



# **Avaliação da actividade antimicrobiana: Exemplos de aplicação**

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre na área de Sistemas  
de Prevenção e Controlo Alimentar**

**Ana Sofia Lameira  
Monteiro**

**ORIENTADOR**  
**Doutora**  
**Ana Maria Gomes**  
**de Sousa Neves**

**Maio**  
**2011**

## Agradecimentos

Sendo esta uma etapa que marca o fim do meu percurso académico não posso deixar de tecer o meu primeiro agradecimento a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para que eu chegasse aqui. Amigos, colegas, professores e familiares, este primeiro agradecimento é para todos vós.

À Professora Ana Maria Gomes de Sousa Neves, da Escola Superior Agrária de Santarém, minha orientadora científica, agradeço a disponibilidade concedida em todas as situações e a ajuda e orientação que foram fundamentais para o término desta dissertação.

À Maria Luzia Ascensão Diogo Marques e Maria Sofia Bernardino Soares Albergaria, do Laboratório da Escola Superior Agrária de Santarém, pela ajuda e apoio incondicional prestado aquando do desenvolvimento do trabalho experimental.

Aos meus familiares, em especial aos meus Pais, agradeço pelo apoio e amizade que sempre demonstraram e pelas oportunidades que me têm concedido que fizeram com que tenha conseguido chegar a esta fase da minha vida.

Aos meus amigos de sempre, agradeço por terem estado sempre lá quando precisei e pela energia positiva que sempre souberam transmitir.

O meu último agradecimento vai para uma pessoa muito especial, que soube estar ao meu lado sempre que precisei de uma palavra de incentivo. Obrigado, João, e desculpa pelo pouco tempo que tenho tido para ti.

## AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA: EXEMPLOS DE APLICAÇÃO.

### Resumo

A importância da avaliação da actividade antimicrobiana foi o objectivo principal deste estudo.

A avaliação da actividade antimicrobiana da planta *Genista tenera* revelou-se contra *Listeria monocytogenes* para os extractos de éter dietílico e acetato de etilo, e de éter dietílico em relação a *Fusarium culmorum*. O óleo de eucalipto mostrou actividade antibacteriana para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; a actividade antifúngica foi conseguida para *Botrytis cinerea* e *Fusarium culmorum*. Os compostos NX2 e NX18 demonstram actividade antibacteriana contra *Bacillus cereus* e *B. subtilis*. O composto NX2 foi eficaz contra *Aspergillus brasiliensis* e *Fusarium solani* e o composto NX18 foi eficaz contra *F. culmorum*.

Verificou-se que a concentração mínima inibitória para NX2 e NX18 é de 4,7 µg/mL e 9,4 µg/mL, respectivamente, contra *Bacillus cereus*. Para NX2, NX13 e NX18 a concentração mínima inibitória foi, respectivamente, de 37,5 µg/mL, 150 µg/mL e 4,7 µg/mL contra *Enterococcus faecalis*.

**Palavras-chave:** actividade antimicrobiana; método de difusão em ágar; concentração mínima inibitória - MIC; método de microdiluição; extractos e óleos vegetais; compostos de síntese química.

## EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY: APPLICATION EXAMPLES.

### Abstract

The importance of evaluating the antimicrobial activity was the main objective of this study.

The evaluation of the antimicrobial activity of plant *Genista tenera*, were proved against *Listeria monocytogenes* with extracts of diethyl ether and ethyl acetate and diethyl ether for *Fusarium culmorum*. Eucalyptus oil showed antibacterial activity for *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*; antifungal activity was achieved for *Botytris cinerea* and *Fusarium culmorum*. Compounds NX2 and NX18 demonstrate antibacterial activity against *Bacillus cereus* and *B. subtilis*. Compound NX2 was effective against *Aspergillus brasiliensis* and *Fusarium solani* and compound NX18 was effective against *F. culmorum*.

It was found that the minimal inhibitory concentration for NX2 and NX18 is 4.7  $\mu\text{g} / \text{mL}$  and 9.4  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectively, against *Bacillus cereus*. For NX2, NX13 and NX18 minimum inhibitory concentrations were, respectively, of 37.5  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , 150  $\mu\text{g} / \text{ml}$  and 4.7  $\mu\text{g} / \text{ml}$  against *Enterococcus faecalis*.

**Keywords:** antimicrobial activity; agar diffusion method; minimum inhibitory concentration – MIC; microdilution method; extracts and vegetable oils; compounds chemically synthesized.

## Índice geral

	<b>Pág.</b>
Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice Geral	IV
Índice Figuras	VII
Índice Tabelas	VIII
<b>1.INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1.Avaliação da actividade antimicrobiana	2
1.1.1.Métodos de avaliação	3
1.1.1.1.Métodos de difusão em meio sólido	3
1.1.1.2.Métodos de diluição em meio líquido	4
1.1.2.Factores que influenciam a avaliação da actividade antimicrobiana	6
1.1.2.1.Meios de cultura	6
1.1.2.2.pH	7
1.1.2.3.Condições de incubação	8
1.1.2.4.Características do inóculo microbiano	8
1.1.2.5.Condições para a avaliação de halos no método de difusão em ágar	9
1.1.3.Caracterização de microrganismos utilizados na avaliação da actividade antimicrobiana	9
1.1.3.1.Bactérias Gram positivas	9
1.1.3.2.Bactérias Gram negativas	12
1.1.3.3.Fungos	13
1.2.Avaliação da actividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas	14
1.2.1.Extractos vegetais	16
1.2.2.Óleos essenciais	17
1.2.3.Avaliação da actividade antimicrobiana de extractos vegetais e de óleos essenciais	20
1.2.3.1.Avaliação da actividade antimicrobiana de extractos vegetais	20

1.2.3.2.Avaliação da actividade antimicrobiana de óleos essenciais	20
1.2.3.2.1.Mecanismos de acção antimicrobiana	25
1.3.Avaliação da actividade antimicrobiana em compostos de síntese	28
1.4.Enquadramento e objectivos	29
<b>2.METODOLOGIA</b>	30
2.1.Características das amostras	30
2.1.1.Material Vegetal	30
2.1.1.1.Preparação de extractos de <i>Genista tenera</i>	31
2.1.1.2.Preparação de óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> spp. e de <i>Thymus citriodorus</i>	31
2.1.2.Compostos derivados de lactonas carboximetilglicosiladas	31
2.2.Avaliação de actividade antimicrobiana de extractos de <i>Genista tenera</i> , de óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> spp. e de <i>Thymus citriodorus</i> e de compostos de síntese	32
2.2.1.Microrganismos Padrão	32
2.2.1.1.Bactérias	32
2.2.1.2.Fungos	32
2.2.1.3.Padronização das culturas bacterianas	32
2.2.1.4.Padronização das culturas fúngicas	32
2.2.1.5.Preparação de soluções das substâncias de referência para o controlo positivo	33
2.2.2.Método de avaliação da actividade antimicrobiana	33
2.3.Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de compostos de síntese	35
2.3.1.Padronização do inóculo para determinação da MIC por macrodiluição usando o antibiótico cloranfenicol e <i>Escherichia coli</i>	35
2.3.2.Determinação da MIC por microdiluição dos compostos derivados de lactonas carboximetilglicosiladas	36
2.3.2.1.Ensaio com o antibiótico cloranfenicol	36
2.3.2.2.Compostos NX2, NX13, NX15 e NX18 derivados de lactonas carboximetilglicosiladas	37

<b>3.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	38
3.1.Avaliação de actividade antimicrobiana de extractos de <i>Genista tenera</i> , de óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> spp. e de <i>Thymus citriodorus</i> e de compostos de síntese	38
3.1.1.Avaliação de actividade antimicrobiana de extractos de <i>Genista tenera</i>	38
3.1.2.Avaliação de actividade antimicrobiana de óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> spp. e de <i>Thymus citriodorus</i>	39
3.1.3.Avaliação de actividade antimicrobiana de compostos derivados de lactonas carboximetilglicosiladas	45
3.2.Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de compostos de síntese	49
3.2.1.Padronização das condições para determinação da MIC por macrodiluição e microdiluição usando o antibiótico cloranfenicol e <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	49
3.2.2.Determinação da MIC por microdiluição dos compostos derivados de lactonas carboximetilglicosiladas	53
<b>4.CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	56
Bibliografia	59

## Índice de Figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1 - Locais de acção de compostos naturais na célula bacteriana.	25
Figura 2 - Compostos de síntese derivados de lactonas carboximetilglicosiladas usados no estudo.	31
Figura 3 - Halos de inibição fúngica para o extracto de éter dietílico de <i>Genista tenera</i> .	39
Figura 4 - Halos de inibição bacteriana para os compostos em estudo.	45
Figura 5 – Exemplos de halos de inibição fúngica para os compostos em estudo.	46
Figura 6 – Cultura de <i>Escherichia coli</i> em fase exponencial.	49
Figura 7 - Determinação da concentração mínima inibitória de cloranfenicol contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 pelo método de macrodiluição: os valores de absorvância a 630 nm são a média ponderada dos oito poços por concentração de cloranfenicol.	51

## Índice de Tabelas

	Pág.
Tabela I - Principais grupos de compostos antimicrobianos de plantas	21
Tabela II - Estudo de avaliação da actividade antimicrobiana em extractos vegetais	24
Tabela III - Estudos de avaliação da actividade antimicrobiana em óleos essenciais	26
Tabela IV - Avaliação da actividade antibacteriana dos extractos de <i>Genista tenera</i>	41
Tabela V - Avaliação da actividade antifúngica dos extractos <i>Genista tenera</i>	42
Tabela VI - Avaliação da actividade antibacteriana de óleos essenciais	43
Tabela VII - Avaliação da actividade antifúngica de óleos essenciais	44
Tabela VIII - Avaliação da actividade antibacteriana de compostos derivados de lactonas carboximetilglicosiladas	47
Tabela IX - Avaliação da actividade antifúngica de compostos derivados de lactonas carboximetilglicosiladas	48
Tabela X - Determinação da MIC de cloranfenicol contra <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 por macrodiluição	51
Tabela XI - Verificação da influência da fase de crescimento da cultura na determinação da MIC de cloranfenicol contra <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 por microdiluição	52
Tabela XII - Determinação da MIC de cloranfenicol frente a <i>Enterococcus faecalis</i> e a <i>Bacillus cereus</i> .	53
Tabela XIII - Determinação da MIC para os compostos NX2, NX13 e NX15 frente a <i>Enterococcus faecalis</i>	54
Tabela XIV - Determinação da MIC para os compostos NX2 e NX18 frente a <i>Bacillus cereus</i> .	55

## 1.INTRODUÇÃO

A selecção sistemática de seres vivos com o objectivo de encontrar novos compostos bioactivos tem sido uma actividade persistente em muitos laboratórios da área microbiológica e biomédica.

