

Ana Rita Pinto Monteiro

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015.

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Ana Rita Pinto Monteiro

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015.

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Ana Rita Pinto Monteiro

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Trabalho apresentado à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção
do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

(Autora)

Resumo

Desde a descoberta dos microrganismos como agentes causadores de doenças no Homem que vários estudos foram levados a cabo com o objetivo de descobrir novas formas de os combater. A introdução de compostos com atividade antimicrobiana marcou uma nova era no combate a doenças o que permitiu a redução da mortalidade e morbidade, mas o seu consumo intensivo rapidamente conduziu ao aparecimento de resistências.

A falta de soluções perante a patogenicidade dos microrganismos impulsionou o estudo de novas alternativas. Os óleos essenciais que contêm uma variedade de compostos voláteis, como terpenos e fenóis, são conhecidos pelas suas propriedades anti – sépticas e medicinais, usados como antimicrobianos, analgésicos, sedativos e anti – inflamatórios. O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antimicrobiana de 20 óleos essenciais contra bactérias Gram – positivas e Gram – negativas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e leveduras do género *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 2209).

Abstract

Since the discovery of microorganisms as pathogenic for human beings several studies were lead with the aim of discovery news forms to stop them. The development of the antimicrobial drugs mark a new era on the combat to diseases which allow to reduce mortality and morbidity, but human misuse quickly caused an increase in antimicrobial resistance.

The lack of options for treatment leads to search new alternatives. Essential oils contain a variety of volatile molecules, such as terpenes and phenol, and are well known for their antiseptic and medicinal properties, use as antimicrobial, analgesics, sedatives and anti – inflammatory. The aim of this work was to determine the antimicrobial activity of 20 essential oils against positive Gram bacterias and negative Gram bacterias (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC 27853) and *Candida* type yeasts (*C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258 and *Candida parapsilosis* ATCC 2209).

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à minha família, em especial ao meu pai e à minha mãe, pelo apoio incondicional e constante incentivo que me deram a força e inspiração necessárias para ultrapassar e conquistar mais uma etapa da minha vida;

Aos meus colegas de curso e amigos pelo companheirismo e pela oportunidade de partilha de experiências que nos foram proporcionadas durante o nosso percurso acadêmico, repletas de bons e maus momentos que nos fizeram crescer, amadurecer e aprender;

À Professora Doutora Cristina Abreu, minha orientadora, e à professora Doutora Fátima Cerqueira, minha co – orientadora, por todo o apoio, compreensão e disponibilidade prestados durante a execução desta monografia e pela ajuda e orientação na realização da parte experimental do trabalho.

Índice

Resumo	i
Abstract	i
Agradecimentos	iii
Índice de figuras	vi
Índice de tabelas	vii
I. Introdução	1
1. Óleos Essenciais	1
i. Óleo essencial de Bergamota	8
ii. Óleo essencial de Camomila Selvagem e Camomila Azul	8
iii . Óleo essencial de Cedro	9
iv. Óleo essencial de Cravinho	9
v. Óleo essencial de Eucalipto.....	10
vi. Óleo essencial de Hortelã verde	10
vii. Óleo essencial de Lavanda	11
viii. Óleo essencial de Limão	11
ix. Óleo essencial de Niaouli.....	12
x. Óleo essencial de Orégão	12
xi. Óleo essencial de Palmarosa	12
xii. Óleo essencial de Pimenta negra.....	13
xiii. Óleo essencial de Pinho	13
ivx. Óleo essencial de Rosa.....	13
xv. Óleo essencial de Tangerina.....	14
xvi. Óleo essencial de Tomilho	14
xvii . Atividades biológicas dos óleos essenciais	15
2. Microbiologia: a ciência dos microrganismos	16
i. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
ii. <i>Escherichia coli</i>	21
iii. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
iv. Leveduras do género <i>Candida</i> spp.	25
II. Objetivos	30
III. Materiais e métodos	31

1. Materiais	31
i. Bactérias	31
ii. Leveduras	31
iii. Óleos essenciais	31
iv. Reagentes	32
2. Métodos	33
i. Diluição dos óleos essenciais	33
ii. Avaliação da atividade antibacteriana.....	33
iii. Avaliação da atividade antifúngica	34
iv. Avaliação da Concentração Mínima Letal	35
IV. Resultados	35
V. Discussão	38
VI. Conclusão	48
VII. Referências bibliográficas	49

Índice de figuras

Figura 1. Exposição das vantagens e desvantagens inerentes às técnicas de destilação. .	3
Figura 2. Ordem cronológica da descoberta dos antibióticos.....	17
Figura 3. Ordem cronológica da descoberta de moléculas com atividade antifúngica..	18

Índice de tabelas

Tabela 1. Principais constituintes dos óleos essenciais.	5
Tabela 2. Óleos essenciais utilizados e respetiva composição química, de acordo com a informação do fabricante que acompanha o óleo essencial.....	31
Tabela 3. Concentrações Mínimas Inibitórias para as três estirpes de bactérias analisadas.....	35
Tabela 4. Concentrações Mínimas Inibitórias para as três estirpes de leveduras analisadas.....	36
Tabela 5. Concentração Mínima Letal dos óleos essenciais para <i>Candida krusei</i>	37

I. Introdução

1. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais podem definir-se como misturas complexas, de baixo peso molecular, de compostos voláteis responsáveis pelas características odoríferas das plantas aromáticas. São compostos geralmente extraídos por destilação a vapor de água, praticamente insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos e gorduras. Estes encontram-se nos órgãos secretores de diversas partes da planta, como folhas, raízes e rizomas. Os óleos essenciais, e as plantas aromáticas de onde derivam, originam os fármacos aromáticos incluídos na farmacopeia portuguesa quando estes possuem propriedades farmacológicas para tal. São utilizados no tratamento de perturbações digestivas, bronco – respiratórias, como anestésicos, antissépticos e cicatrizantes (Cunha, *et al.*, 2010; Raut e Karuppayil, 2014).

As aplicações dos óleos essenciais são feitas sobretudo a nível da indústria alimentar para aumentar a durabilidade dos alimentos; perfumes, saboaria e cosméticos; indústria farmacêutica e farmácia em preparações magistrais como adjuvante corretivo de sabor e odor em medicamentos destinados à administração oral ou como aromatizante no caso de uso externo. O uso dos óleos essenciais por parte da indústria alimentar, para aumentar a validade dos produtos alimentícios, tem aumentado graças à descrição de efeitos secundários dos conservantes sintéticos usados como antimicrobianos e antioxidantes. Outra área de uso emergente e promissor de aplicação dos óleos essenciais é a agricultura, na qual se projeta o uso destes compostos como repelentes de insetos, inseticidas ou moluscidas (Cunha, *et al.*, 2010; Teixeira, *et al.*, 2013; Raut e Karuppayil, 2014).

Segundo Batish, *et al.* (2008), o óleo essencial de eucalipto, cujo perfil cromatográfico apresenta mistura de compostos monoterpénicos e sesquiterpénicos, fenóis, éteres, óxidos, álcoois, aldeídos e cetonas, possui largo espectro de atividade contra fungos, bactérias e insetos e constitui uma alternativa de baixo custo e baixa toxicidade ambiental para controlo de infestações. A sua atividade pesticida deve-se a compostos como o 1,8 – cineol, ρ – cimeno, linalol, α – pineno e γ – terpeno. No

entanto, a volatilidade e a baixa solubilidade em água são obstáculos para o seu uso, motivo pelo qual ainda são precisos estudos para avaliar os aspetos económicos e a efetividade em condições ambientais.

Os processos de extração dos óleos essenciais vulgarmente utilizados são a hidrodestilação, a destilação a vapor, a extração por solvente orgânicos e a extração com fluídos supercríticos. Os diferentes métodos têm impacto não só no rendimento do processo, mas também na composição do óleo essencial, nomeadamente a concentração obtida para cada composto extraído e o seu grau de pureza (Wenqiang, *et al.*, 2007). Apesar de se encontrarem descritos vários métodos de extração, apenas serão abordados os processos de destilação e expressão, técnicas utilizadas para a obtenção dos óleos essenciais estudados.

A destilação permite a extração dos compostos voláteis utilizando água e/ou vapor de água para facilitar a libertação dos óleos das estruturas de origem. Os compostos voláteis arrastados pelo vapor de água após condensação constituem o óleo essencial, imiscível na fase aquosa. Distinguem-se três tipos de destilação (Cunha, *et al.*, 2010; Sefidkon, *et al.*, 2007):

- (i) destilação em água (hidrodestilação);
- (ii) destilação em água com arrastamento de vapor;
- (iii) destilação por arrastamento de vapor.

Na técnica de hidrodestilação, o material vegetal é colocado em contacto com a água e levado à ebulição. O vapor que é gerado arrasta consigo os compostos voláteis, que de seguida são recuperados por condensação. Após arrefecimento e como o óleo essencial é imiscível em água, ele é obtido por decantação. Na destilação por arrastamento de vapor, a planta ou parte dela é colocada numa câmara de destilação e o vapor produzido por um gerador independente é lançado sobre o produto, o que provoca a libertação do óleo dos órgãos da planta onde se encontra. A técnica de destilação em água com arrastamento de vapor é uma conjugação das duas técnicas anteriores. (Cunha, *et al.*, 2010; Sefidkon, *et al.*, 2007; Richter e Schellenberg, 2007).

A hidrodestilação é a técnica mais utilizadas em pequenas indústrias. Se por um lado a simplicidade, a versatilidade do equipamento e o baixo custo explicam o uso desta técnica, a baixa qualidade dos óleos essenciais compensa o investimento estrutural necessário na técnica de destilação por arrastamento de vapor, técnica utilizada na produção de óleos em grande escala (Cunha, *et al.*, 2010; Sefidkon, *et al.*, 2007). A figura 1 sintetiza os principais inconvenientes e vantagens das diferentes técnicas de extração por destilação dos óleos essenciais.

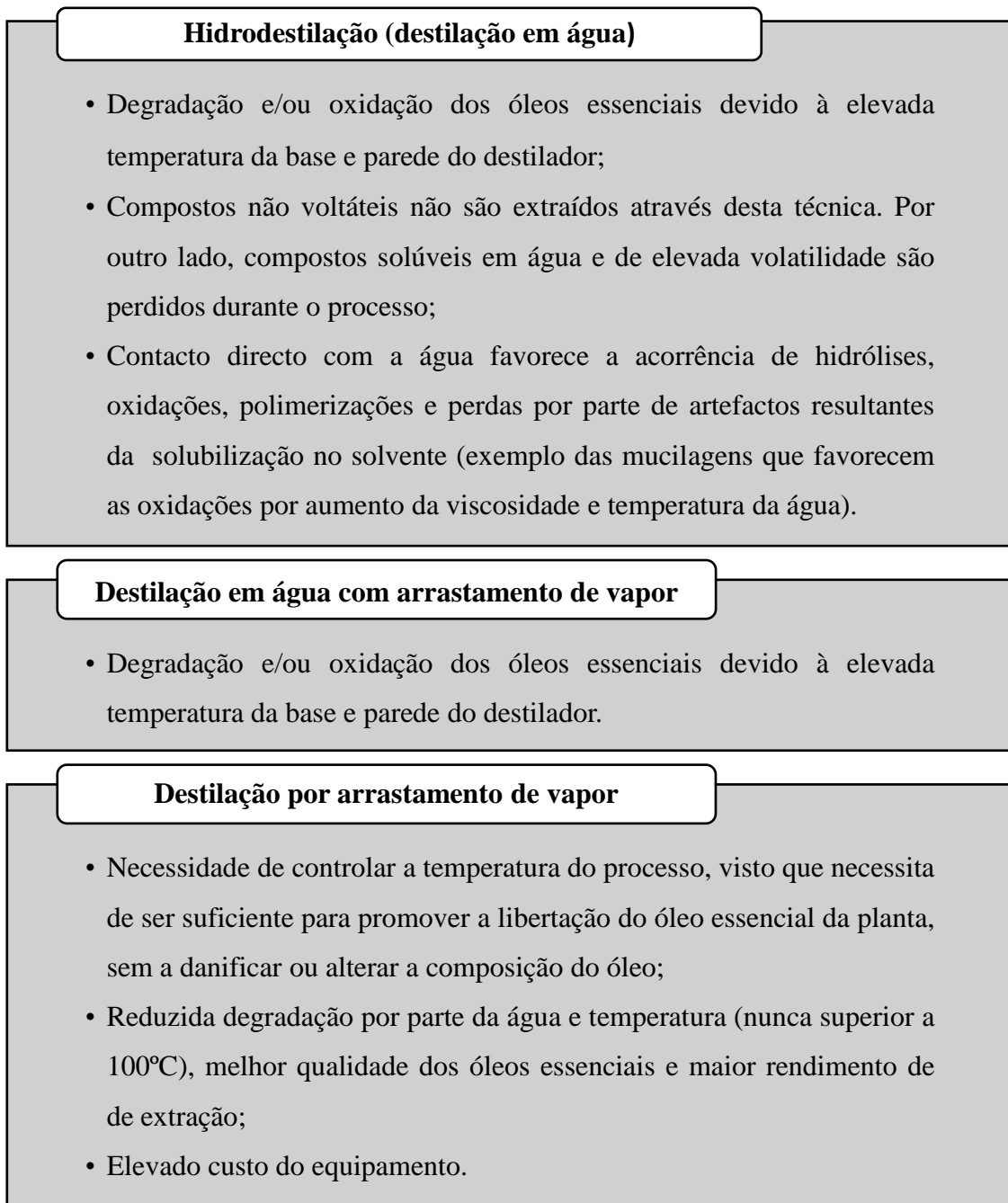


Figura 1. Exposição das vantagens e desvantagens inerentes às técnicas de destilação (Cunha, *et al.*, 2010; Sefidkon, *et al.*, 2007; Richter e Schellenberg, 2007).

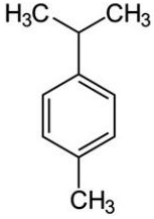
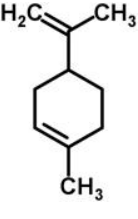
A expressão é uma técnica salvaguardada para a extração dos óleos essenciais dos frutos de *Citrus*. Dada a localização do óleo, este pode ser obtido por prensagem a frio do fruto e posterior centrifugação com separação das fases imiscíveis. Esta técnica é utilizada principalmente na perfumaria e aromaterapia (Cunha, *et al.*, 2010).

