	P	P	P
	bac 1	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N
	bac ½	N	N	N	N	P	P	P	P	N	N
cravo ¼	bac ¼	N	N	N	N	P	P	P	P	N	N
	can 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	can ½	P	P	P	P	N	P	P	P	P	P
	can ¼	P	P	P	P	N	P	P	P	N	P
	ale 1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	ale ½	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	ale ¼	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac 1	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N
can 1	bac ½	N	N	N	N	P	P	P	P	N	N
	bac ¼	N	N	N	N	P	P	P	P	N	N
	ale 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ¼	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	bac 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
can ½	bac ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	bac ¼	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale 1	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	ale ½	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P
	ale ¼	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P
	bac 1	P	N	P	N	P	P	P	P	N	N
can ¼	bac ½	N	P	P	P	P	P	P	P	P	N
	bac ¼	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
	ale 1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	ale ½	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P
	ale ¼	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
	bac 1	P	N	P	N	P	P	P	P	N	N
ale 1	bac ½	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
	bac ¼	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
	bac 1	N	N	N	N	P	P	N	P	N	N
ale ½	bac ½	P	N	N	P	P	P	P	P	N	N
	bac ¼	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
	bac 1	P	N	N	P	P	P	P	P	N	P
ale ¼	bac ½	P	N	P	P	P	P	P	P	N	P
	bac ¼	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac 1	N	N	N	N	P	P	N	P	N	N

N – Ausência de crescimento, P – crescimento positivo, R1, R2, R3, R4 (MRSA), S1, S2, S3, S4 e S5 (MSSA),.ATCC 25923-linhagens testadas.

Anexo 22. Planilha com resultados obtidos para *Escherichia coli* nos ensaios de sinergismo utilizando a metodologia da diluição em microplacas de 96 poços

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	ATCC
cravo 1	can 1	N	N	N	N	N		N	N	N	N
	can ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	can ¼	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ¼	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	bac 1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac ½	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P
cravo ½	can 1	N	N	N	N	N		N	N	N	N
	can ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	can ¼	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ½	N	N	N	N	N		N	N	N	N
	ale ¼	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	bac 1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac ½	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
cravo ¼	can 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	can ½	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N
	can ¼	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N
	ale 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ¼	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	bac 1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac ½	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
can 1	ale 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ¼	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N
	bac 1	N	P	P	P	N	P	P	N	P	N
	bac ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
can ½	ale 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ¼	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N
	bac 1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac ½	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
can ¼	ale 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	ale ¼	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N
	bac 1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac ½	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
ale 1	bac ¼	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac 1	P	P	P	P	P	P	N	P	P	N
	bac ½	N	P	P	N	P	P	N	P	N	N
ale ½	bac ¼	N	N	P	N	P	P	P	N	N	N
	bac 1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac ½	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
ale ¼	bac ¼	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac 1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac ½	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

N – Ausência de crescimento, P – crescimento positivo, 1,2, 3, (....), ATCC 25922-linhagens testadas.

Anexo 23. Planilha com resultados obtidos para *Pseudomonas aeruginosa* nos ensaios de sinergismo utilizando a metodologia da diluição em microplacas de 96 poços

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	ATCC
cravo 1	can 1	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N
	can ½	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	can ¼	N	N	N	P	N	N	P	N	P	N
	ale 1	N	N	N	P	N	N	P	N	P	N
	ale ½	P	N	N	P	N	N	P	N	P	N
	ale ¼	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N
	bac 1	N	N	N	P	N	N	P	P	P	N
	bac ½	N	N	N	P	N	N	P	N	P	N
cravo ½	can 1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	can ½	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N
	can ¼	N	N	N	P	N	N	P	N	P	N
	ale 1	N	N	N	P	P	P	P	N	P	N
	ale ½	P	N	N	P	N	P	P	N	P	N
	ale ¼	N	N	N	P	N	N	P	N	P	N
	bac 1	P	N	N	P	N	N	P	N	P	N
	bac ½	N	N	N	P	N	N	P	N	P	N
cravo ¼	can 1	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N
	can ½	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N
	can ¼	N	N	N	P	N	P	P	N	P	N
	ale 1	N	N	N	P	P	P	P	N	P	P
	ale ½	P	N	N	P	N	P	P	N	P	P
	ale ¼	N	N	N	P	N	P	P	N	P	P
	bac 1	P	N	N	P	N	P	P	P	P	P
	bac ½	N	N	N	P	N	P	P	P	P	P
can 1	ale 1	P	N	N	P	P	N	P	N	N	P
	ale ½	P	N	N	P	P	N	P	N	P	P
	ale ¼	P	N	N	N	N	N	P	P	P	P
	bac 1	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P
	bac ½	P	N	N	P	P	P	P	P	P	P
can ½	ale 1	P	N	N	P	P	P	P	P	P	P
	ale ½	P	N	N	P	P	P	P	P	P	P
	ale ¼	P	P	P	P	N	P	P	P	P	P
	bac 1	P	N	P	N	P	P	P	P	P	P
	bac ½	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P
can ¼	ale 1	P	N	N	P	P	P	P	P	P	P
	ale ½	P	N	N	P	P	P	P	P	P	P
	ale ¼	P	P	P	P	N	P	P	P	P	P
	bac 1	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P
	bac ½	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P
ale 1	bac ¼	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac 1	P	P	P	P	N	P	P	N	P	P
	bac ½	P	P	P	P	N	P	P	P	P	P
ale ½	bac ¼	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac 1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac ½	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
ale ¼	bac 1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac ½	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	bac ¼	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

N – Ausência de crescimento, P – crescimento positivo, 1, 2, 3, 4, (...), ATCC 27853-linhagens testadas.