O uso de plantas com o propósito de detectar bioactivos nos seus tecidos é de origem recente. No entanto, a utilização de plantas inteiras ou as suas partes (folhas, cascas, sementes, resinas), é tão antigo quanto a história do homem, especialmente as aplicações médicas, cosméticas, culinárias, entre outras (Dorman e Deans, 2000).

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente activos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos. Os trabalhos na área de produtos naturais vegetais realçam a grande diversidade de estruturas e de propriedades físico-químicas e biológicas dos produtos de origem vegetal. Algumas destas substâncias naturais possuem potencial antimicrobiano e representam provavelmente o maior avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas ou mais. Com o conhecimento obtido com trabalhos relacionados às propriedades terapêuticas das plantas foi possível obter inúmeros medicamentos de extrema importância para medicina como os digitálicos, quinina, atropina, pilocarpina, artemisinina, além de alguns medicamentos usadas no tratamento de cancro como: vimblastina, vincristina, taxol, campotecinas (Simões *et al.*, 2007).

Este progresso, no entanto estende-se a outras áreas, especialmente a alimentar. Apesar das modernas técnicas de higiene no abate e de produção, a segurança alimentar é uma questão de saúde pública cada vez mais importante (WHO, 2002a). Estima-se que cerca de 30% das pessoas nos países industrializados sofrem de uma doença de origem alimentar a cada ano e em 2000, pelo menos dois milhões de pessoas morreram de doenças diarreicas em todo o mundo (WHO, 2002a). Há, portanto, uma necessidade de novos métodos para reduzir ou eliminar microrganismos patogénicos nos alimentos, possivelmente em combinação com os actuais métodos. Além disso, a Organização Mundial da Saúde lançou um alerta para o mundo inteiro sobre

a necessidade da redução do consumo de sal, a fim de reduzir a incidência de doenças cardiovasculares (WHO, 2002b). Se o nível de sal nos alimentos processados for reduzido, outros aditivos serão necessários para manter a segurança dos alimentos. Considerando as tendências actuais para a utilização de aditivos naturais, entre as possibilidades estarão os extractos de plantas e os óleos essenciais como aditivos antimicrobianos.

A maioria dos estudos incidem com especial atenção sobre plantas medicinais, desenvolvendo-se trabalhos sobre actividade antimicrobiana de extractos, óleos essenciais e substâncias isoladas contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos. Uma vez obtido um composto biologicamente activo, pode-se lançar-se estudos envolvendo modificações moleculares, cujo principal objectivo é o de otimizar essa actividade.

### **1.1.Avaliação da actividade antimicrobiana**

A resistência microbiana aos diferentes grupos de antimicrobianos tem vindo a aumentar ao longo dos anos, sobretudo nos ambientes hospitalares com o acréscimo de morbilidade e mortalidade nas infecções. Também as doenças de origem alimentar ou toxinfecções, têm aumentado em todo o mundo, constituindo um dos mais importantes problemas de Saúde Pública a nível mundial (Ferreira *et al.*, 2010).

A análise sistemática de plantas e o desenvolvimento de novos compostos de síntese com finalidade de descobrir novos compostos bioactivos é uma actividade de rotina em muitos laboratórios dedicados à pesquisa neste sentido. Em particular, a busca por componentes com actividade antimicrobiana tem ganhado crescente importância nos últimos tempos, devido à crescente preocupação com o alarmante aumento na taxa de infecção por microrganismos resistentes a antibióticos (Davies, 1994). No entanto, a segurança alimentar microbiológica tem constituído uma questão premente a nível europeu e mundial, uma vez ser determinante no controlo de toxinfecções alimentares (WHO, 2002a).

### 1.1.1.Métodos de avaliação

As orientações relativas ao estudo da susceptibilidade de microrganismos a novas substâncias, com especial incidência para antibióticos, encontram-se normalizadas através dos documentos do antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), da actual *Nacional Comitee for Clinical Laboratory Standarts* (CLSI), da *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BBSAC) e do *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). No entanto, a avaliação da actividade antimicrobiana tem um espectro mais vasto de aplicação, sobretudo aos mais diversificados tipos de extractos de plantas e de óleos essenciais, existindo várias abordagens técnicas (Hammer *et al.*, 1999). No caso de os resultados exigirem uma investigação mais profunda ou uma vez identificados os compostos activos, o seu reconhecimento para fins farmacêuticos passa pela utilização das normas do CLSI ou do EUCAST.

Actualmente, existem vários métodos para avaliar a actividade antibacteriana e antifúngica dos extractos vegetais. Os métodos para avaliação da actividade antibacteriana e antifúngica mais conhecidos incluem método de difusão em ágar ou difusão em placa, métodos de macrodiluição e microdiluição (Ostrosky *et al.*, 2008).

#### 1.1.1.1.Métodos de difusão em meio sólido

O método de difusão em ágar, também designado como método de difusão em placa, é um método físico. Neste método o microrganismo é testado contra um extracto ou substância em meio de cultura sólido, estabelecendo-se uma relação entre a dimensão da zona ou halo de inibição de crescimento do microrganismo em estudo com a concentração do extracto ou substância testada. Neste método a avaliação comparativa implica a utilização de um padrão bioactivo de referência ou controlo positivo e um controlo negativo, normalmente o solvente usado para a diluição do extracto ou da substância. Após a incubação adequada ao microrganismo inoculado, o halo de inibição de crescimento é medido a partir da circunferência do disco ou poço até à margem do crescimento microbiano (Ostrosky *et al.*, 2008).

O método de difusão em placa pode ser realizado utilizando três técnicas diferentes: teste de difusão em disco, teste com cilindros de aço inoxidável e teste de perfuração do ágar. A técnica de difusão em disco foi estabelecida como padrão pelo CLSI e aceite pela FDA (Food and Drug Administration) (Ostrosky *et al.*, 2008).

De acordo com Rabanal e colaboradores (2002, citado por Ostrosky *et al.*, 2008) o teste de difusão em disco consiste na aplicação de 10µl da solução testada em discos de papel de filtro de 6mm de diâmetro, em diferentes concentrações. Vários estudos sugerem que a impregnação do disco de papel com a substância a testar deve ser efectuada antes de colocar nas placas inoculadas, enquanto outros preferem colocar o disco na placa inoculada e depois impregná-lo na substância a testar (Ostrosky *et al.*, 2008).

Segundo Rabanal e colaboradores (2002, citado por Ostrosky *et al.*, 2008) para controlo negativo deve ser utilizado DMSO (dimetilsulfóxido) e para controlo positivo utiliza-se cloranfenicol, para bactérias, e anfotericina B, para fungos. Na realidade, o controlo negativo deve ser efectuado com o composto usado na dissolução do extracto ou substância testada.

Na técnica que utiliza cilindros de aço inoxidável, estes são colocados no meio de cultura já solidificado e inoculado, enquanto nos cilindros é colocado a solução com actividade antimicrobiana em estudo. Na técnica de perfuração do ágar, é efectuado a remoção do meio de cultura sólido com auxílio de cilindros de 6 a 8 mm de diâmetro de modo a que haja formação de poços, nos quais será inoculado o extracto ou a substância a ser analisada (Ostrosky *et al.*, 2008).

#### **1.1.1.2.Métodos de diluição em meio líquido**

O método de diluições sucessivas em meio líquido considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo testado e a concentração do extracto ou da substância ensaiada. A avaliação do crescimento do microrganismo ou da sua ausência é dada pela turvação do meio líquido, comparado em relação a um padrão de referência. Como controlo positivo, utiliza-se no meio de cultura uma substância bioactiva padrão a partir de uma

solução padronizada, e como controlos negativos o meio de cultura da suspensão microbiana e o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra (Ostrosky *et al.*, 2008).

A vantagem do método relaciona-se com a possibilidade de obtenção de resultados quantitativos, sendo possível a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC). No entanto, o valor da MIC de uma substância com características antimicrobianas não é constante, sendo influenciado pela natureza do microrganismo testado, pela quantidade de inóculo, pelo tempo de incubação, pela composição do meio de cultura e pelas condições ambientais, tais como a temperatura, o pH e o arejamento. Quanto todas estas condições são padronizadas, é possível comparar a actividade de diferentes agentes antimicrobianos face a um certo microrganismo e determinar, por exemplo, qual o agente antimicrobiano mais efectivo contra esse microrganismo, ou avaliar a actividade de uma determinada substância relativamente a diferentes microrganismos (Ostrosky *et al.*, 2008). Para a validação de agentes antimicrobianos como os antibióticos é necessário seguir as normas do CLSI ou do EUCAST.