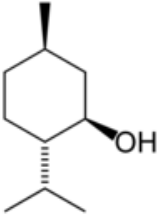
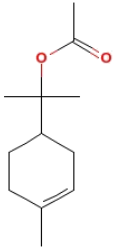
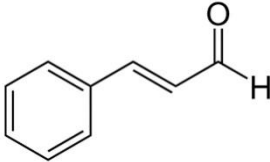
O aparecimento de estirpes de organismos patogênicos resistentes à terapêutica, o aumento da população de imunocomprometidos e a crescente falta de antimicrobianos eficazes são alguns dos fatores que motivaram o estudo e a caracterização das propriedades dos óleos essenciais (Raut e Karuppaiyil, 2014). Para o uso emergente dos medicamentos com plantas aromáticas ou óleos essenciais contribuíram a demonstração da qualidade dos produtos usados e dos métodos de preparação, a segurança relativamente a efeitos tóxicos, secundários, interações e contra – indicações e a eficácia demonstrada em ensaios farmacológicos e experimentação clínica (Cunha, *et al.*, 2012). A eficácia na inibição do desenvolvimento bacteriano, incluindo estirpes resistentes a antibióticos, leveduras e fungos filamentosos impulsionou o estudo da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Alguns óleos extraídos de plantas medicinais demonstraram potencial terapêutico no combate aos biofilmes, mecanismo de virulência produzido por microrganismos patogênicos, resistentes a antibióticos (Raut e Karuppaiyil, 2014; Galvão, *et al.*, 2012). A principal condicionante dos métodos de avaliação continua a ser a baixa solubilidade dos óleos essenciais em solventes aquosos, visto que estes são lipófilos (Cunha, *et al.*, 2012).

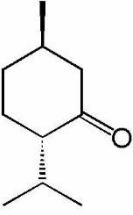
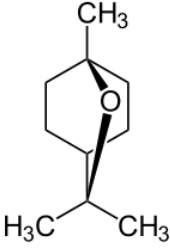
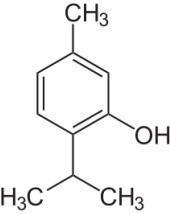
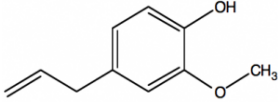
Normalmente, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais deve-se sobretudo à presença de álcoois, aldeídos e fenóis. No entanto, em alguns casos a sua atividade antimicrobiana ocorre graças ao sinergismo de diferentes classes de compostos encontrados na sua composição, como fenóis, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres e hidrocarbonetos (Bassolé e Juliani, 2012; Bakkali, *et al.*, 2008; Raut e Karuppaiyil, 2014).

A tabela 1 apresenta os principais constituintes dos óleos essenciais e os grupos em que estão inseridos. A sua composição condiciona a sua aplicabilidade e respetiva eficácia antimicrobiana, discutidas no decorrer da elaboração deste trabalho.

Tabela 1. Principais constituintes dos óleos essenciais.

Constituintes	Principais características	Referências
Hidrocarbonetos		
<p>Aromáticos</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - O mais comum nos óleos essenciais é o p – cimeno; - Contém anel benzênico (C₆H₆). 	<ul style="list-style-type: none"> - Cunha, <i>et al.</i>, 2010 - Cunha, <i>et al.</i>, 2012
<p>Terpênicos</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Maioritariamente monoterpênicos (10 átomos de carbono); sesquiterpênicos (15 átomos de carbono) e raramente diterpênicos (20 átomos de carbono); - Monoterpenos (ponto de ebulição 140 – 180°C) e os sesquiterpenos (ponto de ebulição 160 – 200°C) são líquidos incolores ou com coloração ténue e aroma forte; - Monoterpenos constituem cerca de 90% da composição dos óleos essenciais e incluem derivados funcionais como álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas e fenóis; - Provocam sensibilização cutânea devido à facilidade de oxidação dos óleos essenciais; - Monoterpênicos apresentam atividade antisséptica e ação revulsiva; - Compostos azulênicos de estrutura sesquiterpênica têm atividade anti – inflamatória; - Exemplo de compostos: α – terpineno, terpinoleno, limoneno, β – felandreno, α – tuieno, α, β – pineno, β – mirceno, canfeno, α – careno, entre outros. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cunha, <i>et al.</i>, 2010 - Cunha, <i>et al.</i>, 2012 - Bakkali, <i>et al.</i>, 2008 -Raut e Karuppayil, 2014

Álcoois e ésteres		
<p>Álcoois</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Distinguem-se álcoois aromáticos (feniletílico e benzílico); de natureza terpénica (geraniol e linalol); monocíclicos (mentol com maior aplicação na farmácia); bicíclicos (borneol) e sesquiterpénicos (farnesol, nerolidol, eudesmol e globulol); - Monoterpénicos são compostos anti – infecciosos, imunoestimulantes e de atividade neurotónica, apresentando, quando comparados os fenóis, menor hepatotoxicidade e dermocausticidade. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cunha, <i>et al.</i>, 2010 - Cunha, <i>et al.</i>, 2012 - Bakkali, <i>et al.</i>, 2008 -Raut e Karuppayil, 2014
<p>Ésteres</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Derivados da esterificação dos álcoois por ácidos gordos. O principal constituinte é o acetato de terpenilo; - Atividade antiespasmódica, calmante, reequilibrante do sistema nervoso e descongestionante quando aplicados em peles inflamadas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cunha, <i>et al.</i>, 2010 - Cunha, <i>et al.</i>, 2012 - Bakkali, <i>et al.</i>, 2008 -Raut e Karuppayil, 2014
Aldeídos e cetonas		
<p>Aldeídos</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Destacam-se os saturados, aromáticos, associados aos álcoois e ácidos correspondentes (aldeído cinâmico), e os terpénicos; - Apresentam ação anti – inflamatória; - Destacam-se os seguintes compostos: <i>trans</i> – cinâmico, citronelal, geranial e citral. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cunha, <i>et al.</i>, 2010 - Cunha, <i>et al.</i>, 2012 - Bakkali, <i>et al.</i>, 2008 -Raut e Karuppayil, 2014

<p>Cetonas</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Apresentam cheiro desagradável; - São neurotóxicas; - Resistentes à metabolização e são excretadas na urina inalteradas; - Numeram-se os seguintes compostos: mentona, cânfora e a tuiona. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cunha, <i>et al.</i>, 2010 - Cunha, <i>et al.</i>, 2012 - Bakkali, <i>et al.</i>, 2008 -Raut e Karuppayil, 2014
Óxidos naturais monoterpênicos		
	<ul style="list-style-type: none"> - Destaca-se o 1,8 – cineol, também chamado de cineol ou eucaliptol; - O cineol é um líquido incolor, praticamente insolúvel em água, miscível com etanol e éter. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cunha, <i>et al.</i>, 2010 - Cunha, <i>et al.</i>, 2012 - Bakkali, <i>et al.</i>, 2008 -Raut e Karuppayil, 2014
Fenóis e éteres fenólicos		
 <p>(Timol)</p>  <p>(Eugenol)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Maioria apresenta núcleo do p – cimeno ou do proprilbenzeno; - Os mais abundantes são os monofenóis, destacando-se o timol presente nos óleos essenciais de muitas espécies. Os difenóis são pouco frequentes, encontrando-se o eugenol no cravinho; - Comportam-se com ácidos fracos; - Atividade antimicrobiana e imunoestimulante; - São tónicos em doses baixas e em doses elevadas e repetidas hepatotóxicos e irritantes para as mucosas. São também considerados dermocaústicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cunha, <i>et al.</i>, 2010 - Cunha, <i>et al.</i>, 2012 - Bakkali, <i>et al.</i>, 2008 -Raut e Karuppayil, 2014

i. Óleo essencial de Bergamota

O óleo essencial de bergamota (*Citrus bergamia*) é obtido por um processo mecânico de expressão dos frutos. É constituído maioritariamente por compostos voláteis, que assumem 93 a 96% da sua composição, e por uma pequena fração de compostos não voláteis. A parte volátil do óleo inclui monoterpenos, sesquiterpenos, monoterpenóis, aldeídos e ésteres: limoneno, linalol, acetato de linalilo, γ – terpineno e β – pineno. Na fração não volátil identifica-se o bergapteno, composto responsável pela fototoxicidade do óleo essencial (Cunha, *et al.*, 2012; Navarra, *et al.*, 2015).

É utilizado em aromaterapia nas massagens para reduzir a depressão e dores musculares, como antiespasmódico e estimulante do sistema imunitário. Na perfumaria a sua utilização é feita após eliminação do bergapteno, devido à sua fototoxicidade, podendo originar dermatites (Cunha, *et al.*, 2012; Navarra, *et al.*, 2015).

ii. Óleo essencial de Camomila Selvagem e Camomila Azul

O óleo essencial de camomila selvagem (*Ormenis multicaulis*), também denominado de camomila marroquina, é obtido das partes floridas por arrastamento pelo vapor de água, apresentando cor amarelo – pálida a amarelo. Tem como principais constituintes o α – pineno, borneol, álcool santolínico, cânfora e 1,8 – cineol. Apresenta propriedades bactericidas e parasiticidas, sendo utilizado como estimulante na depressão nervosa. É ainda utilizado no tratamento de eczemas e dermatites (Cunha, *et al.*, 2012).

Na composição do óleo essencial de camomila azul (*Matricaria recutita* L.), também conhecida por camomila alemã e camomila vulgar, destacam-se o α – bisabolol e os seus óxidos e o camazuleno. Na composição do óleo são ainda identificados compostos sesquiterpénicos em menor quantidade: *trans* – β – farneseno, α – farneseno e o β – eudesmol (Petronilho, *et al.*, 2011; Roby, *et al.*, 2013; Can, *et al.*, 2012).

A atividades farmacológicas do óleo essencial incluem ação antiespasmódica, antipruriginosa, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antioxidante. O α –

bisabolol é o composto responsável pela ação anti-inflamatória e antimicrobiana. Já o camazuleno apresenta apenas ação anti-inflamatória. O óleo tem ainda propriedades sedativas e nevrálgicas (Petronilho, *et al.*, 2011; Roby, *et al.*, 2013; Can, *et al.*, 2012; Cunha, *et al.*, 2012).

iii . Óleo essencial de Cedro

O óleo essencial de cedro (*Juniperus virginiana* L.) é obtido por destilação pelo vapor de água da madeira. Na sua composição identificam-se: α e β – cedreno, tuioipeno, cupareno, cedrol e widrol. O composto encontrado em maior quantidade é o cedrol (Cunha, *et. all*, 2012; Eller e Taylor, 2004).

Este óleo está indicado na aromaterapia para tratamento de afeções cutâneas como acne, eczemas e psoríase, no reumatismo, problemas osteoarticulares e em contusões. É ainda utilizado como repelente de insetos (Cunha, *et al.*, 2012).

iv. Óleo essencial de Cravinho

O óleo essencial de cravinho é obtido por arrastamento pelo vapor de água dos botões florais secos de *Syzygium aromaticum*. O principal constituinte deste óleo é o eugenol, seguido de hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos como o α – pineno, 1,8 – cineol e o limoneno (Cunha, *et al.*, 2012; Machado, *et al.*, 2012).

A sua principal função é estimular as secreções gástricas devido à elevada quantidade de eugenol. Apresenta atividade antimicrobiana. A nível externo pode ser usado como antisséptico nas inflamações da boca e faringe e em otites. Este óleo essencial é utilizado em medicina dentária como sedativo (Cunha, *et al.*, 2012; Machado, *et al.*, 2012).

v. Óleo essencial de Eucalipto

O óleo essencial de eucalipto pertence à família Myrtaceae que engloba cerca de 900 espécies e subespécies, como *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus radiata*, *Eucalyptus globulus*, entre outros. Os óleos essenciais desta família são ricos em 1,8 – cineol, α – pineno, limoneno e α – terpineol. Apresentam atividade antimicrobiana, principalmente o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, analgésica e anti – inflamatória. São usados no tratamento de gripes, constipações e outras afeções respiratórias como sinusites e rinites (Pereira, *et al.*, 2014; Kumar, *et al.*, 2012; Kim e Park, 2012).

A principal atividade descrita para óleo essencial de *Eucalyptus globulus* deve-se à sua atividade fluidificante, antisséptica e expetorante, sendo por isso utilizado nas afeções respiratórias (Cunha, *et al.*, 2012; Pereira, *et al.*, 2014). Estas propriedades estão intimamente ligadas à elevada quantidade de 1,8 – cineol. No entanto existem algumas precauções a ter em conta na utilização deste óleo. Ele não deve ser prescrito por via oral às grávidas, lactentes, crianças com idade inferior a 6 anos e em casos de alergias respiratórias, inflamações do trato gastrointestinal, vias biliares, hepatopatias ou epilepsia. Por ser considerado estimulante do citocromo P450 não deve ser administrado concomitantemente com outros medicamentos. Em tratamentos prolongados de rinites e sinusites pode ocorrer inibição da motilidade ciliar do epitélio respiratório e a nível tópico provoca dermatites de contacto (Cunha, *et al.*, 2012).

vi. Óleo essencial de Hortelã verde

O óleo essencial de hortelã verde (*Mentha spicata*) é obtido por destilação pelo vapor de água da parte aérea florida (Cunha, *et al.*, 2012). O seu perfil indica carvona e mentona como constituintes maioritários. Limoneno, 4 – terpineol e 1,8 – cineol podem ser encontrados em alguns óleos essenciais desta espécie (Kizil, *et al.*, 2010; Dhifi, *et al.*, 2011).

A sua aplicação terapêutica é confinada às bronquites em inalações e em fricções para dores musculares e reumáticas (Cunha, *et al.*, 2012). Possui atividade antisséptica, carminativa, antiespasmódica, diurética e estimulante das secreções gástricas (Cunha, *et*

al., 2012; Dhifi, *et al.*, 2011). Algumas espécies incluindo a *Mentha spicata* possuem atividade antioxidante e antimicrobiana. Estas atividades são exploradas na indústria alimentar para conservação dos alimentos (Kizil, *et al.*, 2010; Dhifi, *et al.*, 2011).

vii. Óleo essencial de Lavanda

O óleo essencial de lavanda ou alfazema (*Lavandula angustifolia* Miller) é obtido por arrastamento pelo vapor de água das partes aéreas floridas (Cunha, *et al.*, 2012). É constituído por linalol, acetato de linalilo, cineol, cânfora e borneol (Cunha, *et al.*, 2012; Danh, *et al.*, 2012).

Este óleo é usado na indústria farmacêutica, em perfumaria, graças à sua fragrância, e na aromaterapia. Em aromaterapia é utilizado como antitússico e calmante. É utilizado nas sinusites, bronquites e gripes por causa da sua atividade anti-inflamatória e como antiespasmódico em problemas digestivos. Externamente é ainda usado em massagens pela sua ação rubefaciente, como cicatrizante e antisséptico (Cunha, *et al.*, 2012; Danh, *et al.*, 2012).

viii. Óleo essencial de Limão

O óleo essencial de limão (*Citrus limon*) é obtido por expressão do pericarpo dos frutos do limoeiro (Cunha, *et al.*, 2012). Contém entre 85 – 99% de compostos voláteis na sua composição onde se identificam monoterpenos (limoneno), sesquiterpenos, aldeídos (cital), cetonas, álcoois (linalol) e ésteres. O composto identificado em maior quantidade é o limoneno (Espina, *et al.*, 2011; Fischer e Phillips, 2008).

É usado como broncolítico e digestivo em infusões. É ainda utilizado como aromatizante em bebidas, confeitaria e pastelaria. Apresenta também propriedades antimicrobianas (Cunha, *et al.*, 2012; Fischer e Phillips, 2008).

ix. Óleo essencial de Niaouli

O óleo essencial de niaouli (*Melaleuca qinquenervia*), assim como outras espécies *Melaleuca*, é constituído por 1,8 – cineol, terpin – 4 – ol, linalol, α – terpineno, α – pineno, α – terpineol e viridiflorol (Cunha, *et al.*, 2012; Padalia, *et al.*, 2015; Wheeler, 2006).

Apresenta atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e ainda atividade expetorante e antisséptica da laringe e vias urinárias. Como ação externa, em óleo fixo ou pomada friccionada sobre o peito, pode ser usado como descongestionante das vias respiratórias ou em massagens para dores musculares (Cunha, *et al.*, 2012; Padalia, *et al.*, 2015).

x. Óleo essencial de Orégão

O óleo essencial de orégão (*Origanum vulgare*) apresenta numerosos quimiotipos e por isso a sua composição não é concreta. Sabe-se que predominam os fenóis como o timol e o carvacrol, γ – terpineno, linalol e α – terpineol (Cunha, *et al.*, 2012; Vale – Silva, *et al.*, 2012).

É atribuída a este óleo atividade antimicrobiana. Apresenta ainda propriedades diuréticas, embora suaves, atividade anti – inflamatória e antioxidante. (Cunha, *et al.*, 2012; Vale – Silva, *et al.*, 2012).

xi. Óleo essencial de Palmarosa

A palmarosa (*Cymbopogon martini var. martini*) possui inúmeros quimiotipos sendo *motia* o de maior destaque (Cunha, *et al.*, 2012). O óleo de palmarosa possui na sua composição monoterpenos, sesquiterpenos e álcoois como o geraniol, farnesol, nerolidol, linalol, limoneno e o geranial (Kakaraparthi, *et al.*, 2015; Rao, *et al.*, 2005).

É utilizado pela indústria química para a obtenção de ésteres através do geraniol, como aromatizante e na formulação de perfumes. A nível terapêutico é utilizado pelas suas propriedades antissépticas, digestivas e tónicas (Cunha, *et al.*, 2012).

xii. Óleo essencial de Pimenta negra

O óleo essencial de pimenta negra (*Piper nigrum* L.) é obtido através da destilação pelo vapor de água dos frutos triturados (Cunha, *et al.*, 2012). Na composição deste óleo identificam-se os seguintes compostos: α – pineno, sabineno, β – pineno, limoneno e β – cariofileno (Cunha, *et al.*, 2012; Bagheri, *et al.* 2014).

Os seus usos restringem-se à aromaterapia em massagens para ativar a circulação e nas dores musculares e à indústria da perfumaria (Cunha, *et al.*, 2012). Possui atividade antioxidante (Bagheri, *et al.* 2014).

xiii. Óleo essencial de Pinho

Os óleos essenciais de pinho são extraídos das agulhas de diferentes espécies de *Pinus*, pertencentes à família Pinaceae. Os principais constituintes dos óleos essenciais são: α – pineno, β – pineno, canfeno, cariofileno, ácido cinâmico, terpinoleno, limoneno e acetato de bornilo (Cunha, *et al.*, 2012; Kupcinskiene, *et al.*, 2008; Kim, *et al.*, 2013).

O óleo essencial é utilizado em problemas brônquicos e em afeções bucais devido às suas propriedades antissépticas (Cunha, *et al.*, 2012).

ivx. Óleo essencial de Rosa

O óleo essencial de rosa (*Rosa spp.*), de preço elevado devido ao baixo rendimento de extração (são necessários cerca de 6000 kg de pétalas para obter 1 kg de óleo essencial), é obtido por destilação pelo vapor de água das pétalas (Cunha, *et al.*, 2012). A sua composição varia de acordo com a matéria – prima utilizada, mas compostos

como o citronelol, o geraniol, o neral, o linalol e o nonedecano são comuns aos óleos essenciais de rosa (Cunha, *et al.*, 2012; Karami, *et al.*, 2012).

O uso deste óleo é atribuído à perfumaria e cosmética por causa do seu agradável aroma. Em aromaterapia é usado no combate da depressão, náuseas, insónias e problemas dermatológicos (Cunha, *et al.*, 2012).

xv. Óleo essencial de Tangerina

No óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*) identificam-se os seguintes compostos: α – pineno, β – pineno, limoneno, citronelal, linalol, β – cariofileno, α – farneseno e o dodecanal (Cunha, *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2013).

O óleo essencial possui propriedades antissépticas, antiespasmódicas e sedativas no tratamento de problemas digestivos e na diminuição do *stress*. Apresenta ainda propriedades diuréticas e é utilizado para melhorar a circulação (Cunha, *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2013).

Os óleos essenciais utilizados foram o de tangerina e de tangerina destilada que são obtidos, respetivamente, por expressão sem aquecimento a partir do pericarpo fresco das cascas dos frutos e por destilação por vapor de água das folhas (Cunha, *et al.*, 2012).

xvi. Óleo essencial de Tomilho

O óleo essencial de tomilho (*Thymus spp*) é obtido por arrastamento pelo vapor de água das partes aéreas floridas (Cunha, *et al.*, 2012). O óleo essencial de tomilho é constituído maioritariamente pelo timol e pelo carvacrol. Identificam-se ainda o γ – terpineno, linalol e o ρ – cimeno (Cunha, *et al.*, 2012; Fachini-Queiroz, *et al.*, 2012; Jouki, *et al.*, 2014).

Possui ação antioxidante, antimicrobiana, antiespasmódica, expetorante o que justifica o seu uso nos problemas das vias respiratórias (gripes, catarros e bronquite) e

na tosse produtiva, e antisséptica. É utilizado a nível tópico em infecções cutâneas, dores reumáticas, otites, rinites, sinusites e dermatites (Cunha, *et al.*, 2012; Fachini-Queiroz, *et al.*, 2012; Jouki, *et al.*, 2014).

xvii . Atividades biológicas dos óleos essenciais

As atividades biológicas dos óleos essenciais englobam a citotoxicidade, fototoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade nuclear e citoplasmática e propriedades antimutagénicas (Bakkali, *et al.*, 2008).

A atividade citotóxica é o principal efeito que justifica a sua aplicação contra os fungos e bactérias. Este efeito encontra-se dependente não só da composição química dos óleos essenciais, nomeadamente teor em fenóis, aldeídos e álcoois, mas também do estado de divisão do organismo patogénico. Os óleos essenciais atuam por diferentes mecanismos, avaliados com recurso a diferentes técnicas *in vitro* e microscopia eletrónica (Bakkali, *et al.*, 2008). Por se tratar de compostos com elevado grau de lipofilia, atravessam a parede e a membrana celular o que provoca a sua permeabilização. Como consequência, nas bactérias observa-se perda de iões, redução do potencial da membrana, colapso da bomba de protões e perda de ATP. Os óleos essenciais podem também coagular o citoplasma e danificar os lípidos e proteínas, conduzindo à lise das células. Já nas células eucarióticas (fungos), os óleos provocam a despolarização da membrana da mitocôndria atuando nos canais de cálcio e outros canais iónicos o que reduz o pH. A redução do pH resulta no colapso da bomba de protões e perda de ATP, tal como nas bactérias. Afetam ainda a fluidez das membranas tornando-as permeáveis, o que permite perda de radicais, iões de cálcio proteínas o que resulta na morte da célula por necrose e apoptose (Bakkali, *et al.*, 2008; Raut e Karuppayil, 2014).

A fototoxicidade é atribuída a alguns óleos essenciais que contêm algumas moléculas fotoativas. Como exemplo apresenta-se o óleo de bergamota (*Citrus bergamia*) que contém psoralenos que se ligam ao DNA por ação da radiação ultravioleta (Bakkali, *et al.*, 2008).

A maioria dos óleos essenciais não apresenta atividade mutagénica (Bakkali, *et al.*, 2008). No entanto, a literatura descreve que a *Melaleuca quinquenervia* ativa secreções de estrógeno o que pode induzir cancro estrogénio – dependente e os que possuem compostos fotossensíveis podem produzir eritemas e induzir cancro da pele (Bakkali, *et al.*, 2008).

Relativamente às suas propriedades antimutagénicas estão documentados alguns mecanismos de ação como a inibição da penetração dos mutagénicos no interior das células; captação dos radicais livres produzidos ou mesmo ativação das enzimas antioxidantes por parte das células e inativação do metabolismo por parte do citocromo P450 que converte promutagénicos em mutagénicos (Bakkali, *et al.*, 2008; Raut e Karuppayil, 2014).

2. Microbiologia: a ciência dos microrganismos

A microbiologia, dos termos gregos *mikrós* (pequeno), *bios* (vida) e *logos* (ciência), é a ciência que estuda os seres vivos de dimensões microscópicas. O seu nascimento foi possível graças ao aparecimento do microscópio e o marco mais importante nesta área foi a descoberta de que os microrganismos são causadores de doenças no Homem e nos animais. A primeira demonstração direta dos microrganismos como agentes causadores de doenças foi responsabilidade de Robert Koch (1843 – 1910) que em 1876 publicou os primeiros estudos sobre *Bacillus anthracis* e em 1882 isolou o bacilo de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*). Os postulados de Koch, ainda hoje conhecidos, são um conjunto de medidas responsáveis por determinar se um microrganismo é causador de doença. Para isso:

- O microrganismo específico deve estar sempre associado a cada caso de doença;
- O mesmo microrganismo deve ser isolado a partir do animal doente;
- O microrganismo suspeito deve ser isolado e deve ser capaz de crescer em cultura pura, em laboratório;
- A inoculação daquela cultura deve ser capaz de produzir a mesma doença num animal suscetível (Ferreira e Fonseca, 2010).

Durante a década de 1940 os microrganismos começaram a ser um objeto fundamental de investigação, que ainda hoje se mantém, criando um aproximação entre a microbiologia e outras áreas principalmente no que diz respeito a sua ação causadora de doença, resposta imunitária do hospedeiro, metabolismo bacteriano e pesquisa de novas moléculas antimicrobianas (Ferreira e Fonseca, 2010).

A descoberta e identificação dos microrganismos como agentes patogénicos para o Homem impulsionaram a síntese de inúmeras moléculas com atividade antimicrobiana que reduziram a mortalidade e aumentaram a esperança média de vida no século XX (Fair e Tor, 2014). As figuras 2 e 3 apresentam de forma resumida o *timeline* da síntese e descoberta dos antibióticos e antifúngicos, respetivamente.

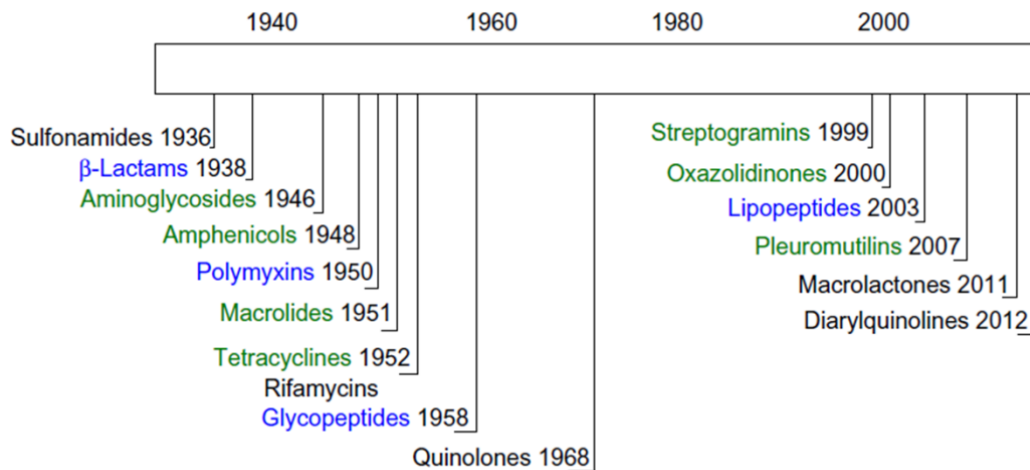


Figura 2. Ordem cronológica da descoberta dos antibióticos (Fair e Tor, 2014).