Os métodos de diluição em meio líquido subdividem-se em testes de macrodiluição e testes de microdiluição (Ostrosky *et al.*, 2008).

No método das diluições sucessivas, o teste de macrodiluição é executado em tubos de ensaio com volume de meio de cultura variando entre 1 e 10 mL, suplementado com concentrações crescentes da substância ensaiada. Cada um dos tubos é inoculado com o microrganismo a testar. Terminado o período de incubação, avalia-se o crescimento microbiano, visível através da turvação da cultura. A concentração mínima inibitória do crescimento (MIC) é a concentração mínima da substância para a qual já não se observa crescimento do microrganismo. Para além do trabalho necessário à realização do teste, será necessário dispor de quantidades consideráveis da substância em estudo. No entanto, o método de microdiluição em meio líquido é uma técnica bastante útil para a avaliação determinação de um grande número de amostras, uma vez que utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 100 e 200  $\mu\text{L}$  (Ostrosky *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2010).

A utilização das microplacas torna possível fazer diluições seriadas nos poços consecutivos. Alguns destes poços devem ser utilizados para os controlos. Após a incubação da microplaca, o crescimento microbiano pode ser determinado por leitura espectrofotométrica a 600-630 nm (Das *et al.*, 2010). Como alternativa à avaliação do crescimento, Umeh e colaboradores (2005) utilizam indicadores como sais de tetrazólio ou resazurina, embora os estudos efectuados apontem para a necessidade de padronização do método.

A concentração mais baixa que dá um valor de absorvância próxima de zero é a MIC da substância analisada (Salie *et al.*, 1996).

Uma das principais desvantagens do método de microdiluição é o facto de alguns microrganismos aderirem à base do poço ou em outros casos permanecem em suspensão. Também, a precipitação de alguns compostos com actividade antimicrobiana, como extractos de plantas ou compostos de síntese é uma dificuldade nesta técnica. Em concentrações mais elevadas a presença da coloração verde, proveniente da clorofila das plantas, pode interferir nas leituras de absorvância. No entanto, o método é económico, tem elevada reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos e requer pequena quantidade de amostra (Ostrosky *et al.*, 2008).

### **1.1.2.Factores que influenciam a avaliação da actividade antimicrobiana**

São diversos os factores que afectam a susceptibilidade do método de difusão e de diluição. Desta forma, há necessidade conhecer rigorosamente as condições experimentais de execução do teste (Ostrosky *et al.*, 2008).

#### **1.1.2.1.Meios de cultura**

Os meios de cultura devem proporcionar um crescimento adequado aos microrganismos a serem testados e não devem conter substâncias antagónicas à actividade antimicrobiana em estudo.

No método de difusão em meio sólido, a concentração do ágar e a sua origem podem influenciar os resultados dos ensaios Pinto e colaboradores (2003, citado por Ostrosky *et al.*, 2008). Entre os meios de cultura utilizados para teste de susceptibilidade de bactérias, o meio de *Müller-Hinton* é o mais citado,

outros meios bastante utilizados são os meios de caseína e soja (TSA e TSB) e os meios sólidos ou líquidos Nutrient *Broth/Agar* e *Luria-Bertani* para bactérias (Kaur e Kaur, 2010). Em relação aos fungos são utilizados os meios sólidos ou líquidos de *Sabourand dextrose* (SDA e SDB), o meio sólido de batata e dextrose (PDA) e o meio líquido com extracto de levedura (GYEPA) (Rauter *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008; Ostrosky *et al.*, 2008).

Segundo Ostrosky e colaboradores (2008), vários estudos demonstram a existência de substâncias no meio de cultura que influenciam a sensibilidade da avaliação antimicrobiana: a timidina antagoniza a actividade de sulfonamidas e trimetroprinas, conduzindo a um resultado falso de resistência a tais compostos; o catião  $\text{Na}^+$  aumenta a actividade da bacitracina, do ácido fusídico e da novobiocina contra *Staphylococcus* spp. e da penicilina contra *Proteus* spp.; os catiões  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  reduzem a actividade de aminoglicosídeos e de polimixinas contra *Pseudomonas* spp. e da tetraciclina contra diferentes microrganismos.

#### 1.1.2.2.pH

O pH do meio de cultura deve ser compatível com o crescimento microbiano e com a actividade e estabilidade das substâncias estudadas. O aumento da acidez do meio diminui a actividade antibacteriana de substâncias básicas como a estreptomicina, e por outro lado, provoca o aumento da actividade de substâncias ácidas como a penicilina (Pinto *et al.*, 2003, citado por Ostrosky *et al.*, 2008).

Estudos efectuados por Li-Chang e colaboradores (2005, citado por Ostrosky *et al.*, 2008) avaliaram o efeito da variação da gama de pH (5-9) na actividade antimicrobiana do extracto etanólico de própolis, tendo verificado que o extracto exerceu um efeito bactericida em *Staphylococcus aureus*, após 1,5 a 3 horas de incubação em pH 5 e 6, respectivamente.

### 1.1.2.3. Condições de incubação

A disponibilidade de oxigénio pode influenciar as condições de crescimento dos microrganismos utilizados na avaliação da actividade antimicrobiana considerando que esses microrganismos podem ser aeróbios, anaeróbios ou anaeróbios facultativos (Jay, 2000; Ostrosky *et al.*, 2008).

Em estudos de avaliação da actividade da estreptomicina em *Staphylococcus aureus* pela técnica de macrodiluição, verificou-se que houve pouca influência da disponibilidade de oxigénio (Ostrosky *et al.*, 2008). Por outro lado, Barry e Thornsberry (1991, citado por Ostrosky *et al.*, 2008) verificaram que deve ser evitada uma atmosfera com elevada concentração de dióxido de carbono, uma vez que provoca o pH da superfície do meio de cultura, sendo então capaz alterar o crescimento microbiano e, assim, afectar a actividade antimicrobiana de algumas substâncias.

A temperatura de incubação é um factor a ter em consideração na avaliação da actividade antimicrobiana. A incubação dos microrganismos deve ser feita a 35-37 °C para o crescimento de bactérias e 25 a 27 °C para fungos. No método de difusão as placas devem ser incubadas com o cuidado de se manter uma temperatura homogénea na estufa. No método de diluição, as condições de crescimento dos microrganismos nos tubos devem ser semelhantes, existindo condições que permitam a mesma temperatura e agitação (Ostrosky *et al.*, 2008).

### 1.1.2.4. Características do inóculo microbiano

A quantidade de inóculo microbiano influencia a susceptibilidade dos extractos ou substâncias em estudo. Assim, é essencial que haja padronização do inóculo para cada método desenvolvido (Ostrosky *et al.*, 2008).

Diferentes estudos apontam para valores entre  $10^5$  e  $10^6$  unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL). Existe igualmente uma preocupação com a padronização das condições de preparação do inóculo, devendo ser efectuada a partir de 4 ou 5 colónias da cultura do microrganismo a testar para evitar seleccionar uma estirpe variante atípica. Após o crescimento das colónias 16-18 horas em meio líquido apropriado, a cultura

deve ser diluída. O ajuste da diluição pode ser efectuado utilizando como padrão de leitura a escala McFarland (0,5) ou ajustado através de leitura em espectrofotómetro (Ostrosky *et al.*, 2008).

#### **1.1.2.5. Condições para a avaliação de halos no método de difusão em ágar**

A espessura e a uniformidade do ágar são determinantes para uma boa resolução dos resultados. Deve-se controlar rigorosamente o volume de ágar transferido para a placa de Petri, e o meio de cultura deve ser distribuído de modo a evitar formação de estrias superficiais e bolhas. Quando ocorrem halos de pequenas dimensões, o recurso utilizado é a diminuição do volume do meio, o que leva a diminuição a espessura do meio na placa (Pinto *et al.*, 2003, citado por Ostrosky *et al.*, 2008).

#### **1.1.3. Caracterização de microrganismos utilizados na avaliação da actividade antimicrobiana**

Os grupos de microrganismos estudados na avaliação da actividade antimicrobiana são patogénicos, encontram-se envolvidos em toxinfecções de origem alimentar ou podem estar presentes nos alimentos.

##### **1.1.3.1. Bactérias Gram positivas**

###### ***Bacillus cereus***

As bactérias da espécie *Bacillus cereus* são bactérias Gram positivas, possuem forma de bastonete, apresentam mobilidade e formam esporos. Apresentam uma distribuição ubiqüitária na natureza, em especial no solo e em plantas (Jay, 2000).

Estudos epidemiológicos mostram que a maioria de surtos por contaminação de alimentos ocorre em carne, leite em pó, arroz e em outros produtos de origem vegetal (Doyle e Beuchat, 2007).

A produção de exotoxinas, determina o envolvimento de *Bacillus cereus* em diversas toxinfecções alimentares (Jay, 2000).

### ***Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* é um bastonete Gram positivo, aeróbio facultativo, não patogénico, produtor de ácido acético, formador de esporos, podendo ser frequentemente isolado no solo (Jay, 2000).