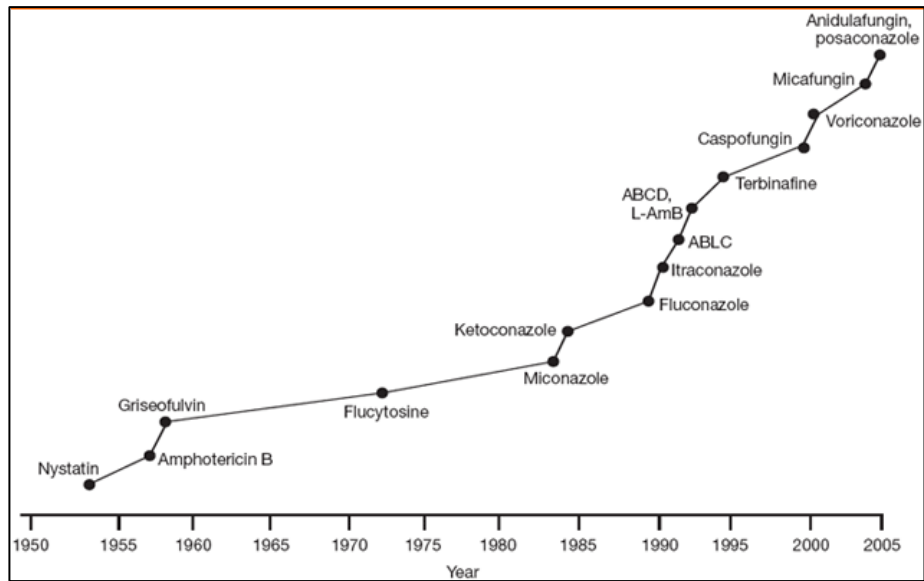


Figura 3. Ordem cronológica da descoberta de moléculas com atividade antifúngica. A sigla L-AmB corresponde à anfotericina B lipossomal; ABLC = complexo lipídico de anfotericina B; ABCD= dispersão coloidal de anfotericina B (Mohr, *et al.*, 2008).

Apesar da descoberta de vários antibióticos, a severidade das infecções bacterianas têm aumentado, principalmente devido ao aparecimento de estirpes resistentes à sua ação e pelo aumento da população imunocomprometida (Raut e Karuppaiyl, 2014). Nos últimos anos o consumo dos antibióticos em Portugal tem aumentado assim como a prevalência de resistências microbianas. (Ramalhinho, *et al.*, 2010; Direcção Geral de Saúde, 2014; Sardi, *et al.*, 2013).

Tanto os microrganismos da flora comensal como os considerados patogénicos apresentam um tropismo especial para determinados órgãos e tecidos, relacionado com estruturas de reconhecimento presentes nas células do hospedeiro e nos próprios microrganismos. As nossas barreiras fisiológicas protegem-nos da ação patogénica dos agentes vivos. A possibilidade das bactérias patogénicas se instalarem nos tecidos e mucosas do Homem é maior quando as barreiras físicas e químicas são ultrapassadas na fase de contacto. A sua entrada ocorre principalmente através das mucosas respiratórias, gastrointestinal, oral, genital e urinária e algumas desenvolvem inclusive estratégias que lhes confere capacidade de multiplicação e crescimento, escapando aos mecanismos de vigilância imunológica (Dourado, 2013).

A invasão e posterior colonização ocorrem devido a fatores característicos do hospedeiro, que facilitam a infecção, e mecanismos de virulência das próprias bactérias que serão explorados de forma mais pormenorizada aquando da descrição das bactérias estudadas. Fazem parte dos fatores característicos do hospedeiro a modificação da flora comensal; perturbação de movimentos ciliares de estruturas de proteção; diminuição absoluta dos neutrófilos/leucócitos e a sua alteração funcional; alteração do sistema complemento e deficiência da imunidade inata e/ou humoral. Nos fatores e mecanismos de virulência das bactérias destacam-se a adesão a células do hospedeiro; invasão celular e tecidual; libertação de produtos tóxicos durante o crescimento; endotoxinas e exotoxinas; enzimas; superantigénios; indução de reação inflamatória exacerbada; fuga à fagocitose e vigilância imunológica e resistência aos antibióticos (Dourado, 2013).

i. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria de Gram-positivo que faz parte da flora comensal do Homem, habitando sobretudo a narina e o períneo. O seu nome deriva dos termos gregos *Staphylé* (cacho de uvas) e *Kokkos* (grânulo), devido às suas características morfológicas. São imóveis, anaeróbios facultativos, catalase positiva e oxidase negativa, crescem a temperaturas entre os 18° e 40°C e apresentam tolerabilidade a elevadas concentrações de sal. Outra característica que os distingue dos restantes *Staphylococcus* é a sua capacidade de coagular o plasma, devido à presença de uma proteína de ligação ao fibrinogénio (coagulase) (Lencastre e Miragaia, 2014). *S. aureus* é um patógeno muito perigoso graças à combinação da resistência aos antibióticos e dos seus fatores de virulência (Otto, 2010).

Os fatores de virulência desta bactéria incluem mecanismos de adesão, evasão e invasão. Quando o sistema imunológico do hospedeiro se encontra enfraquecido, eles são responsáveis por patologias clínicas graves que podem ser fatais, numerando-se as infeções da pele e tecidos moles, bacteriemias, endocardite, pneumonias, osteomielites e artrite séptica (Otto, 2010; Lencastre e Miragaia, 2014).

Os fatores de adesão são responsáveis pela promoção da ligação das bactérias às células do hospedeiro; os de evasão interferem com a fagocitose ou com outras defesas

do hospedeiro e os de invasão atacam as suas células ou degradam as matrizes extracelulares (Lencastre e Miragaia, 2014; Foster, 2004; Foster e Höök, 1998).

Os fatores de virulência responsáveis pela adesão englobam proteínas geralmente ligadas à parede celular denominadas *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMM). As principais proteínas incluem os fatores de agregação que se ligam ao fibrinogénio e o convertem em fibrina (ClfA e ClfB); as proteínas de ligação ao fibrinogénio (FbpA e FbpB); proteínas de ligação à fibronectina (FnbA e FnbB); as proteínas de ligação ao colagénio (cna) e os exopolissacáridos PIA e PS/A envolvidos na produção do biofilme que facilita a adesão às células do hospedeiro. Para que ocorra infeção é necessário que a bactéria seja capaz de resistir às defesas do hospedeiro (Lencastre e Miragaia, 2014; Foster, 2004; Foster e Höök, 1998).

Nos fatores de virulência responsáveis pela evasão destacam-se a proteína A, proteases, lípases e superantigénios (Lencastre e Miragaia, 2014).

A proteína A encontra-se à superfície da maioria das estirpes de *S.aureus*. A sua função consiste na ligação à fração Fc dos anticorpos IgG, permitindo que as bactérias não sejam reconhecidas pelo sistema imunológico e, por consequência, escapem à opsonização. As proteases extracelulares bloqueiam a ação dos anticorpos IgG, lisam e inativam os péptidos antimicrobianos e, além disso, ainda são responsáveis pela destruição e invasão de tecidos e obtenção de nutrientes. As lípases funcionam como surfactantes da membrana celular bacteriana, protegendo assim a bactéria contra os compostos antibacterianos produzidos pelo hospedeiro (Lencastre e Miragaia, 2014). Os superantigénios bacterianos são compostos que se ligam simultaneamente ao Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC classe II) do hospedeiro e ao recetor da célula T (TCR). O MHC – II é responsável por apresentar péptidos resultantes do processamento por via endocítica aos linfócitos T. Este acontecimento conduz à ativação e proliferação inespecífica de populações de células T que libertam elevadas concentrações de citocinas pró - inflamatórias com consequente dano nos tecidos (Costa, 2014).

A enterotoxina F, também chamada de TSST – 1 (toxina associada à síndrome do choque tóxico), é um exemplo de superantígeno que estimula as células T do sistema imunológico e a liberação de citocinas, o que provoca o enfraquecimento das células endoteliais em baixa concentração e efeito citotóxico em elevadas concentrações. Esta toxina penetra facilmente as barreiras através de pequenas fissuras e causa efeito sistêmico (Otto, 2010; Foster, 2004; Lencastre e Miragaia, 2014). A morte associada a este síndrome é causada por choque hipovolêmico que provoca disfunção de múltiplos órgãos (Lencastre e Miragaia, 2014).

A invasão dos tecidos é conseguido através das toxinas citolíticas ou citotoxinas, toxinas esfoliativas (ETA e ETB) e pela TSST – 1 que provocam uma disfunção a nível dos tecidos. As toxinas citolíticas provocam danos a nível da membrana celular dos tecidos do hospedeiro, lise celular e a liberação de enzimas específicas que danificam os tecidos. (Lencastre e Miragaia, 2014). A alfa – toxina é a principal responsável pela virulência de *S. aureus* Apresenta capacidade para lisar macrófagos, eritrócitos e linfócitos (Otto, 2010).

ii. *Escherichia coli*

Escherichia coli, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é uma espécie com enorme importância clínica. Pode ser encontrada no meio ambiente e na flora comensal do Homem e dos animais. As bactérias desta família são caracterizadas como bacilos de Gram – negativo, imóveis ou móveis, anaeróbios facultativos, fermentadores da glucose e sem exigências nutricionais, crescendo bem em meios de cultura não seletivos. A separação dos géneros desta família é feita com base na capacidade de fermentação da lactose. As bactérias fermentadoras, como é o caso de *E. coli*, são denominadas de coliformes (Duarte, 2014; Mainil, 2013).

As estirpes podem ser divididas em três grupos: comensais, intestinais patogénicas e extraintestinais (Duarte, 2014).

As estirpes comensais habitam o trato gastrointestinal e a maioria é desprovida de fatores de virulência causando infecções oportunistas nos hospedeiros imunodeprimidos (Duarte, 2014).

As extraintestinais relacionam-se com duas patologias: infecções do trato urinário e meningites do recém – nascido. A bactéria responsável por estas patologias denomina-se de *E.coli* uropatogénica (UPEC) (Duarte, 2014; Wiles, *et al.*, 2008). Encontra-se associada a infecções hospitalares e é apontada como a causa primária de infecções do trato urinário adquiridas na comunidade (Wiles, *et al.*, 2008).

As estirpes intestinais patogénicas são classificadas de acordo com os fatores de virulência em *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxinogénica (ETEC) e *E. coli* entero - hemorrágica (EHEC). As manifestações clínicas variam de acordo com as características antigénicas e fatores de virulência específicos de cada estirpe (Duarte, 2014; Mainil, 2013).

E. coli enteropatogénica provoca diarreia em crianças com maior prevalência nos países em desenvolvimento. A diarreia aquosa deve-se à má absorção causada pela destruição das microvilosidades e alteração do citoesqueleto das células do intestino. A intimina, proteína da membrana, é o fator de colonização do enterócito no intestino delgado e a proteína Tir (*translocated intimin receptor*) é o seu recetor, responsável pela agregação da actina. Algumas *E. coli* deste tipo formam microcolónias à superfície do enterócito, onde o processo de aderência é mediado pelo fator de aderência EAF (*EPEC adherence factor*) associado a um plasmídeo (Duarte, 2014; Mainil, 2013).

E. coli enteroagregativa provoca diarreia persistente em crianças e adultos. A sua persistência no intestino delgado deve-se às fímbrias, permitindo a autoagregação ao enterócito, e à formação de biofilmes. Como consequência da formação de biofilmes ocorre a produção da toxina α – hemolisina citotóxica que é responsável pelo processo inflamatório e pela persistência do quadro clínico de diarreia aquosa com muco, febre e vómitos (Duarte, 2014; Mainil, 2013).

E. coli difusamente aderente apresenta dois fatores de virulência: adesina Afa/DR, associadas a infecções urinárias, e adesina AIDA – I (adesão difusa I) responsável pela diarreia nas crianças (Duarte, 2014).

E. coli enterotoxinogénica é o agente causador de diarreia nos países desenvolvidos que ocorre por consumo de alimentos contaminados. A colonização no intestino delgado é possível graças à intervenção das adesinas CFA/I, CFA/2 e CFA/3 que reconhecem recetores à superfície dos enterócitos. O quadro clínico é da responsabilidade de duas toxinas, que juntas provocam um agravamento do mesmo. A exotoxina termolábil ativa a adenilciclase que provoca um aumento intracelular da adenosina monofosfato cíclico (AMPC). Como consequência há uma alteração da permeabilidade da membrana, com secreção de eletrólitos e água, e decréscimo da absorção de cloro e sódio. Esta toxina é antigénica e induz a produção de anticorpos neutralizantes aquando da exposição, conferindo imunidade contra posteriores contaminações. Por este motivo esta estirpe está associada à diarreia do viajante. A exotoxina termoestável aumenta os níveis de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) que provoca a saída de fluídos através dos enterócitos (Duarte, 2014; Mainil, 2013).

E. coli enteroinvasiva contém uma proteína imunogénica denominada de invasina que promove a invasão do enterócito. As manifestações clínicas são diarreia aquosa que pode evoluir para disenteria, com fezes sanguinolentas e leucócitos, febre e dores abdominais por consequente invasão das células adjacentes (Duarte, 2014; Mainil, 2013).

E. coli entero – hemorrágica é responsável pela colite entero – hemorrágica, forma severa de diarreia, que nas crianças pode provocar insuficiência renal aguda ou síndrome hemolítica urémica. As lesões provocadas nos enterócitos acontecem de forma semelhante às EPEC e à produção da exotoxina denominada toxina Shiga. A shiga 1, produzida num bacteriófago, liga-se a um recetor nas vilosidades do enterócito que também podem ser encontrados no rim, o que justifica a patologia renal (Duarte, 2014; World Health Organization, 2011; Mainil, 2013).

iii. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas são bactérias de Gram – negativo, móveis e considerados aeróbios obrigatórios (Silva, 2014; Fair e Tor, 2014). Podem ser encontradas em plantas e ambientes húmidos, contaminando sabonetes, cosméticos, desinfetantes, piscinas e equipamento hospitalar. São, no geral, resistente a desinfetantes, antissépticos e antibióticos, o que dificulta o tratamento e potencia a disseminação em hospitais (Silva, 2014).

As manifestações clínicas englobam infecções hospitalares a nível respiratório, trato urinário, principalmente em indivíduos com cateteres, e feridas (Silva, 2014; Breidstein, *et al.* 2011). A septicemia é comum em indivíduos com diabetes *mellitus*, neutropénicos, doenças malignas hematológicas e queimados originando lesões necróticas na pele chamadas de *ecthyma gangrenosum*. A foliculite, otites externas, infecções da córnea, endocardite e pneumonias são exemplos de patologias adquiridas na comunidade (Silva, 2014).

Os fatores de virulência desta bactéria englobam proteínas e componentes estruturais da própria bactéria. Os pili facilitam a adesão da bactéria ao hospedeiro e às superfícies abióticas e intervêm no desenvolvimento do biofilme, tal como a cápsula que ainda inibe a fagocitose por parte dos macrófagos. As exotoxinas A e S e as proteases são substâncias citotóxicas que causam hemorragias e necrose dos tecidos. A fosfolípase C, uma hemolisina, é responsável pela hidrólise dos fosfolípidos da membrana celular, com conseqüente lesão tecidual (Silva, 2014; Breidstein, *et al.* 2011).

A resistência a antibióticos e a dificuldade de tratamento deve-se à presença de mecanismos de resistência presentes em várias estirpes, o que torna a prevenção fundamental. Destacam-se como mecanismos de resistência a diminuição da permeabilidade da membrana externa; as bombas de efluxo, que expulsam os compostos, e a produção de diferentes enzimas que inativam os antibióticos, como as β – lactamases responsáveis pela degradação dos antibióticos β – lactâmicos (Silva, 2014; Breidstein, *et al.* 2011; Fair e Tor, 2014).

iv. Leveduras do género *Candida* spp.

Os fungos são seres vivos com grande relevo na vida do Homem, quer seja pelos seus benefícios ou pela sua forma prejudicial. São prejudiciais em indivíduos imunocomprometidos e hospitalizados, uma vez que são capazes de causar doença (Sardi, *et al*, 2013). Por outro lado, são usados em processos industriais para obtenção de pão, cerveja, vinhos e determinados tipos de queijos e na produção de fármacos e ácidos orgânicos (Freitas, 2010).

A gravidade da doença é influenciada pelo estado imunológico do hospedeiro. Os fungos patogénicos primários possuem mecanismos de virulência capazes de provocar doença em indivíduos saudáveis. Esses mecanismos de virulência englobam o dimorfismo, a modulação da resposta imunológica do hospedeiro, a alteração da composição da parede, a produção de enzimas e o mimetismo molecular (Rodrigues e Vaz (a), 2014).

O dimorfismo é a capacidade que os fungos apresentam de crescer a 25°C em meios escassos em nutrientes na forma filamentosa com hifas septadas e a 37°C como fungos unicelulares, dependendo de fatores como tensão de CO₂, pH, concentração de nutrientes, entre outros (Rodrigues e Vaz (a), 2014; Mayer, *et al.*, 2013). A modulação da resposta imunológica é feita por intermédio do antígeno gp43, responsável pela adesão das leveduras à membrana basal do hospedeiro que se liga aos macrófagos provocando uma resposta de hipersensibilidade retardada, e da proteína WI – 1 que promove a adesão aos macrófagos. Em estirpes virulentas esta proteína encontra-se em baixas concentrações, permitindo ao microrganismo o escape aos macrófagos. A alteração da composição da parede confere resistência à fagocitose. As duas enzimas mais importantes na virulência são a urease e as proteases. A urease é responsável pela modulação do pH externo, uma vez que degrada a ureia em carbamato e amónia o que torna o pH alcalino e permite a sobrevivência do fungo. As proteases extracelulares, que abrangem um largo espectro de pH, permitem a invasão das células do hospedeiro por parte do microrganismo conduzindo à sua morte. O mimetismo celular é conseguido pela produção de substâncias idênticas às do hospedeiro, o que pode despoletar uma resposta autoimune (Rodrigues e Vaz (a), 2014; Mayer, *et al.*, 2013; Sardi, *et al.*, 2013).

Os fungos oportunistas apresentam três mecanismos principais de virulência: presença de adesinas que promovem a adesão do microrganismo às mucosas do hospedeiro e superfícies inertes, passo crucial para o processo de infecção; tigmotropismo que consiste na capacidade de transformação da forma de levedura para filamentosa, diferindo do dimorfismo porque as duas formas são encontradas simultaneamente nas mesmas condições fisiológicas; presença de cápsula que é um componente anti – fagocitário (Rodrigues e Vaz (a), 2014).

O género *Candida* spp. engloba muitas espécies que pertencem à flora normal do Homem, presentes habitualmente na mucosa oral, trato gastrointestinal e vagina. Mas a de maior prevalência é *Candida albicans*, responsável por micoses sistémicas e oportunistas (Silva, *et al.*, 2014; Sardi, *et al.*, 2013). Estima-se que mais de metade das infeções fúngicas invasivas sejam causadas por *Candida albicans*. Segundo Sardi, *et al.* (2013) o número de infeções nos países da Europa provocadas por *Candida parapsilosis* ronda os 7% e no caso de *Candida krusei* ronda os 2%.

A patogenicidade de *Candida albicans* depende dos seus fatores de virulência e de fatores do próprio hospedeiro. Os fatores de virulência fúngicos compreendem maioritariamente a sua capacidade de adesão e invasão das defesas do hospedeiro. Nos fatores do hospedeiro enquadram-se as afeções gerais como a diabetes, imunossupressão e estados de carência sobretudo de ferro e zinco e a terapia antimicrobiana que modifica a flora comensal bacteriana provocando a proliferação das leveduras (Silva, *et al.*, 2014; Mayer, *et al.*, 2013).

A patogenicidade de *Candida albicans* pode ser explicada graças a três mecanismos principais: adesão às células do hospedeiro; presença de enzimas degradativas e transição da forma de levedura para fungo filamentoso (Sardi, *et al.*, 2013; Mayer, *et al.*, 2013).

O reconhecimento de recetores no hospedeiro e posterior adesão é conseguido graças a fatores não específicos das leveduras, como as forças electroestáticas e hidrofóbicas, e pelas adesinas presentes na superfície dos fungos que reconhecem e são

capazes de estabelecer ligações com as proteínas, fibrinogénio e fibronectina. As adesinas estabelecem ligação a aminoácidos e açúcares presentes não só na superfície das células, mas também na superfície de estruturas abióticas. Esta capacidade de ligação a biomateriais explica o aparecimento e formação de biofilmes, principal causa de resistência à terapia antifúngica. Os biofilmes são estruturas resultantes da acumulação de células em divisão celular que produzem uma matriz extracelular constituída por hidratos de carbono, proteínas, fósforo e hexosaminas. Os constituintes da matriz variam consoante as condições ambientais, pH, níveis de oxigénio e da estirpe e espécie. Esta matriz protege os microrganismos permitindo o seu desenvolvimento e está envolvido nos mecanismos de patogenicidade, uma vez que facilita a invasão do sistema imunitário; cria resistência à terapia antifúngica, já que apenas as camadas mais superficiais ficam suscetíveis à sua ação e cria resistência à ação competitiva de outros microrganismos (Sardi, *et al.*, 2013; Mayer, *et al.*, 2013).

As enzimas hidrolíticas são apontadas como fatores de virulência uma vez que estão envolvidas no processo de adesão, invasão e danificação dos tecidos do hospedeiro. As enzimas mais importantes nestes processos são as proteases e as fosfolipases. As lipases são responsáveis pela digestão de lípidos para aquisição dos nutrientes por parte do microrganismo, adesão às células do hospedeiro e despoletação da atividade inflamatória que afeta o sistema imune do hospedeiro e permite eliminar a microflora competitiva. Além destas enzimas, a hemolisina também tem sido descrita por causa do seu potencial patogénico. Esta proteína é produzida pelos microrganismos para lisar os glóbulos vermelhos permitindo-lhes assim a aquisição de ferro, importante para o desenvolvimento dos microrganismo e para o processo infeccioso (Sardi, *et al.*, 2013; Mayer, *et al.*, 2013).

A capacidade de conversão da forma unicelular para filamentosa de *Candida albicans* é apontado como fenómeno de virulência. Este fenómeno é importante na invasão tecidular e na resistência à fagocitose por parte do sistema imunitário do hospedeiro permitindo a sua sobrevivência e colonização com formação de biofilmes (Sardi, *et al.*, 2013; Mayer, *et al.*, 2013).

Candida parapsilosis tem sido o segundo microrganismo mais isolado em vários estudos. Esta espécie é mais preocupante na neonatologia, principalmente quando associado a cateteres ou a nutrição parentérica. Os seus mecanismos de virulência incluem formação de biofilmes e a presença de enzimas hidrolíticas (Sardi, *et al.*, 2013).

As manifestações clínicas comuns no caso das candidoses superficiais são a inflamação localizada a nível oral, um exsudado esbranquiçado associado a prurido, vulgarmente denominadas de “sapinhos” e frequentes nos recém – nascidos e imunodeprimidos; nas pequenas e grandes pregas, onde a inflamação também é denominada de intertrigo; na zona ungueal e nos órgãos genitais masculinos e femininos (Silva, *et al.*, 2014; Mayer, *et al.*, 2013).

As micoses oportunistas são resultantes de infeções invasivas em hospedeiros cuja proteção por parte do sistema imunológico está comprometido. Os microrganismos mais predominantes neste tipo de micoses são os pertencentes ao género *Candida*, onde se destacam *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. A principal via de infeção tem origem endógena e o principal fator de virulência é o tigmotropismo presente nas espécies de *Candida*, excetuando *C. glabrata*. O tigmotropismo é um mecanismo fundamental para o crescimento e colonização de *Candida* no organismo do hospedeiro, uma vez que o crescimento de hifas permite uma melhor adesão às células do hospedeiro, o que potencia uma posterior invasão através dos seus tecidos (Rodrigues e Vaz (b), 2014; Mayer, *et al.*, 2013).

Os fatores de risco para uma micose oportunista invasiva provocada por *Candida albicans* são a idade, doenças subjacentes, como a neoplasia de órgãos sólidos, neutropenia, Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), transplantados, queimados, desnutrição, imunossuppressores e outros fármacos, nutrição parentérica, ventilação mecânica, hemodiálise e manipulação de cateteres (Rodrigues e Vaz (b), 2014; Sardi, *et al.*, 2013). O quadro clínico resultante de infeções por *Candida*, que provoca infeções localizadas a disseminadas, é predominantemente de candidemia. Ao atingir a corrente sanguínea, esta pode originar sépsis severa ou febre persistente, resistente a terapia antibacteriana, com posterior disseminação para outros órgãos com elevada probabilidade de morte. O quadro clínico

engloba ainda peritonite; pneumonia; candidose hepatoesplénica; osteomielite; endocardite infecciosa; lesões cutâneas maculopapulares ou pequenos nódulos e atingimento ocular que podem levar a perda de visão (Rodrigues e Vaz (b), 2014).

II. Objetivos

Face às emergentes resistências microbianas às opções terapêuticas existentes no mercado, os principais objetivos desta monografia são:

- Avaliar, *in vitro*, a potencial atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais disponíveis comercialmente e vulgarmente usados em aromaterapia em:
 - (i) bactérias de Gram – positivo e Gram – negativo *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* e ATCC 27853;
 - (ii) leveduras do género *Candida*: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 2209;
- Para os óleos essenciais mais ativos, determinar se o efeito é microbiocida ou microbiostático.

III. Materiais e métodos

1. Materiais

i. Bactérias

Staphylococcus aureus (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) da coleta de microrganismo da Universidade Fernando Pessoa.

ii. Leveduras

Candida albicans (ATCC 10231), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 2209) da coleta de microrganismo da Universidade Fernando Pessoa.

iii. Óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados foram obtidos num estabelecimento comercial.

Tabela 2. Óleos essenciais utilizados e respetiva composição química, de acordo com a informação do fabricante que acompanha o óleo essencial.

Nome vulgar	Espécie	Composição química
Bergamota	<i>Citrus aurantium bergamia</i>	Limoneno, linalol e acetato de linalilo
Camomila azul	<i>Tanacetum annuum</i>	Cânfora, β – pineno e camazuleno
Camomila selvagem	<i>Ormenis multicaulis L.</i>	α - pineno e limoneno
Cedro	<i>Cedrus atlantica</i>	β – himachaleno, α – himachaleno e γ – himachaleno
Cravinho	<i>Eugenia caryophyllus</i> (C. Spreng) Bull et Harr.	Eugenol, acetato de eugenilo e β – cariofileno
Eucalipto globulus	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	1,8 – cineol, α – pineno e γ – terpineno

Eucalipto radiata	<i>Eucalyptus radiata</i>	1,8 – cineol e α – terpineol
Hortelã verde	<i>Mentha spicata</i>	Carvona, limoneno e dihidrocarvona
Lavanda fina	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill	Acetato de linalilo, linalol e cis - β – ocimeno
Lavanda mailette	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill	Acetato de linalilo, linalol e β – cariofileno
Limão destilado	<i>Citrus medica limonum</i>	Limoneno, β – pineno e γ – terpineno
Niaouli	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	1,8 – cineol e viridiflorol
Orégão	<i>Origanum compactum</i>	Isotimol, timol, γ – terpineno e p – cimeno
Palmarosa	<i>Cymbopogon martinii</i>	Geraniol e acetato de geraniol
Pimenta negra	<i>Piper nigrum</i> L.	β – cariofileno, limoneno, sabineno, α – pineno e β – pineno
Pinho	<i>Pinus sylvestris</i> L.	α – pineno e β – pineno
Rosa	<i>Rosa damascena</i>	Citronelol, geraniol e nonadecano
Tangerina destilada	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Limoneno, α – pineno e γ – terpineno
Tangerina	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Limoneno, γ – terpineno e α – pineno
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Linalol, terpineno – 4 – ol e γ – terpineno

iv. Reagentes

Dimetilsulfóxido (DMSO) (Applichem); Mueller – Hinton agar (Liofilchem); Sabouraud dextrose agar (Liofilchem) e RPMI (Sigma).

2. Métodos

i. Diluição dos óleos essenciais

As diluições dos óleos essenciais foram realizadas em DMSO numa estequiometria de 1:2. Para a determinação da Concentração Mínima Inibitória para as bactérias em estudo, a concentração máxima utilizada foi de 8,0 µl/ml e a mínima de 0,06 µl/ml. Nos fungos, a concentração máxima avaliada foi de 2,0 µl/ml e a mínima de 0,06 µl/ml.

ii. Avaliação da atividade antibacteriana

A metodologia adotada para determinar a Concentração Mínima Inibitória dos óleos essenciais contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) encontra-se presente na norma CLSI, antiga NCCLS, M7 – A6: Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbico.