Actualmente, *Bacillus subtilis* tem sido utilizado na elaboração de probióticos compostos por *Bacillus*, em comparação com probióticos compostos por bactérias lácticas. A principal vantagem da elaboração de probióticos compostos por *Bacillus* reside na sua capacidade de esporular, o que lhes confere maior sobrevivência durante o trânsito ruminal. Além disso, estes microrganismos multiplicam-se a uma taxa mais rápida do que a de passagem gastrointestinal, ou seja, a da movimentação frequente dos conteúdos ruminal e intestinal (peristaltismo). A ingestão de quantidades significantes de *B. subtilis* restabelece a flora microbiana normal, principalmente após uso prolongado de antibióticos ou em condições de prevalência de diarreia. Preparações de probióticos de *B. subtilis* são comercialmente vendidas na maioria dos países europeus, embora ainda seja pouco compreendido seu benefício terapêutico (Mazza, 1994).

### ***Enterococcus faecalis***

Do género *Enterococcus* faz parte bactérias Gram positivas que se dispõem aos pares e em curtas cadeias, e são catalase negativos. A grande resistência permite uma distribuição diversificada em solos, águas, plantas, microflora nativa de vários alimentos e como membros da microflora intestinal de humanos e animais (Ferreira e Sousa, 2000).

Estes microrganismos foram considerados por muito tempo como comensais, mas o aumento da severidade das infecções nosocomiais causadas por enterococos multirresistentes a antimicrobianos e, a falta de conhecimento sobre seus factores de virulência, geram insegurança na utilização de espécies deste género na produção de alimentos como culturas fermentadoras e/ou probióticas (Ferreira e Sousa, 2000; Jay, 2006).

Mais de 90% das infecções humanas enterocócicas são causadas por *Enterococcus faecalis*, sendo as restantes causadas por *E. faecium* (Paradella *et al.*, 2007).

Nos Estados Unidos estudos revelaram que as bactérias do género *Enterococcus* tornaram-se o segundo grupo microbiano mais comum observado em infecções cirúrgicas, infecções nosocomiais e do tracto urinário, e a terceira mais comum infecção hospitalar (d' Azevedo *et al.*, 2004).

### ***Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* é um bastonete Gram positivo, anaeróbio facultativo, catalase positivo, oxidase negativo. Apresenta mobilidade à temperatura ambiente e é uma espécie hemolítica (Ferreira e Sousa, 2000; Jay, 2000).

É uma bactéria ubiquitária, tendo sido isolada do meio ambiente e de animais, incluindo o Homem. Vários estudos revelam que na população humana existe 1 a 5% de portadores assintomáticos (Jay, 2000; Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Matthews, 2008).

A maioria das infecções humanas parece estar associada ao contacto com animais infectados, ingestão de alimentos (leite, carnes, vegetais), especialmente quando estes produtos são congelados. As infecções podem constituir situações graves em grupos de risco como grávidas, crianças e idosos (Doyle e Beuchat, 2007).

### ***Staphylococcus aureus***

O género *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae* e compreende várias espécies, nomeadamente *Staphylococcus aureus*. São cocos Gram positivos, imóveis, capsulados, normalmente agrupados em cacho (Jay, 2000; Doyle e Beuchat, 2007).

Em indivíduos saudáveis são encontrados na pele e nas fossas nasais, no entanto podem causar infecções graves na pele (foliculite, furúnculo), pneumonia, meningite, endocardite, septicemia, entre outras. As doenças causadas por *Staphylococcus aureus* podem ser devidas à invasão e lesão dos

tecidos ou resultar da acção das suas toxinas. As estirpes de *S. aureus* são agentes frequentes de infecções adquiridas em ambiente hospitalar (Ferreira e Sousa, 2000).

A sua presença nos alimentos resulta de contaminações cruzadas com os manipuladores, sendo utilizados como indicadores de higiene. As intoxicações alimentares resultam da produção de coagulase (enzima que pode provocar a coagulação do plasma) ou de enterotoxinas estafilocócicas (Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Matthews, 2008).

### **1.1.3.2. Bactérias Gram negativas**

#### ***Escherichia coli***

As bactérias da espécie *Escherichia coli* são bastonetes Gram negativos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, encontradas no tracto intestinal de seres humanos e animais, e fazem parte da microflora nativa, embora estejam relacionadas com diversas infecções (Ferreira e Sousa, 2000).

Na área alimentar é um dos indicadores mais fiáveis de contaminação de origem fecal, sendo importante para o controlo da higiene dos géneros alimentícios (Jay, 2000).

*Escherichia coli* apresenta grande diversidade patogénica por produzirem enterotoxinas e são classificadas em cinco categorias (enteroxigénica - ETEC, enteroinvasora - EIEC, enteropatogénica - EPEC, enterohemorrágica - EHEC e enteroagregativa - EaggEC) de acordo com o grau de invasão celular, causando enterites e gastroenterites por mecanismos diferentes. É ainda considerada a causa mais comum de infecção no tracto urinário, meningite, e outras infecções extra-intestinais e a infecções hospitalares (Jay, 2000; Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Matthews, 2008).

#### ***Salmonella spp.***

As bactérias do género *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*. São bactérias Gram negativas em forma de bastonete, anaeróbias facultativas e não facultativas formam esporos. A maioria das

salmonelas é móvel por flagelos, ocorrendo estirpes móveis e estirpes não móveis, como resultado de flagelos disfuncionais (Montville e Matthews, 2008).

As bactérias do género *Salmonella* encontram-se presentes, de uma forma geral, no meio ambiente. A maioria dos casos de salmonelose resulta da ingestão de alimentos e de água contaminada ou por contacto fecal-oral. *S. enteritidis* encontra-se presente, geralmente, em pequenas quantidades, no tracto gastrointestinal de muitos mamíferos e aves (Jay, 2000).

A nomenclatura dos diferentes sorótipos é uma questão em aberto, sendo efectuada com recurso à caracterização da estrutura antigénica das estirpes e utiliza-se o nome do serótipo como sendo o nome da espécie (*Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*) (Montville e Matthews, 2008).

### 1.1.3.3.Fungos

Os fungos são microrganismos eucariontes, heterotróficos, aeróbios e reproduzem-se por esporos assexuados e/ou sexuados. São seres vivos ubiqüitários, morfologicamente unicelulares (leveduras) ou pluricelulares (fungos filamentosos). Sobre a classificação dos fungos ainda existem diferentes opiniões, segundo Ferreira e colaboradores (2010) as principais classes dos fungos verdadeiros (*Eumicota*) são: *Citridiomycetes*, *Zigomicetes*, *Ascomycetes*, *Arciascymycetes*, *Basidiomycetes* e *Deuteromycetes (Fungi imperfecti)*.

Os fungos podem ser, maioritariamente, patogénicos para o Homem, para as plantas ou terem uma vasta aplicação na área alimentar. Neste contexto, a sua utilização em estudos de actividade antimicrobiana é da maior importância, uma vez que a disponibilidade de substâncias antifúngicas é muito menor que a de substâncias antibacterianas.

Uma das áreas de interfase entre a área alimentar e a patologia humana, reside no facto de algumas espécies de fungos filamentosos produzirem metabolitos secundários com propriedades tóxicas, designados como micotoxinas, responsáveis por micotoxicoses (Santos *et al.*, 1998; ICMSF, 2000). Por exemplo, as aflatoxinas são produzidas por três espécies de

*Aspergillus*, as fumonisinas são produzidas por três espécies de *Fusarium* e o ácido penicílico é produzido por *Penicillium autogriseum*.

Os problemas com micotoxinas também surgem na alimentação animal, especialmente com o desenvolvimento das técnicas de aprovisionamento de alimentos. Sendo a alimentação animal constituída por oleaginosas, cereais e os seus derivados, a contaminação por fungos como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, coloca questões de segurança devido à produção de micotoxinas e à contaminação de rações para animais (Santos *et al.*, 1998; Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Matthews, 2008).

No Homem alguns fungos são principalmente dermatófitos. Entre as leveduras, *Candida albicans* é responsável por infecções cutâneas e das mucosas. As infecções por *Aspergillus* ocorrem com bastante frequência em pessoas com problemas imunológicos, sendo responsáveis por infecções brônquicas, embora também possa afectar o sistema nervoso e o tracto gastrointestinal (Talaro–Talaro, 2002).

A podridão cinzenta é uma doença fúngica de importância mundial na cultura de diversas plantas. A espécie *Botrytis cinerea* é a mais frequentemente associada a várias culturas, efectuadas em campo ou em estufa, ou mesmo já em câmaras de armazenamento. A podridão cinzenta causa prejuízos estéticos, qualitativos e quantitativos e pode estar associada a diferentes espécies do género *Botrytis* (Jay, 2000; Doyle e Beuchat, 2007; Montville e Matthews, 2008).

## **1.2.Avaliação de actividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas**

Estima-se que há 250.000 a 500.000 espécies de plantas na Terra. Uma percentagem relativamente pequena (1-10%) das quais são utilizadas como alimentos pelos seres humanos e outras espécies animais ou são utilizadas para fins medicinais (Cowan, 1999).

As plantas têm uma capacidade quase ilimitada para sintetizar substâncias aromáticas, a maioria dos quais são fenóis ou seus derivados.

Estas substâncias são na maioria metabolitos secundários, dos quais pelo menos 12.000 foram isolados (10% do total). Em muitos casos, essas substâncias servem como mecanismos de defesa das plantas contra a predação por microrganismos, insectos e herbívoros. Alguns, como os terpenóides, são responsáveis pelos odores, outros (quinonas e taninos) são responsáveis pela pigmentação da planta. Muitos compostos são responsáveis pelos aromas da planta como é o caso das ervas aromáticas e especiarias, de utilização culinária ou medicinal (Cowan, 1999).

As propriedades das plantas medicinais e aromáticas e dos seus extractos são conhecidos desde a antiguidade, mas a caracterização destas propriedades começou no início do século XX (Dorman e Deans, 2000). A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, num ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (Veiga *et al.*, 2005).

Recentemente, a aceitação da medicina tradicional como uma forma alternativa de cuidados de saúde e o desenvolvimento da resistência microbiana aos antibióticos disponíveis levou à investigação da actividade antimicrobiana de plantas medicinais. Durante as duas últimas décadas, foi feito um grande esforço para descobrir compostos químicos de origem vegetal com actividade antibacteriana ou antifúngica. As plantas medicinais com potencial antimicrobiana representam uma vasta fonte inexplorada de produtos farmacêuticos e é necessária mais exploração desses mesmos compostos que podem ser úteis para o tratamento de doenças infecciosas, tanto em plantas e seres humanos e simultaneamente para a prevenção de muitos efeitos que estão, frequentemente, associados aos antimicrobianos sintéticos (Das *et al.*, 2010).

A avaliação de uma substância antimicrobiana de origem vegetal, inicia-se com avaliação biológica completa de extractos vegetais para assegurar eficácia e segurança, seguida pela identificação de princípios activos, formulações de dosagem, eficácia e farmacocinética do perfil do novo medicamento.

### 1.2.1. Extractos vegetais

A qualidade do extracto da planta depende do material vegetal, que tem de ser quantificável para estabelecer uma variação admissível desse componente, da escolha dos solventes e do método utilizado (Das *et al.*, 2010). Frequentemente procura-se isolar os componentes do extracto de modo a obter um princípio activo específico. No entanto, a conjugação de diversos componentes pode ser necessária para garantir a eficácia do extracto em estudo (Das *et al.*, 2010).

Os extractos podem ser obtidos de várias partes da planta, como por exemplo, do caule, folhas, flores, rizoma, entre outras.

Existem várias metodologias descritas para a preparação de extractos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos. No entanto, o sucesso da determinação de compostos biologicamente activos a partir de material vegetal está dependente do tipo de solvente utilizado no processo de extracção. As propriedades de um bom solvente em extracções de plantas incluem baixa toxicidade, facilidade de evaporação a baixa temperatura, promoção da rápida absorção fisiológica do extracto, a acção de conservação e incapacidade do extracto se dissociar. Como o produto final na extracção deverá conter vestígios de solvente residual, o solvente deve ser não-tóxico e não deve interferir com o bioensaio. A escolha também vai depender dos compostos-alvo a serem extraídos. A triagem inicial de plantas para possível actividade antimicrobiana começa tipicamente utilizando o álcool em bruto e pode ser seguido por vários métodos de extracção com um solvente orgânico (Das *et al.*, 2010).

A água é um solvente universal, usado para extrair da planta produtos com actividade antimicrobiana. No entanto, os extractos vegetais extraídos com solventes orgânicos permitiram dar mais consistência à actividade antimicrobiana em relação aos extractos aquosos. Segundo Das e colaboradores (2010) foram avaliados 20 solventes diferentes, tendo sido verificado que o clorofórmio foi o melhor solvente para a extracção de compostos biológicos activos não-polares. Uma vez que quase todos os compostos antimicrobianos de plantas identificados são compostos aromáticos

saturados ou compostos orgânicos, são muitas vezes obtidos através do etanol ou metanol na extracção inicial. No mesmo estudo foi considerado que a maioria dos solventes usados para investigações preliminares da actividade antimicrobiana de plantas é o metanol, o etanol e a água.

Um dos métodos que se considera ser o mais adequado para a análise químico-farmacológica é a preparação de um extracto hidroalcoólico (etanol/água 50/50, v/v). Este extracto é análogo às tinturas realizadas na cultura popular, onde se misturam as partes activas das plantas com bebidas alcoólicas. Caso o extracto apresente efeitos biológicos de interesse, deve-se proceder a um método sistemático de estudo. Neste caso, o solvente mais adequado para obtenção do extracto bruto é o metanol, pois possibilita a extracção de um maior número de compostos. Posteriormente, este extracto deve ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, como hexano, diclorometano, acetato de etilo e butanol, visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades. Outros solventes de polaridades similares também podem ser utilizados. No sentido de localizar os princípios activos, todos os extractos semi-puros devem ser testados e aquele que apresentar efeito biológico de interesse, deverá ser submetido aos procedimentos cromatográficos para o isolamento e a purificação dos compostos (Filho e Yunes, 1998).

### **1.2.2. Óleos essenciais**

As especiarias e ervas aromáticas são usadas há milhares de séculos, por muitas culturas para melhorar o sabor e aroma dos alimentos. As primeiras civilizações reconheceram, também, a importância de usar especiarias e ervas aromáticas para conservação de alimentos e para tratamentos medicinais. Tendo em consideração todo o conhecimento empírico, tornou-se relevante avaliar os efeitos antimicrobianos e características medicinais de muitas das especiarias e ervas aromáticas usadas actualmente (Ceylan e Fung, 2004).

Os compostos antimicrobianos em especiarias e ervas aromáticas são encontrados, principalmente, na fracção do óleo essencial (Ceylan e Fung, 2004).

Os óleos essenciais (EO) são líquidos aromáticos provenientes de hidrocarbonetos obtidos a partir de material vegetal (como por exemplo, flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes). Julga-se que o termo *óleo essencial* deriva do nome inventado pelo reformador suíço de medicina, *Paracelsus Von Hohenheim*. Estima-se que são conhecidos 3000 EO, dos quais cerca de 300 são comercialmente importantes, destinando-se principalmente para os sabores e aromas (Silva, 2010). A produção de EO esteve desde sempre associado a farmácias, no entanto o seu uso não foi generalizado na Europa até ao século XVI (Burt, 2007). A utilização do óleo da árvore do chá, com poderes anti-sépticos para fins medicinais, encontra-se documentada desde a colonização da Austrália, no final do século XVIII (Carson e Riley, 1993).

Os EO possuem componentes que são voláteis à temperatura ambiente, derivam, na maioria das vezes, do metabolismo secundário, onde são produzidos e armazenados em estruturas secretoras próprias formadas nas folhas, flores, ramos/caules ou raízes de diversas espécies (Burt, 2007; Kamatou *et al.*, 2007).

Os EO possuem características lipofílicas, solúveis em lípidos e álcoois, podendo, em alguns casos, ser facilmente oxidados por exposição à luz e em outros casos extremamente voláteis. Assim, o armazenamento deverá ser realizado em embalagens herméticas e escuras para não haver alterações na sua composição. Os óleos são normalmente extraídos de plantas por processos específicos, sendo dotados de aroma forte quase sempre agradável (Burt, 2007; Coelho, 2009).

Segundo Van de Braak e Leijten (1999, citado por Burt, 2007) os EO podem ser obtidos por diversos meios, nomeadamente fermentação e por extracção. Na extracção, o método de destilação a vapor é o mais utilizado para a produção comercial de EO, uma vez ser também o mais antigo. A destilação foi usada pela primeira vez no Oriente (Egipto, Índia e Pérsia) há mais de 2000 anos atrás e foi melhorado no século IX pelos povos árabes. O

primeiro relato escrito autêntico de destilação de óleos essenciais é atribuída a um médico catalão *Villanova* (1235-1311) (Burt, 2007).

Como referido anteriormente, a destilação a vapor é o método comercialmente mais utilizado para a produção de EO. No entanto, método de extracção por dióxido de carbono líquido sob baixas temperatura ou alta pressão produz um perfil mais natural e com melhores características tanto organolépticas como antimicrobianas, mas muito mais caro. Facto este confirmado pelo estudo comparativo entre a extracção de EO da erva-do-chá com hexano e pelo método a vapor. Verifica-se que os compostos extraídos com hexano apresentam maior actividade antimicrobiana do que com o método a vapor (Burt, 2007).

De acordo com vários estudos químicos verifica-se que os terpenos são os principais compostos responsáveis pela aplicação medicinal, culinária ou cosmética das plantas medicinais e aromáticas (Dorman e Deans, 2000). Em alguns casos os terpenos das essências, que são hidrossolúveis, tem maior capacidade antibacteriana que outros (Silva, 2010).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais, a forma de actuação e suas aplicações têm sido uma área de investimento a nível da investigação, resultado do regresso a técnicas tradicionais para controlo do desenvolvimento microbiano em animais e alimentos, especialmente em países industrializados (Dorman e Deans, 2000).

Actualmente na União Europeia (UE) a maior utilização de EO é direccionada para a alimentação (como aromas), para perfumes (fragrâncias e *aftershaves*) e para a área farmacêutica (pelas suas propriedades funcionais) (Burt, 2007). Relativamente a outras utilizações dos EO, sabe-se que o seu uso em aromaterapia constitui pouco mais de 2% do mercado total. A actividade antibacteriana de óleos essenciais e os seus componentes são exploradas em diversos produtos como anti-sépticos (Cox *et al.*, 2000) ou suplementos para alimentação animal em lactação (Burt, 2007).

### **1.2.3. Avaliação da actividade antimicrobiana de extractos vegetais e óleos essenciais**

#### **1.2.3.1. Avaliação da actividade antimicrobiana de extractos vegetais**

Os principais grupos de compostos antimicrobianos foram descritos num trabalho de revisão de Cowan (1999). As compilações dos estudos efectuados entre os anos 70 e 90 encontram-se na Tabela I.