O esquema de preparação idealizado incluiu a divisão das placas de 96 poços do seguinte modo:

- poços “controle positivo e negativo” para validação do método e aferição dos resultados. O controle positivo inclui meio de cultura e bactéria e o controle negativo apenas meio de cultura;
- poço “branco” para cada óleo testado contendo meio de cultura e óleo essencial de modo a eliminar a contribuição da turvação dada pela sua coloração na avaliação dos resultados;
- poços com 1 µl e 2 µl (volume máximo permitido) de DMSO para despiste da atividade antimicrobiana do composto. Inclui meio de Muller – Hinton, o reagente e bactéria em estudo.

As culturas bacterianas foram repicadas no dia anterior a cada ensaio realizado em tubos contendo meio sólido de Mueller – Hinton em rampa, por inoculação em estria, e incubadas a 37°C em estufa durante 24 horas. A suspensão-padrão de bactérias foi feita

em soro fisiológico com recurso a um nefelómetro de modo a obter uma densidade de 0,5 U MacFarland. Ao meio de cultura foi adicionado a quantidade de suspensão bacteriana necessária para obtenção da concentração final de $5,0 \times 10^5$ CFU/ml. A suspensão obtida foi a utiliza no trabalho.

A execução do esquema geral das placas de 96 poços (cada poço com volume final de 100 µl) foi o seguinte:

- poço “teste”: 48,0 µl de meio de cultura, 2,0 µl da mistura de óleo essencial com DMSO e 50,0 µl de suspensão bacteriana;
- poço “branco”: 2,0 µl da mistura de óleo essencial com DMSO e o restante volume foi completado com meio de cultura;
- poço “controlo positivo”: 50,0 µl de suspensão bacteriana e 50,0 µl de meio de cultura;
- poço “controlo negativo”: 100,0 µl de meio de cultura;
- poços “DMSO”: 2,0 µl e 1,0 µl de dimetilsufóxido e restante volume completado com meio de cultura.

A placa foi incubada em estufa a 37°C durante um período de 24 horas.

iii. Avaliação da atividade antifúngica

Para determinação da Concentração Mínima Inibitória dos óleos essenciais contra *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 2209) foram seguidos os parâmetros descritos na norma CLSI, anteriormente referenciada como NCCLS, M27 – A2: Metodologia de Referência para Testes de Diluição em caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica.

Relativamente à avaliação da atividade antifúngica, as únicas variações do esquema utilizado nas bactérias foram: meio de cultura utilizado; suspensão de trabalho que foi realizada para obter uma concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por ml² e tempo de incubação da placa na estufa que foi de 48 horas.

iv. Avaliação da Concentração Mínima Letal

Após averiguação da CMI, e após homogeneização, transferiu-se uma alíquota (25 µl) do conteúdo de cada poço que continha o microrganismo e o óleo essencial para uma placa de cultura. Após incubação em estufa a 37°C durante um período de 24 horas procedeu-se à análise, de modo a identificar a Concentração Mínima Letal (CML). A CML é definida como a concentração mais baixa capaz de matar a totalidade dos microrganismos analisados. A técnica utilizada foi idêntica à descrita por Simié, *et al.*, (2004).

IV. Resultados

A tabela 3 indica a Concentração Mínima Inibitória de cada óleo essencial testado nas bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). As concentrações avaliadas foram de 8,0 µl/ml a 0,06 µl/ml.

Tabela 3. Concentrações Mínimas Inibitórias para as três estirpes de bactérias analisadas.

Óleos essenciais	Concentração Mínima Inibitória (CMI)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Bergamota	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Camomila Azul	8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Camomila Selvagem	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Cedro	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Cravinho	1,0 µl/ml	1,0 µl/ml	4,0 µl/ml
Eucalipto globulus	4,0 µl/ml	4,0 µl/ml	4,0 µl/ml
Eucalipto radiata	8,0 µl/ml	8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Hortelã verde	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Lavanda fina	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Lavanda maillete	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Limão destilado	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml

Niaouli	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Orégão	0,25 µl/ml	0,5 µl/ml	1,0 µl/ml
Palmarosa	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Pimenta Negra	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Pinho	4,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	8,0 µl/ml
Rosa	2,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Tangerina casca	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Tangerina destilada	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml
Tomilho	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml	> 8,0 µl/ml

A tabela 4 apresenta os valores de Concentração Mínima Inibitória obtidos para as leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 2209). As concentrações testadas neste caso foram de 2,0 a 0,06 µl/ml.

Tabela 4. Concentrações Mínimas Inibitórias para as três estirpes de leveduras analisadas.

Óleos essenciais	Concentração Mínima Inibitória (CMI)		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
Bergamota	2,0 µl/ml	0,5 µl/ml	> 2,0 µl/ml
Camomila Azul	2,0 µl/ml	2,0 µl/ml	2,0 µl/ml
Camomila Selvagem	1,0 µl/ml	0,25 µl/ml	2,0 µl/ml
Cedro	> 2,0 µl/ml	2,0 µl/ml	> 2,0 µl/ml
Cravinho	0,5 µl/ml	0,5 µl/ml	0,125 µl/ml
Eucalipto globulus	0,5 µl/ml	0,125 µl/ml	0,5 µl/ml
Eucalipto radiata	1,0 µl/ml	0,25 µl/ml	1,0 µl/ml
Hortelã verde	2,0 µl/ml	2,0 µl/ml	> 2,0 µl/ml
Lavanda fina	> 2,0 µl/ml	> 2,0 µl/ml	> 2,0 µl/ml
Lavanda maillete	> 2,0 µl/ml	> 2,0 µl/ml	> 2,0 µl/ml
Limão destilado	2,0 µl/ml	1,0 µl/ml	> 2,0 µl/ml
Niaouli	> 2,0 µl/ml	1,0 µl/ml	2,0 µl/ml
Orégão	0,25 µl/ml	0,125 µl/ml	0,25 µl/ml
Palmarosa	0,5 µl/ml	0,5 µl/ml	0,5 µl/ml

Pimenta Negra	1,0 µl/ml	1,0 µl/ml	> 2,0 µl/ml
Pinho	0,06 µl/ml	0,06 µl/ml	0,06 µl/ml
Rosa	1,0 µl/ml	1,0 µl/ml	2,0 µl/ml
Tangerina casca	> 2,0 µl/ml	1,0 µl/ml	> 2,0 µl/ml
Tangerina destilada	1,0 µl/ml	0,125 µl/ml	2,0 µl/ml
Tomilho	2,0 µl/ml	1,0 µl/ml	2,0 µl/ml

Relativamente à Concentração Mínima Letal testada, a tabela 5 indica os resultados para *Candida krusei*, registados e avaliados após período de incubação de 24 horas, com os óleos essenciais de Eucalipto globulus e Orégão, testados a concentrações de 0,5: 0,25 e 0,125 µl/ml, Palmarosa e Cravinho à concentração de 0,5 µl/ml e Pinho no intervalo de concentrações de 0,5: 0,25; 0,125 e 0,06 µl/ml.

Tabela 5. Concentração Mínima Letal dos óleos essenciais para *Candida krusei*.

Óleo essencial	Concentração Mínima Letal
Eucalipto globulus	0,125 µl/ml
Orégão	0,125 µl/ml
Palmarosa	0,5 µl/ml
Cravinho	0,5 µl/ml
Pinho	0,06 µl/ml

V. Discussão

Nos últimos anos temos assistido ao emergir de espécies bacterianas com elevado grau de resistência à terapêutica convencional. Destacam-se *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Fair e Tor, 2014).

Desde 1990, as bactérias de Gram – positivo constituem uma grande ameaça para o Homem com o aparecimento de estirpes *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e mais tarde à vancomicina (VRSA). Esta bactéria faz parte da flora comensal do Homem, mas pode causar severos problemas como infeções na pele e pneumonias. Face ao aparecimento dos MRSA, os glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina foram selecionados como alternativa terapêutica. No entanto começam a surgir resistências também a estes antibióticos (Fair e Tor, 2014; DJ den Heijer, *et al.*, 2013).

Relativamente à bactéria *Escherichia coli*, recentemente têm sido descritos o aparecimento de resistências o que se torna preocupante porque esta espécie é a mais comum nas infeções provocadas por bactérias Gram – negativo no Homem. Atualmente, destacam-se as estirpes com *Extended Spectrum β – lactamases* (ESBLs) o que lhes confere resistência a cefalosporinas de terceira geração. Além disso, esta bactéria tem ainda demonstrado resistência a fluoroquinolonas e à gentamicina (Fair e Tor, 2014).

Quando comparado com os outros patogénicos, *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria de Gram-negativo causadora de infeções hospitalares e infeções crónicas pulmonares em doentes com fibrose cística, é muito difícil de erradicar devido a resistências intrínsecas, adaptativas e adquiridas aos antibióticos. Nos mecanismos de resistência intrínsecos salientam-se a baixa permeabilidade membranar que atua como barreira seletiva à entrada de antibióticos e a presença de bombas de efluxo (Breidenstein, *et al.*, 2011; Fair e Tor, 2014). Na resistência adquirida encontram-se descritos dois mecanismos diferentes: a transferência horizontal de elementos genéticos (plasmídeos) e mutações que incluem aumento da expressão dos genes de bombas de efluxo, reduzindo a entrada de antibióticos; hiperprodução de β – lactamases e alteração do alvo dos antibióticos. Os mecanismos de resistência adaptativa estão dependentes dos

antibióticos e de estímulos ambientais, como pH, anaerobiose, fonte de cátions e carbono. A exposição a concentrações subinibitórias de antibióticos contribui para a expressão de genes que codificam as bombas de efluxo. Neste tipo de mecanismo verifica-se que uma vez eliminado o fator desencadeante o microrganismo volta ao seu estado de suscetibilidade o que pode explicar que a eficácia *in vitro* da terapia nem sempre se verifica *in vivo*. A formação de biofilmes por parte desta bactéria reduz a sua resposta à terapia antibacteriana (Breidenstein, *et al.*, 2011).

A prevalência de infecções fúngicas tem aumentado desde 1980, principalmente na população de imunocomprometidos. O género *Candida* é apontado como responsável pela maioria das infecções nas mucosas e tecidos, sendo *Candida albicans* a espécie predominante nas manifestações clínicas invasivas (Mayer, *et al.*, 2013; (Sardi, *et al.*, 2013). No entanto, as infecções invasivas causadas por espécies não – *albicans* têm aumentado. Mais de 90 % das infecções fúngicas invasivas são causadas por *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. *C. parapsilosis* tem emergido em infecções nosocomiais, devido a procedimentos cirúrgicos invasivos e próteses. *C. krusei* apresenta resistência ao fluconazol e as infecções por ela provocadas devem-se sobretudo à profilaxia de fluconazol e a neutropenia (Sardi, *et al.*, 2013).

Além das diferentes formulações de anfotericina B os triazóis (fluconazol, posaconazol e voriconazol) são recomendados como compostos primários e profiláticos no tratamento das infecções invasivas causadas por *Candida*. O uso abusivo destes compostos contribuiu para a resistência *in vitro* à sua ação que pode ser explicado por: modificação na quantidade e qualidade do alvo das enzimas, redução do acesso ao alvo dos compostos, mutações no gene que participa na biossíntese do ergosterol ou efluxo dos azóis para o exterior da célula devido à ativação de genes que codificam transportadores de efluxo (Espinel – Ingroff, *et al.*, 2014).

A introdução dos antibióticos e antifúngicos na terapia contribuiu para o aumento de diferentes formas de resistência por parte dos microrganismos à sua ação, conduzindo inclusive ao aparecimento de microrganismos resistentes praticamente a qualquer antibiótico existente no mercado (Fair e Tor, 2014; Raut e Karuppayil, 2014). Face a este problema de saúde pública, torna-se fundamental explorar novas formas de

tratamento com especial relevo para as naturais, surgindo os óleos essenciais como uma das alternativas.

Os óleos essenciais possuem uma variedade de moléculas na sua composição química conhecidas pelas suas propriedades antimicrobianas. Segundo Teixeira, *et al.* (2013), cujo estudo realizado teve com principal objetivo avaliar a composição química e as propriedades antibacterianas e antioxidantes de óleos essenciais comerciais, a composição química dos óleos é influenciada por vários fatores que condicionam as suas propriedades bioativas: espécie, parte da planta, época da colheita, localização geográfica e o método de extração. No entanto, o verificado foi que óleos essenciais ricos em timol, carvacrol, eugenol, cânfora, α – pineno e citronelal apresentam atividade antibacteriana. Também outros como autores como Fachini-Queiroz, *et al.* (2012), Johnson, *et al.* (2013), Pereira, *et al.* (2014) e Kumar, *et al.* (2012) demonstram a atividade antibacteriana destes compostos.

Para a leitura dos resultados foi aplicado um método qualitativo baseado na presença ou ausência de turvação. A presença de turvação provocada pelo crescimento microbiano é interpretado como ineficácia do óleo essencial e, em contrapartida, a ausência de turvação no poço é interpretada como atividade antimicrobiana do óleo essencial nas estipes utilizadas. A Concentração Mínima Inibitória (CMI), definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, foi aferida graças à utilização do método das microdiluições, cujos resultados encontram-se nas tabelas 3 e 4. A principal dificuldade encontrada foi a baixa solubilidade dos óleos essenciais nos meios de cultura, o que conduziu à utilização do dimetilsulfóxido como solvente para preparação das diferentes concentrações segundo o método das diluições sucessivas.

O óleo essencial de bergamota apresenta na sua composição química o limoneno, o acetato de linalilo e o linalol como moléculas maioritárias (tabela 2). Não apresenta atividade antibacteriana contras as estirpes testadas no intervalo de concentrações da análise, tendo-se obtido uma CMI maior que 8,0 μ l/ml para as três bactérias.

O óleo essencial de camomila azul tem como moléculas principais a cânfora, β – pineno e o camazuleno (tabela 2). Tendo em conta o intervalo de concentrações testado, apresentou resultados apenas contra *S. aureus*, com a CMI de 8,0 $\mu\text{l/ml}$. As restantes apresentaram uma CMI maior que 8,0 $\mu\text{l/ml}$. Pode-se concluir que apenas *Staphylococcus aureus* apresenta suscetibilidade à ação deste óleo, que possui a cânfora como molécula descrita como responsável pela atividade antibacteriana (Teixeira, *et al.* 2013).