Apesar dos estudos sobre a aplicação das plantas ou dos seus extractos serem tão antigos quanto o conhecimento do Homem e das suas actividades medicinais ou culinárias, todo o século XXI tem sido marcado pelo aprofundamento de estudos utilizando as plantas para a resposta a muitos dos problemas e questões que se colocam à nossa sociedade actual. Neste sentido efectuou-se um levantamento dos estudos desenvolvidos nos últimos cinco anos em extractos vegetais, dando relevo ao tipo de actividade antimicrobiana analisada e à área de aplicação (Tabela II).

Nos estudos efectuados observou-se uma maior incidência sobre a avaliação de actividade antibacteriana e apenas um dos trabalhos desenvolvidos perspectivava uma aplicação alimentar.

#### **1.2.3.2. Avaliação da actividade antimicrobiana de óleos essenciais**

Os testes e avaliações da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais podem ser dificultados pela volatilidade do óleo, sua insolubilidade em água e sua complexidade química. Tais dificuldades tornam os resultados disponíveis na literatura, difíceis de comparar. Por outro lado, os métodos usados são muito diversificados. Assim, concluiu-se que alguns factores devem ser levados em consideração, tais como: a técnica usada, o meio de cultura, concentração do inóculo, o óleo essencial e do soluto utilizado. Portanto, para a realização de testes que visam verificar a actividade antimicrobiana de óleos essenciais, é necessário definir e adoptar uma metodologia adequada e bem padronizada (Nascimento *et al.*, 2007).

Tabela I - Principais grupos de compostos antimicrobianos de plantas

Common name	Scientific name	Compound	Class	Activity <sup>d</sup>
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	?		Gram-positive organisms
Allspice	<i>Pimenta dioica</i>	Eugenol	Essential oil	General
Aloe	<i>Aloe barbadensis</i> , <i>Aloe vera</i>	Latex	Complex mixture	<i>Corynebacterium</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>S. aureus</i>
Apple	<i>Malus sylvestris</i>	Phloretin	Flavonoid derivative	General
Ashwagandha	<i>Withania somniferum</i>	Withafarin A	Lactone	Bacteria, fungi
Aveloz	<i>Euphorbia tirucalli</i>	?		<i>S. aureus</i>
Bael tree	<i>Aegle marmelos</i>	Essential oil	Terpenoid	Fungi
Balsam pear	<i>Momordica charantia</i>	?		General
Barberry	<i>Berberis vulgaris</i>	Berberine	Alkaloid	Bacteria, protozoa
Basil	<i>Ocimum basilicum</i>	Essential oils	Terpenoids	<i>Salmonella</i> , bacteria
Bay	<i>Laurus nobilis</i>	Essential oils	Terpenoids	Bacteria, fungi
Betel pepper	<i>Piper betel</i>	Catechols, eugenol	Essential oils	General
Black pepper	<i>Piper nigrum</i>	Piperine	Alkaloid	Fungi, <i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i>
Blueberry	<i>Vaccinium</i> spp.	Fructose	Monosaccharide	<i>E. coli</i>
Brazilian pepper tree	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Terebinthone	Terpenoids	General
Buchu	<i>Barosma setulina</i>	Essential oil	Terpenoid	General
Burdock	<i>Arctium lappa</i>		Polyacetylene, tannins, terpenoids	Bacteria, fungi, viruses
Buttercup	<i>Ranunculus bulbosus</i>	Protoanemonin	Lactone	General
Caraway	<i>Carum carvi</i>		Coumarins	Bacteria, fungi, viruses
Cascara sagrada	<i>Rhamnus purshiana</i>	Tannins	Polyphenols Anthraquinone	Viruses, bacteria, fungi
Cashew	<i>Anacardium pulsatilla</i>	Salicylic acids	Polyphenols	<i>P. acnes</i> Bacteria, fungi
Castor bean	<i>Ricinus communis</i>	?		General
Ceylon cinnamon	<i>Cinnamomum verum</i>	Essential oils, others	Terpenoids, tannins	General
Chamomile	<i>Matricaria chamomilla</i>	Anthemic acid	Phenolic acid	<i>M. tuberculosis</i> , <i>S. typhi-</i> <i>murium</i> , <i>S. aureus</i> , helminths
Chapparal	<i>Larrea tridentata</i>	Nordihydroguai- aretic acid	Coumarins Lignan	Viruses Skin bacteria
Chili peppers, paprika	<i>Capsicum annuum</i>	Capsaicin	Terpenoid	Bacteria
Clove	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	Terpenoid	General
Coca	<i>Erythroxylum coca</i>	Cocaine	Alkaloid	Gram-negative and -positive cocci
Cockle	<i>Agrostemma githago</i>	?		General
Coltsfoot	<i>Tussilago farfara</i>	?		General
Coriander, cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	?		Bacteria, fungi
Cranberry	<i>Vaccinium</i> spp.	Fructose Other	Monosaccharide	Bacteria
Dandelion	<i>Taraxacum officinale</i>	?		<i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i>
Dill	<i>Anethum graveolens</i>	Essential oil	Terpenoid	Bacteria
Echinacea	<i>Echinaceae</i> <i>angustifolia</i>	?		General
Eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i>	Tannin —	Polyphenol Terpenoid	Bacteria, viruses
Fava bean	<i>Vicia faba</i>	Fabatin	Thionin	Bacteria
Gamboge	<i>Garcinia hanburyi</i>		Resin	General
Garlic	<i>Allium sativum</i>	Allicin, ajoene	Sulfoxide Sulfated terpenoids	General
Ginseng	<i>Panax notoginseng</i>		Saponins	<i>E. coli</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Tricho-</i> <i>phyton</i>
Glory lily	<i>Gloriosa superba</i>	Colchicine	Alkaloid	General
Goldenseal	<i>Hydrastis canadensis</i>	Berberine, hydrastine	Alkaloids	Bacteria, <i>Giardia duodenale</i> , trypanosomes Plasmodia
Gotu kola	<i>Centella asiatica</i>	Asiatocside	Terpenoid	<i>M. leprae</i>
Grapefruit peel	<i>Citrus paradisa</i>		Terpenoid	Fungi

Retirado de Cowan (1999)

Tabela I (continuação) - Principais grupos de compostos antimicrobianos de plantas

Common name	Scientific name	Compound	Class	Activity <sup>d</sup>
Green tea	<i>Camellia sinensis</i>	Catechin	Flavonoid	General <i>Shigella</i> <i>Vibrio</i> <i>S. mutans</i> Viruses
Harmel, rue	<i>Peganum harmala</i>	?		Bacteria, fungi
Hemp	<i>Cannabis sativa</i>	$\beta$ -Resercyclic acid	Organic acid	Bacteria and viruses
Henna	<i>Lawsonia inermis</i>	Gallic acid	Phenolic	<i>S. aureus</i>
Hops	<i>Humulus lupulus</i>	Lupulone, humulone	Phenolic acids (Hemi)terpenoids	General
Horseradish	<i>Armoracia rusticana</i>	—	Terpenoids	General
Hyssop	<i>Hyssopus officinalis</i>	—	Terpenoids	Viruses
(Japanese) herb	<i>Rabdosia trichocarpa</i>	Trichorabdol A	Terpene	<i>Helicobacter pylori</i>
Lantana	<i>Lantana camara</i>	?		General
—	<i>Lawsonia</i>	Lawsonone	Quinone	<i>M. tuberculosis</i>
Lavender-cotton	<i>Santolina chamaecyparissus</i>	?		Gram-positive bacteria, <i>Candida</i>
Legume (West Africa)	<i>Milletia thonningii</i>	Alpinumisoflavone	Flavone	<i>Schistosoma</i>
Lemon balm	<i>Melissa officinalis</i>	Tannins	Polyphenols	Viruses
Lemon verbena	<i>Aloysia triphylla</i>	Essential oil	Terpenoid ?	<i>Ascaris</i> <i>E. coli</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. aureus</i>
Licorice	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Glabrol	Phenolic alcohol	<i>S. aureus</i> , <i>M. tuberculosis</i>
Lucky nut, yellow	<i>Thevetia peruviana</i>	?		<i>Plasmodium</i>
Mace, nutmeg	<i>Myristica fragrans</i>	?		General
Marigold	<i>Calendula officinalis</i>	?		Bacteria
Mesquite	<i>Prosopis juliflora</i>	?		General
Mountain tobacco	<i>Amica montana</i>	Helanins	Lactones	General
Oak	<i>Quercus rubra</i>	Tannins	Polyphenols	
		Quercetin (available commercially)	Flavonoid	
Olive oil	<i>Olea europaea</i>	Hexanal	Aldehyde	General
Onion	<i>Allium cepa</i>	Allicin	Sulfoxide	Bacteria, <i>Candida</i>
Orange peel	<i>Citrus sinensis</i>	?	Terpenoid	Fungi
Oregon grape	<i>Mahonia aquifolia</i>	Berberine	Alkaloid	<i>Plasmodium</i> Trypanosomes, general
Pao d'arco	<i>Tabebuia</i>	Sesquiterpenes	Terpenoids	Fungi
Papaya	<i>Carica papaya</i>	Latex	Mix of terpenoids, organic acids, alkaloids	General
Pasque-flower	<i>Anemone pulsatilla</i>	Anemonins	Lactone	Bacteria
Peppermint	<i>Mentha piperita</i>	Menthol	Terpenoid	General
Periwinkle	<i>Vinca minor</i>	Reserpine	Alkaloid	General
Peyote	<i>Lophophora williamsii</i>	Mescaline	Alkaloid	General
Poinsettia	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	?		General
Poppy	<i>Papaver somniferum</i>	Opium	Alkaloids and others	General
Potato	<i>Solanum tuberosum</i>	?		Bacteria, fungi
Prostrate knotweed	<i>Polygonum aviculare</i>	?		General
Purple prairie clover	<i>Petalostemum</i>	Petalostemumol	Flavonol	Bacteria, fungi
Quinine	<i>Cinchona</i> sp.	Quinine	Alkaloid	<i>Plasmodium</i> spp.
Rauwolfia, chandra	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Reserpine	Alkaloid	General
Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Essential oil	Terpenoid	General
Sainfoin	<i>Onobrychis viciifolia</i>	Tannins	Polyphenols	Ruminal bacteria
Sassafras	<i>Sassafras albidum</i>	?		Helminths
Savory	<i>Satureja montana</i>	Carvacrol	Terpenoid	General
Senna	<i>Cassia angustifolia</i>	Rhein	Anthraquinone	<i>S. aureus</i>
Smooth hydrangea, seven barks	<i>Hydrangea arborescens</i>	?		General
Snakeplant	<i>Rivea corymbosa</i>	?		General
St. John's wort	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin, others	Anthraquinone	General
Sweet flag, calamus	<i>Acorus calamus</i>	?		Enteric bacteria
Tansy	<i>Tanacetum vulgare</i>	Essential oils	Terpenoid	Helminths, bacteria
Tarragon	<i>Artemisia dracunculus</i>	Caffeic acids, tannins	Terpenoid  Polyphenols	Viruses, helminths

Retirado de Cowan (1999)

Tabela I (continuação) - Principais grupos de compostos antimicrobianos de plantas

Common name	Scientific name	Compound	Class	Activity <sup>d</sup>
Thyme	<i>Thymus vulgaris</i>	Caffeic acid Thymol Tannins	Terpenoid Phenolic alcohol Polyphenols	Viruses, bacteria, fungi
Tree bard	<i>Podocarpus nagi</i>	— Totarol Nagilactone	Flavones Flavonol Lactone	<i>P. acnes</i> , other gram-positive bacteria Fungi
Tua-Tua	<i>Jatropha gossypifolia</i>	?		General
Turmeric	<i>Curcuma longa</i>	Curcumin Turmeric oil	Terpenoids	Bacteria, protozoa
Valerian	<i>Valeriana officinalis</i>	Essential oil	Terpenoid	General
Willow	<i>Salix alba</i>	Salicin Tannins Essential oil	Phenolic glucoside Polyphenols Terpenoid	
Wintergreen	<i>Gaultheria procumbens</i>	Tannins	Polyphenols	General
Woodruff	<i>Galium odoratum</i>	—	Coumarin	General Viruses
Yarrow	<i>Achillea millefolium</i>	?		Viruses, helminths
Yellow dock	<i>Rumex crispus</i>	?		<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i>

Retirado de Cowan (1999)

Tabela II - Estudo de avaliação da actividade antimicrobiana em extractos vegetais

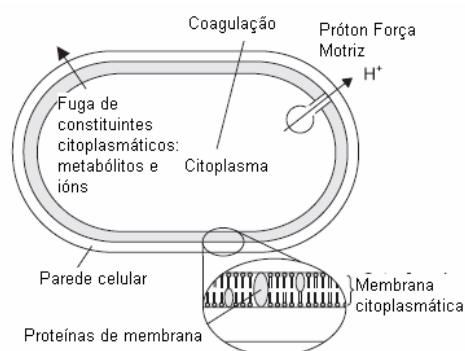
Ano/Autor	Planta em estudo	Actividade antimicrobiana	Aplicações
Fernandes <i>et al.</i> , 2005	<i>Plathymenia reticulata</i> <i>Hymenaea courbaril</i>	Antibacteriana e antifúngica	Controlo microbiano
Michelin <i>et al.</i> , 2005	<i>Artemisia absinthium</i> L. <i>Mentha pulegium</i> L. <i>Punica granatum</i> L. <i>Xanthosema violaceum</i> Schott <i>Syzygium cuminii</i> L.	Antibacteriana e antifúngica	
Duraipandiyan <i>et al.</i> , 2006	Plantas indianas	Antibacteriana Antifúngica	
Gur <i>et al.</i> , 2006	<i>Rhizoma Curcumae longae</i> <i>Rhizoma zingiberis</i> <i>Semen lini</i>	Antibacteriana	Novas terapias para doenças infecciosas
Al-Bakri <i>et al.</i> , 2007	<i>Hypericum triquetrifolium</i> <i>Ballota undulata</i> <i>Ruta chalepensis</i>	Antibacteriana	Medicinal
Nogueira <i>et al.</i> 2007	Extracto de propólis	Antibacteriana	Medicina dentária
Ushimaru <i>et al.</i> , 2007	<i>Caryophyllus aromaticus</i>	Antibacteriana	
Magro <i>et al.</i> , 2008	<i>Achillea millefolium</i> Brassica <i>oleracea</i> var. <i>capitata</i> <i>Cyperus rotundus</i> <i>Plectranthus barbatus</i> <i>Porophyllum ruderale</i> (jacq.) cass <i>Sonchus oleraceus</i>	Antifúngica	Conservação de produtos alimentares
Rosa <i>et al.</i> , 2008	<i>Achillea Millefolium</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> <i>Cyperus rotundus</i> <i>Plectranthus barbatus</i> <i>Porophyllum ruderale</i> (jacq.) Cass <i>Sonchus oleraceus</i>	Actividade protectora	Aplicação em fitocosméticos com propriedade fotoprotetora
Costa <i>et al.</i> , 2009	<i>Rosmarinus officinalis</i> Linn <i>Syzygium cumini</i> Linn	Antifúngica	Tratamento de infecções fúngicas
Itako <i>et al.</i> , 2009	<i>Achillea millefolium</i> <i>Artemisia amphorata</i> <i>Cymbopogon citratus</i> <i>Rosmarinus officinalis</i>	Antifúngica	Agricultura
Palmeira <i>et al.</i> , 2009	<i>Anadenanthera macrocarpa</i>	Antibacteriana	
Valarmathy <i>et al.</i> , 2010	<i>Moringa oleifera</i> <i>Musa paradisiaca</i> <i>Azardiratica indica</i> (Neem), <i>Cynodon dactylon</i> (Grass), <i>Alternanthera sessilis</i> (Ponnangkani), <i>Anisochilus carnosus</i>		Medicinal
Omer <i>et al.</i> , 2011	<i>Commiphora myrrha</i>	Antibacteriana Antifúngica	Conservação de produtos alimentares e/ou medicinal

Na Tabela III verifica-se que a maioria dos estudos efectuados nos últimos cinco anos, incidem sobre a avaliação de actividade antibacteriana e apenas dois dos trabalhos desenvolvidos perspectivam uma aplicação alimentar. Aliás estas abordagens são muito semelhantes às verificadas para os extractos vegetais (Tabela II).

#### 1.2.3.2.1. Mecanismo de acção antimicrobiana

Embora seja reconhecida a importância das propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais e dos seus componentes, o mecanismo de acção não se encontra completamente esclarecido (Lambert *et al.*, 2001). Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes no EO, é mais provável que a sua actividade antibacteriana não seja atribuível a um mecanismo específico, mas a vários alvos na célula (Carson *et al.*, 2002).

De acordo com a Figura 1, na célula bacteriana os locais de acção para os componentes de produtos naturais são a membrana citoplasmática, onde pode ocorrer desagregação das proteínas membranares, destabilização da força motriz de prótons e do fluxo de electrões, alterações do transporte activo e coagulação do conteúdo da célula (Burt, 2007; Silva, 2010).



**Figura 1 - Locais de acção de compostos naturais na célula bacteriana.  
Retirado de Silva, 2010**

Tabela III - Estudos de avaliação da actividade antimicrobiana em óleos essenciais

Ano/Autor	Planta em estudo	Actividade antimicrobiana	Aplicação
Prabuseenivasan <i>et al.</i> , 2006	21 Plantas diferentes	Antibacteriana	Suplemento antibacteriano
Sabulal <i>et al.</i> , 2006	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Antibacteriana	Agricultura
Vasinauskiene <i>et al.</i> , 2006	<i>Amomum cannicarpum</i>	Antibacteriana Antifúngica	Medicinal
Ferronato <i>et al.</i> , 2007	<i>Baccharis dracunculifoli</i> <i>Baccharis uncinella</i>	Antibacteriana	Medicinal
Nogueira <i>et al.</i> , 2007	<i>Extracto de propólis</i>	Antibacteriana	Medicina dentária
Chanthaphon <i>et al.</i> , 2008	<i>Citrus spp.</i>	Antibacteriana Antifúngica	Conservação de produtos alimentares
Chitravadivu <i>et al.</i> , 2009	<i>Plantas medicinais do sul da Índia</i>	Antibacteriana Antifúngica	-
Stieven <i>et al.</i> , 2009	<i>Eugenia pyriformis</i>	Antibacteriana	Conservação de produtos alimentícios
Mihajilov-Krstev <i>et al.</i> , 2010	<i>Satureja hortensis L.</i>	Antibacteriana	-
Abdoul-Latif <i>et al.</i> , 2010	<i>Jasminum sambac</i>	Antibacteriana Antifúngica	-
Kaur <i>et al.</i> , 2010	<i>Woodfordia fruticosa</i>	Antibacteriana	Medicinal

Uma outra característica importante, responsável pela acção antimicrobiana que os óleos essenciais apresentam, é a composição em componentes hidrofóbicos que permitem a separação dos lipídios da membrana celular, desintegrando as estruturas e tornando-as mais permeáveis (Silva, 2010).