No óleo essencial de camomila selvagem os compostos presentes são o limoneno e o α - pineno (tabela 2), composto descrito previamente como antibacteriano. No entanto, o valor de CMI para as três bactérias foi maior que 8,0 $\mu\text{l/ml}$, podendo concluir que apesar de ter na sua composição o α – pineno as bactérias utilizadas não apresentam suscetibilidade à ação do óleo essencial no intervalo de concentrações avaliado.

O óleo essencial de cedro é composto por β – himachaleno, α – himachaleno e γ – himachaleno (tabela 2), hidrocarbonetos sesquiterpenos responsáveis pela atividade antisséptica (tabela 1). Não apresenta atividade antibacteriana neste estudo, visto que o valor de CMI obtido para as três bactérias foi maior que 8,0 $\mu\text{l/ml}$.

Na composição química do óleo essencial de cravinho destacam-se o eugenol, acetato de eugenilo e o β – cariofileno (tabela 2). Rico em fenóis e éteres fenólicos o que, segundo outros estudos, justifica a sua propriedade antimicrobiana, os valores de CMI para as bactérias foram de 1,0 $\mu\text{l/ml}$ para *S. aureus* e *E. coli* e de 4,0 $\mu\text{l/ml}$ para *P. aeruginosa*. Pode-se então concluir que o óleo essencial possui ação antibacteriana contra as estirpes utilizadas.

O óleo essencial de eucalipto globulus é rico em 1,8 – cineol, α – pineno e γ – terpineno (tabela 2). A presença de α – pineno, composto com atividade antibacteriana, conferiu-lhe eficácia quando testado nas estirpes de *S.aureus*, *E.coli* e *P. aeruginosa*. Os valores de CMI obtidos foram de 4,0 $\mu\text{l/ml}$ para as três bactérias. Já o óleo essencial de eucalipto radiata possui na sua composição o 1,8 – cineol e o α – terpineol. Apesar de ter na sua composição hidrocarbonetos terpénicos com atividade anti-séptica (tabela 1),

apenas as bactérias *S.aureus* e *E.coli* apresentam suscetibilidade à sua ação com valores de CMI de 8,0 µl/ml.

No óleo essencial de hortelã – verde destaca-se a presença da carvona, limoneno e dihidrocarvona (tabela 2). O valor de CMI para as três bactérias foi maior que 8,0 µl/ml, não apresentando por isso atividade antibacteriana para as estirpes utilizadas.

O óleo essencial de lavanda fina apresenta como moléculas principais o acetato de linalilo, linalol e o cis - β – ocimeno, enquanto o de lavanda maillete tem acetato de linalilo, linalol e β – cariofileno (tabela 2). Não apresentam atividade antibacteriana nas estirpes utilizadas (valores CMI maiores que 8,0 µl/ml para as três bactérias).

No óleo essencial de limão destilado destacam-se os compostos limoneno, β – pineno e o γ – terpineno (tabela 2), hidrocarbonetos monoterpênicos com atividade antisséptica (tabela 1). No entanto, as três bactérias usadas não apresentaram suscetibilidade à sua ação, já que os valores de CMI obtidos foram todos maiores que 8,0 µl/ml.

O mesmo se verificou no óleo essencial de niaouli. A presença de 1,8 – cineol e viridiflorol (tabela 2) como moléculas principais não conferiu, neste estudo, ação antibacteriana ao óleo essencial. Os valores de CMI para as três bactérias foram maiores que 8,0 µl/ml.

A composição química do óleo essencial de orégão destaca o isotimol, o timol, γ – terpineno e o p – cimeno (tabela 2). A presença de timol, molécula com atividade antibacteriana segundo a conclusão do estudo de Teixeira, *et al.* (2013), conferiu a este óleo ação contra as três estirpes. Os valores de CMI para *S. aureus* foi de 0,25 µl/ml, 0,5 µl/ml para *E. coli* e 1,0 µl/ml para *P. aeruginosa*.

O óleo essencial de palmarosa possui o geraniol e o acetato de geranilo (tabela 2). Não apresenta atividade antibacteriana neste estudo, visto que a CMI obtida para as três bactérias foi maior que 8,0 µl/ml.

O óleo essencial de pimenta negra tem no seu perfil cromatográfico o β – cariofileno, o limoneno, o sabineno, α – pineno e β – pineno (tabela 2). Apesar da presença α – pineno, composto anteriormente apontado como potencial antimicrobiano, as bactérias utilizadas não apresentaram suscetibilidade à sua ação. O CMI obtido nas três estirpes foi maior que 8,0 μ l/ml.

O óleo essencial de pinho utilizado apresenta α – pineno e β – pineno (tabela 2). Apresentou atividade contra *S.aureus* (CMI igual a 4,0 μ l/ml) e *P. aeruginosa* (CMI igual a 8,0 μ l/ml).

As moléculas principais no óleo essencial de rosa são o citronelol, geraniol e o nonadecano (tabela 2), Apenas *S. aureus* apresentou suscetibilidade a este óleo com valor de CMI igual a 2,0 μ l/ml (restantes valores maiores que 8,0 μ l/ml).

Os óleos essenciais de tangerina destilada e tangerina apresentam na sua composição limoneno, α – pineno e γ – terpineno (tabela 2). Apesar de terem o composto α – pineno na sua composição destacado como antibacteriano na literatura, os dois óleos não apresentaram efeito antibacteriano nas estirpes estudadas (valores de CMI superiores a 8,0 μ l/ml para as três bactérias).

O óleo essencial de tomilho apresenta linalol, terpineno – 4 – ol e γ – terpineno na sua composição (tabela 2). Não apresenta atividade contras as estirpes de bactérias analisadas (valores de CMI superiores a 8,0 μ l/ml). Este resultado é concordante com os estudos de Fachini-Queiroz, *et al.* (2012) e Teixeira, *et al.* (2013) que concluem que a presença de timol neste óleo essencial é responsável pela sua atividade antibacteriana.

O estudo da atividade antifúngica dos óleos essenciais foi feito seguindo os mesmos parâmetros do estudo da atividade antibacteriana: vinte óleos essenciais testados nas leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* no intervalo de concentrações de 8,0 a 0,06 μ l/ml. No entanto, as placas incubadas e analisadas pelo método qualitativo da turvação não eram válidas, uma vez que os controlos positivos não apresentavam turvação característica do crescimento das leveduras. Após várias tentativas o problema

foi resolvido ao iniciar o estudo da atividade antifúngica com um intervalo de concentrações de 2,0 µl/ml a 0,06 µl/ml, apontando-se como possíveis interferências a volatilidade dos óleos essenciais e uma possível elevada suscetibilidade das leveduras à sua ação.

Segundo Budzyńska, *et al.* (2013), num estudo realizado com dezasseis óleos essenciais para avaliar a sua eficácia contra leveduras da espécie *Candida*, de um modo geral todos os óleos essenciais com elevadas concentrações de citronelol, geraniol, eugenol, citronelal e citral, compostos apontados por vários autores como antimicrobianos, apresentaram atividade antifúngica. Já Zuzarte, *et al.* (2012), no estudo da atividade antifúngica de um óleo essencial de lavanda, concluiu que a presença de elevadas quantidades de carvacrol, composto fenólico presente noutras espécies como tomilho e orégão responsável pela elevada atividade antifúngica das mesmas, contribuiu para a atividade antifúngica do óleo essencial. Estes fundamentam outros estudos, como o de Bakkali, *et al.* (2008), que concluem que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais deve-se sobretudo à presença de álcoois, aldeídos e fenóis.

A composição química do óleo de bergamota destaca o limoneno, o acetato de linalilo e o linalol (tabela 2). O limoneno, da família dos hidrocarbonetos (monoterpenos), apresenta atividade antisséptica; o linalol, um álcool de natureza monoterpénica, é apontado como anti - infeccioso (tabela 1). Apresentou atividade antifúngica apenas contra *C. albicans*, com uma CMI de 2,0 µl/ml, e contra *C. krusei* com uma CMI igual a 0,5 µl/ml.

O óleo essencial de camomila – azul tem como moléculas principais a cânfora, β – pineno e o camazuleno (tabela 2). A CMI para *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* é de 2,0 µl/ml podendo-se concluir que o óleo apresenta atividade antifúngica contra as estirpes no intervalo de concentrações testado.

No óleo essencial de camomila – selvagem os compostos com maior destaque são o α- pineno e o limoneno (tabela 2), ambos com atividade antisséptica por se tratar de hidrocarbonetos terpénicos (tabela 1). O óleo demonstrou atividade antifúngica para as

estirpes utilizadas, obtendo-se valores de CMI para *C. albicans* de 1,0 µl/ml, 0,25 µl/ml para a *C. krusei* e 2,0 µl/ml para *C. parapsilosis*.

O óleo essencial de cedro é composto por β – himachaleno, α – himachaleno e γ – himachaleno (tabela 2), hidrocarbonetos sesquiterpenos responsáveis pela atividade antisséptica (tabela 1). Demonstrou apenas eficácia na estirpe de *C. krusei* com o valor de concentração mínima inibitória igual a 2,0 µl/ml.

No óleo essencial de cravinho destacam-se o eugenol, acetato de eugenilo e o β – cariofileno (tabela 2). O óleo essencial é rico em fenóis e éteres fenólicos o que justifica a sua atividade antimicrobiana, de acordo com o descrito nos estudos já mencionados, nas estirpes utilizadas neste trabalho, obtendo-se valores de CMI para *C. albicans* e *C. krusei* de 0,5 µl/ml e 0,125 µl/ml para *C. parapsilosis*.

O óleo essencial de eucalipto globulus é rico em 1,8 – cineol, α – pineno e γ – terpineno (tabela 2). Graças aos hidrocarbonetos terpênicos que lhe conferem atividade antisséptica (tabela 1), o óleo demonstrou atividade antifúngica nas três estirpes utilizadas. A CMI obtida para *C. albicans* foi de 0,5 µl/ml, para *C. krusei* foi de 0,125 µl/ml e para *C. parapsilosis* o valor obtido foi 0,5 µl/ml. O óleo essencial de eucalipto radiata possui como moléculas principais o 1,8 – cineol e o α – terpineol. Os resultados obtidos apontam valores de CMI igual a 1,0 µl/ml para *C. albicans* e *C. parapsilosis* e 0,25 µl/ml para *C. krusei*.

No óleo essencial de hortelã – verde destacam-se a carvona, a dihidrocarvona e o limoneno (tabela 2), hidrocarboneto terpênico com atividade antisséptica (tabela 1). Apresenta atividade antifúngica contra as estirpes de *C. albicans* e *C. krusei* com valores de CMI iguais a 2,0 µl/ml.

O óleo essencial de lavanda fina apresenta como moléculas principais o acetato de linalilo, linalol e o cis - β – ocimeno, enquanto o de lavanda maillete tem acetato de linalilo, linalol e β – cariofileno (tabela 2). Não apresentaram atividade antifúngica nas estirpes utilizadas (valores CMI maiores que 2,0 µl/ml).

A presença de limoneno, β – pineno e γ – terpineno (tabela 2), hidrocarbonetos monoterpênicos com atividade antisséptica no óleo essencial de limão destilado, conferiram-lhe atividade antifúngica nas estirpes analisadas de *C. albicans* (CMI de 2,0 μ l/ml) e *C. krusei* (CMI igual a 1,0 μ l/ml).

O óleo essencial de niaouli identifica o 1,8 – cineol e o viridiflorol (tabela 2) como moléculas principais. Visto que os valores de CMI para *C. krusei* foi de 1,0 μ l/ml e de 2,0 μ l/ml para *C. parapsilosis* pode-se afirmar que o óleo apresenta atividade antifúngica nas estirpes utilizadas.

A composição química do óleo essencial de orégão destaca o isotimol, o timol, γ – terpineno e o p – cimeno (tabela 2), Rico em hidrocarbonetos terpênicos com atividade antisséptica e em fenóis com atividade anti – infecciosa (tabela 1), o óleo demonstrou atividade nas leveduras testadas. A CMI obtida para *C. albicans* e *C. parapsilosis* foi de 0,25 μ l/ml enquanto para *C. krusei* de 0,125 μ l/ml.

O óleo essencial de palmarosa possui o geraniol e o acetato de geraniol (tabela 2), álcool e éster de natureza terpênica. Apresentou atividade contra as leveduras utilizadas com valores de CMI igual a 0,5 μ l/ml.

O óleo essencial de pimenta negra apresenta na sua composição o β – cariofileno, o limoneno, o sabineno, α – pineno e β – pineno (tabela 2). Apresentou atividade apenas contra *C. albicans* e *C. krusei* com o valor de CMI igual a 1,0 μ l/ml para ambas.

No óleo essencial de pinho utilizado encontram-se as moléculas α – pineno e β – pineno (tabela 2), hidrocarbonetos monoterpênicos com atividade antisséptica, segundo o descrito na literatura. Apresenta atividade antifúngica para as três leveduras utilizadas com valores de CMI iguais a 0,06 μ l/ml.

As moléculas principais no óleo essencial de rosa são o citronelol, o geraniol (álcoois de natureza terpênica) e o nonadecano (tabela 2). O óleo demonstrou atividade

contra as três leveduras com valores de CMI igual a 1,0 µl/ml para *C. albicans* e *C. krusei* e CMI igual a 2,0 µl/ml para *C. parapsilosis*.

Os óleos essenciais de tangerina e tangerina destilada possuem nas suas composições o limoneno, α – pineno e o γ – terpineno (tabela 2). O óleo essencial de tangerina apresentou atividade apenas contra *C. krusei* (CMI igual a 1,0 µl/ml). Por outro lado, o óleo essencial de tangerina destilada apresentou atividade antifúngica nas três leveduras com valores de CMI igual a 1,0 µl/ml para *C. albicans*, 0,125 µl/ml para *C. krusei* e 2,0 µl/ml para *C. parapsilosis*.

Na composição química do óleo essencial de tomilho encontram-se os compostos linalol, terpineno – 4 – ol e γ – terpineno (tabela 2). Apresenta atividade antifúngica contra as três estirpes testadas com valores de CMI para *C. albicans* de 2,0 µl/ml, de 1,0 µl/ml para *C. krusei* e 2,0 µl/ml para *C. parapsilosis*.

Perante a análise dos resultados pode-se verificar que as leveduras testadas neste trabalho apresentam uma maior suscetibilidade à ação antimicrobiana dos óleos essenciais, comparativamente às bactérias. Os critérios de seleção para avaliação do mecanismo de ação dos óleos essenciais (microbiocida ou microbiostático) foram: (i) selecionar a levedura com maior suscetibilidade à ação dos óleos essenciais, isto é, a levedura que apresentou valores de CMI mais baixos; (ii) selecionar cinco óleos essenciais que apresentaram valores de CMI iguais ou inferiores a 0,5 µl/ml para a levedura mais suscetível.

Seguindo os critérios de seleção a levedura selecionada foi *C. Krusei* e os cinco óleos essenciais foram: eucalipto globulus, orégão, palmarosa, cravinho e pinho. Após período de incubação e análise da placa verificou-se que não existiu crescimento em nenhuma das concentrações avaliadas. De acordo com os resultados obtidos na tabela 5 e tendo em conta que a CMI é igual à CML, pode-se então concluir que os óleos essenciais testados exercem, na Concentração Mínima Inibitória, um efeito fungicida.

VI. Conclusão

Os óleos essenciais analisados, apesar das suas características de baixa solubilidade em solventes aquosos e elevada volatilidade, demonstram *in vitro* capacidade de inibir o crescimento bacteriano e fúngico mesmo a baixas concentrações. Os óleos essenciais que demonstraram essa efetividade são ricos em aldeídos, álcoois e fenóis, compostos descritos na literatura como responsáveis pelos efeitos citotóxicos nos fungos e bactérias.

Perante os vinte óleos essenciais analisados nas espécies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e nas leveduras *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* pode-se concluir perante os resultados obtidos que as leveduras apresentam maior suscetibilidade à ação antimicrobiana dos óleos essenciais que as bactérias.

No caso das bactérias, os óleos essenciais com maior atividade nas três estirpes são o eucalipto globulus, o cravinho e o orégão. Já nas leveduras os óleos mais ativos foram o eucalipto globulus, palmarosa, pinho, cravinho e o orégão.

Assim, tendo em conta os resultados obtidos nos microrganismos analisados e face à sua atividade citotóxica pode-se concluir que os óleos essenciais, usados em aromaterapia, podem constituir uma opção como complementares ou adjuvantes da terapia antimicrobiana convencional, face à problemática questão das crescentes resistências microbianas.

VII. Referências bibliográficas

- Bagheri, H., Manap, M., Solati, Z. (2014). Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercriticalCO₂ extraction and hydro-distillation. *Talanta*, volume 121. pp. 220 - 228
- Bakkali, F., *et al.* (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, volume 46. pp. 446 - 475
- Bassolé, I., Juliani, H. (2012). Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, volume 17. pp. 3989-4006
- Batish, D. R., *et al.* (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, volume 256. pp. 2166–2174
- Breidenstein, E.B.M., Fuente-Núñez, C., Hancock, R.E.W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, volume 19(8). pp. 419 – 426
- Budzyńska, A., *et al.* (2013). Activity of Selected Essential Oils against *Candida* spp. strains. Evaluation of New Aspects of their Specific Pharmacological Properties, with Special Reference to Lemon Balm. *Advances in Microbiology*, volume 3. pp. 317 – 325
- Can, Ö. D., *et al.* (2012). Psychopharmacological profile of Chamomile (*Matricaria recutita* L.) essential oil in mice. *Phytomedicine*, volume 19. pp. 306 – 310
- Costa, A. V. (2014). Conceitos básicos da resposta imunológica: resposta imunológica a agentes infecciosos. *In*: Barroso, H., *et al.* (Ed.). *Microbiologia Médica*, volume 1. Lisboa, Lidel. pp. 129 – 143

Cunha, A. P., Cavaleiro, P., Salgueiro, L. (2010). Capítulo 16 – Fármacos aromáticos – plantas aromáticas e óleos essenciais. In: Cunha, A. P., et al. (Ed.). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. pp. 339 – 482

Cunha, A. P., Roque, O. R., Nogueira, M. T. (2012). *Plantas aromáticas e óleos essenciais – Composição e aplicações*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.

Danh, L. T., et al. (2012). Antioxidant activity, yield and chemical composition of lavender essential oil extracted by supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, volume 70. pp. 27 – 34

Dhifi, W., et al. (2013). Chemical Composition Of The Essential Oil Of *Mentha Spicata* L. from Tunisia and its Biological Activities. *Journal of Food Biochemistry*, volume 37. pp. 362–368

Direcção Geral de Saúde. (2014). *Aliança Portuguesa para a Prevenção do Antibiótico*. [Em linha]. Disponível em <<https://www.dgs.pt/departamento-da-qualidade-na-saude/documentos/memorando-apapa-pdf.aspx>>. [Consultado em 22/10/2014]

DJ den Heijer, C., et al. (2013). Prevalence and resistance of commensal *Staphylococcus aureus*, including meticillin-resistant *S aureus*, in nine European countries: a cross-sectional study. *The lancet Infectious Diseases*, volume 13(5). pp. 409 - 415

Dourado, M. (2013). Capítulo 9 – Agentes Vivos. In: Pinto, A. M., et al. (Ed.). *Fisiopatologia – Fundamentos e aplicações*, 2ª edição. Lisboa, Lidel. pp. 127 – 152

Duarte, A. (2014). Bacteriologia médica: *Enterobacteriaceae*. In: Barroso, H., et al. (Ed.). *Microbiologia Médica*, volume 1. Lisboa, Lidel. pp. 342 – 357

Eller, F. J., Taylor, S. L. (2004). Pressurized Fluids for Extraction of Cedarwood Oil from *Juniperus virginiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, volume 52. pp. 2335-2338

Espina, L., *et al.* (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, volume 22. pp. 896 - 902

Espinel-Ingroff, A., *et al.* (2014). Multilaboratory Study of Epidemiological Cutoff Values for Detection of Resistance in Eight *Candida* Species to Fluconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, volume 58 (4). pp. 2006 - 2012

Fachini-Queiroz, F., *et al.* (2012). Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, volume 2012

Fair, R.J., Tor, Y. (2014). Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, volume 6. pp. 25–64

Ferreira, W.F.C., Fonseca, A.F. (2010). Capítulo 2 – História da microbiologia. *In: Ferreira, W.F.C., et al. (Ed.). Microbiologia*. Lisboa, Lidel. pp. 23 – 36

Freitas, G. (2010). Capítulo 8 -Fungos. *In: Ferreira, W.F.C., et al. (Ed.). Microbiologia*. Lisboa, Lidel. pp. 146 – 165

Fisher, K. Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in Food Science & Technology*, volume 19. pp. 156 - 164

Foster, T. (2004). The *Staphylococcus aureus* “superbug”. *The Journal of Clinical Investigation*, volume 114. pp. 1693 - 1696

Foster, T., Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, volume 6. pp. 484 - 488

Galvão, L., *et al.* (2012). Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, volume 2012

Johnson, O. O., Ayoola, G. A., Adenipekun, T. (2013). Antimicrobial Activity and the Chemical Composition of the Volatile Oil Blend from *Allium sativum* (Garlic Clove) and *Citrus reticulata* (Tangerine Fruit). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, volume 5. pp. 187 - 193

Jouki, M., *et al.* (2014). Characterization of antioxidant–antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. *Carbohydrate Polymers*, volume 99. pp. 537 – 546

Kakaraparthi, P. S., *et al.* (2015). Changes in the essential oil content and composition of palmarosa (*Cymbopogon martini*) harvested at different stages and short intervals in two different seasons. *Industrial Crops and Products*, volume 69. pp. 348 – 354

Karami, A., *et al.* (2012). Analysis of essential oil from nine distinct genotypes of Iranian Damask rose (*Rosa damascena* Mill). *Journal of Medicinal Plants Research*, volume 6. pp. 5495-5498

Kim, H., Lee, B., Yun, K.W. (2013). Comparison of chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from three *Pinus* species. *Industrial Crops and Products*, volume 44. pp. 323 – 329

Kim, E., Park, I. (2012). Fumigant Antifungal Activity of Myrtaceae Essential Oils and Constituents from *Leptospermum petersonii* against Three *Aspergillus* Species. *Molecules*, volume 17. pp. 10459-10469

Kizil, S., *et al.* (2010). Mineral content, essential components and biological activity of two mentha species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.). *Turkish Journal of Field Crops*, volume 15. pp. 148 - 153

Kumar, P., *et al.* (2012). Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta Tropica*, volume 122. pp. 212 - 218

Kupcinskiene, E., Stikliene, A., Judzentiene, A. (2008). The essential oil qualitative and quantitative composition in the needles of *Pinus sylvestris* L. growing along industrial transects. *Environmental Pollution*, volume 155. pp. 481 - 491

Machado, M., *et al.* (2011). Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. *Experimental Parasitology*, volume 127. pp. 732 – 739

Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, volume 152. pp. 2 - 12

Marinho, A., Taveira, N. (2014). Princípios gerais de bacteriologia. In: Barroso, H., *et al.* (Ed.). *Microbiologia Médica*, volume 1. Lisboa, Lidel. pp. 3 – 36

Mayer, F.L., Wilson, L. Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Landes Bioscience*, volume 4. pp. 119 - 128

Miragaia, M., Lencastre, H. (2014). Bacteriologia médica: *Staphylococcus aureus* e espécies relacionadas. In: Barroso, H., *et al.* (Ed.). *Microbiologia Médica*, volume 1. Lisboa, Lidel. pp. 228 – 254

Mohr, J., *et al.* (2014). Current Options in Antifungal Pharmacotherapy. *Pharmacotherapy*, volume 28. pp. 614 - 645

Navarra, M., *et al.* (2015). *Citrus bergamia* essential oil: from basic research to clinical application. *Frontiers in Pharmacology*, volume 6

NCCLS. (2002). *Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma M27-A2 aprovada - Segunda Edição*. [Em linha]. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPAS1M27-A2.pdf>. [Consultado em 03/02/2015]

NCCLS. (2002). *Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma M7 – A6 aprovada – Sexta Edição*. [Em linha]. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM7_A6.pdf>. [Consultado em 03/02/2015]

Otto, M. (2010). Basis of Virulence in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Microbiology*, volume 64. pp. 143 - 162

Padalia, R. C., *et al.* (2015). Chemical composition of *Melaleuca linarrifolia* Sm. from India: a potential source of 1,8-cineole. *Industrial Crops and Products*, volume 63. pp. 264 - 268

Pereira, V., *et al.* (2014). Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Industrial Crops and Products*, volume 52. pp. 1 - 7

Petronilho, S., *et al.* (2011). Sesquiterpenic composition of the inflorescences of Brazilian chamomile (*Matricaria recutita* L.): Impact of the agricultural practices. *Industrial Crops and Products*, volume 34. pp. 1482 – 1490

Ramalhinho, I., *et al.* (2010). *Evolução do Consumo de Antibióticos em Portugal Continental (2000 – 2007)*. [Em linha]. Disponível em <http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/OBSERVATORIO/ESTUDOS_REALIZADOS_PROTOCOLOS/Evolu%E7%E3o_Consumo_Ab_Portugal.pdf>. [Consultado em 22/10/2014]

Rao, B. R. R., *et al.* (2015). Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* Burk.). *Industrial Crops and Products*, volume 21. pp. 121 - 127

Richter, J., Schellenberg, I. (2007). Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, volume 387. pp. 2207–2217

Roby, M. H. H., *et al.* (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, volume 44. pp. 437 - 445

(a) Rodrigues, A., Vaz, C.P. (2014). Micologia médica: Mecanismos de patogénese fúngica. In: Barroso, H., *et al.* (Ed.). *Microbiologia Médica*, volume 2. Lisboa, Lidel. pp. 285 – 290

(b) Rodrigues, A., Vaz, C.P. (2014). Micologia médica: Micoses oportunistas. In: Barroso, H., *et al.* (Ed.). *Microbiologia Médica*, volume 2. Lisboa, Lidel. pp. 357 – 377

Raut, J.S. Karuppayil, S.M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, volume 62. pp. 250 – 264

Sardi, J. C. O., *et al.* (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, volume 62, pp. 10-24

Sefidkon, F., *et al.* (2007). The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food Chemistry*, volume 100. pp. 1054–1058

Silva, G. J. (2014). Bacteriologia médica: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e bactérias relacionadas. In: Barroso, H., *et al.* (Ed.). *Microbiologia Médica*, volume 1. Lisboa, Lidel. pp. 382 – 390

Silva, J. M., Filipe, P. L., Gomes, M. M. (2014). Micologia médica: Micoses superficiais. In: Barroso, H., *et al.* (Ed.). *Microbiologia Médica*, volume 2. Lisboa, Lidel. pp. 328 – 338

Simié, A., *et al.* (2004) The Chemical Composition of some Lauraceae Essential Oils and Their Antifungal Activities. *Phytotherapy research*, volume 18. pp. 713 – 717

Sousa, J.C. (2010). Capítulo 4 - Características morfológicas e ultra – estruturais dos microrganismos procaríotas. In: Ferreira, W.F.C., *et al.* (Ed.). *Microbiologia*. Lisboa, Lidel. pp. 60 – 94

Teixeira, B., *et al.* (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, volume 43. pp. 587-595

Vale-Silva, L., *et al.* (2012). Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their *in vitro* activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *Journal of Medical Microbiology*, volume 61. pp. 252 - 260

Wenqiang, G., *et al.* (2007). Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry*, volume 101. pp. 1558–1564

Wheeler, G. S. (2006). Chemotype variation of the weed *Melaleuca quinquenervia* influences the biomass and fecundity of the biological control agent *Oxyops vitiosa*. *Biological Control*, volume 36. pp. 121 - 128

Wiles, T. J., Kulesus, R. R., Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, volume 85. pp. 11 – 19

World Health Organization. (2011). *Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC)*. [Em linha]. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>>. [Consultado em 22/10/2014]

Zuzarte, M. *et al.* (2012). Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, volume 31 (7). pp. 1359-1366