Após alguns estudos verificou-se que nem todos estes mecanismos são alvos separados, alguns são afectados como consequência da falência de outro mecanismo (Burt, 2007).

A estrutura química dos componentes individuais dos EO afecta o modo de acção da actividade antibacteriana. Sabe-se que a presença do grupo hidroxilo é importante, no entanto a sua posição no anel não influencia significativamente o grau de actividade antimicrobiana (Burt, 2007).

Dois possíveis mecanismos têm sido sugeridos pelo qual os hidrocarbonetos cíclicos podem actuar sobre as bactérias. Os hidrocarbonetos lipofílicos podem acumular-se na bicamada lipídica e distorcer a interacção proteína-lipídios ou, em alternativa, haver uma interacção directa dos compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas da proteína (Burt, 2007).

O carvacrol e timol são substâncias com estruturas semelhantes e que parecem tornar a membrana permeável. Ambos os compostos desintegram a membrana externa de bactérias Gram negativas libertando os lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP (Silva, 2010).

Nem todas as bactérias demonstram a mesma sensibilidade antimicrobiana aos compostos naturais. As bactérias Gram negativas são menos susceptíveis à acção de substâncias antibacterianas, uma vez que possuem uma membrana externa na parede celular, que limita a difusão de compostos hidrofóbicos através dos lipopolissacarídeos. No entanto, um estudo testou 50 EO comercialmente disponíveis e demonstrou não haver diferenças significativas de susceptibilidade, após 24 horas, entre microrganismos Gram positivos e Gram negativos, além de que o efeito inibitório foi muito mais intenso às 48 horas com bactérias Gram negativas do que com bactérias Gram positivas (Burt, 2007).

Outro factor que pode afectar a capacidade antimicrobiana é o facto de o óleo ser recentemente destilado ou não. As avaliações de óleos recentemente destilados demonstraram que as bactérias Gram positivas são mais susceptíveis (Burt, 2007).

### **1.3.Avaliação da actividade antimicrobiana em compostos de síntese**

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificados. A cada momento são relatadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante acção farmacológica, como por exemplo o taxol, a forskolina, a artemisinina, entre outros (Filho e Yunes, 1998). Deste modo, com o desenvolvimento da química orgânica e da tecnologia industrial possibilitou a análise, isolamento, aperfeiçoamento e síntese dos princípios activos das plantas (Júnior e Vizotto, 1996).

No actual enquadramento teórico foi dado relevo ao trabalho realizado pelo grupo de Rauter e colaboradores do Centro de Química e Bioquímica (CQB) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL).

A síntese de compostos bioactivos derivados de açúcares tem constituído um dos principais objectivos de Rauter e colaboradores do Centro de Química e Bioquímica (CQB) da FCUL: desenvolvimento da síntese de pseudo-C-nucleósidos, como por exemplo a do análogo à choudomicina, um antibiótico com actividade antitumoral; síntese de vários compostos com possível interesse em agroquímica, nomeadamente novos agentes antifúngicos ou insecticidas derivados da D-glucose; desenvolvimento da síntese dos precursores glucídicos dos antibióticos amipurimicina e mi-haramicina, produtos naturais que são potentes inibidores de fungos patogénicos das culturas do arroz, estando em curso a investigação da sua síntese total.

Ainda dentro da linha de investigação, a introdução regio- e estereosselectiva de cadeias ramificadas em derivados da D-glucose

conduziram à síntese de açúcares análogos aos constituintes dos referidos antibióticos. Assim, foram concebidas e sintetizadas novas moléculas com interesse medicinal inibidoras de espécies de *Bacillus*, de *Listeria monocytogenes* e de *Enterococcus faecalis*, bem como novos compostos derivados de açúcares, apresentando uma actividade anticolinesterásica significativa, com potencial interesse para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Foram também implementadas novas metodologias de síntese de derivados desoxigenados, algumas delas conduzindo à formação de ligações C-O, C-S e C-N na posição anomérica de 2-desoxiderivados. A investigação de zeólitos ácidos como catalisadores de várias reacções no domínio dos glúcidos permitiu obter resultados inovadores, que se traduziram na síntese de novas biomoléculas e no desenvolvimento de novos métodos de síntese (Rauter *et al.*, 2004; Rauter *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008).

A pesquisa de produtos naturais com possível interesse medicinal, através do seu isolamento a partir dos recursos naturais, e da sua caracterização espectroscópica, contribuiu para a elucidação estrutural de compostos de origem vegetal, nomeadamente de flavonóides com actividade antimicrobiana, de lactonas sesquiterpénicas com actividade citotóxica, de triterpenos e alcalóides (Edwards *et al.*, 2006; Rauter *et al.*, 2007).

#### **1.4. Enquadramento e objectivos**

A actividade antimicrobiana é uma área que procura respostas à crescente preocupação em investigar novos compostos de origem natural para substituição de compostos já existentes.

Neste contexto o principal objectivo do estudo apresentado foi realçar a importância da avaliação da actividade antimicrobiana através de três exemplos de aplicação:

- Estudo de extractos de éter dietílico, de acetato de etilo e de butanol de *Genista tenera*;
- Estudo de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. (Eucalipto) e *Thymus citriodorus* (tomilho-limão);

- Estudo de compostos de síntese derivados de lactonas carboximetilglicosiladas.

O estudo de extractos de éter dietílico, de acetato de etilo e de butanol de *Genista tenera*, surge no contexto do projecto “New anti diabetic agents from *Genista tenera* - Isolation, structure characterization, synthesis and mechanisms of action”. *Genista tenera* é uma planta endémica da Ilha da Madeira, conhecida pela utilização medicinal devido à sua actividade antidiabética. Três extractos diferentes de flavonóides (extractos de éter dietílico, de acetato de etilo e de butanol), bem como um extracto aquoso, foram preparados e mantidos a 4°C. Paralelamente ao estudo referido, pretendeu-se estudar a actividade antimicrobiana dos extractos obtidos de *Genista tenera*, perspectivando-se complementar algumas propriedades medicinais já conhecidas.

Para completar e comparar a actividade antimicrobiana de plantas foram utilizados óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. (Eucalipto) e *Thymus citriodorus* (tomilho-limão), para avaliar a sua potencialidade antimicrobiana, perspectivando-se uma possível utilização na área alimentar.

Neste trabalho foram, também, estudados compostos de síntese derivados de lactonas carboximetilglicosiladas, descritos por Xavier e colaboradores (2011).

## **2.METODOLOGIA**

### **2.1.Características das amostras**

#### **2.1.1.Material Vegetal**

*Genista tenera* é uma planta endémica da ilha da Madeira e é utilizada na medicina popular para controlar diabetes. Um espécime tipo (MADJ 2508) encontra-se depositado no Herbário do Jardim Botânico da Madeira, Funchal.

### 2.1.1.1.Preparação de extractos de *Genista tenera*

Foram preparados três extractos diferentes da planta *Genista tenera* ricos em flavonóides (extractos de éter dietílico, de acetato de etilo e de butanol) bem como um extracto aquoso. Todos os extractos foram evaporados à secura e mantidos a 4°C (Rauter *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2006; Rauter *et al.*, 2009)

### 2.1.1.2.Preparação de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. e de *Thymus citriodorus*

Os óleos essenciais em estudo foram obtidos através de destilação por arrastamento de vapor em aparelho *Clevenger* a partir de folhas frescas de *Eucalyptus* spp. (Eucalipto) e *Thymus citriodorus* (tomilho-limão), e, posteriormente, mantidos a 4°C.

### 2.1.2.Compostos derivados de lactonas carboximetilglicosiladas

Os compostos de síntese designados NX2, NX13, NX14, NX15 e NX18 (Figura 2) em estudo, foram sintetizados de acordo com Xavier e colaboradores (2011) e conservados a 4°C.

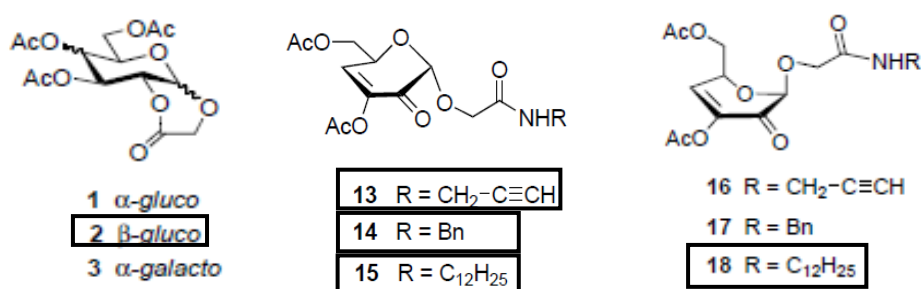


Figura 2 - Compostos de síntese derivados de lactonas carboximetilglicosiladas usados no estudo. Adaptado de Xavier *et al.* (2011)

## **2.2.Avaliação de actividade antimicrobiana de extractos de *Genista tenera*, de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. e de *Thymus citriodorus* e de compostos de síntese**

### **2.2.1.Microrganismos Padrão**

#### **2.2.1.1.Bactérias**

No estudo foram utilizadas estirpes ATCC: quatro bactérias Gram positivas (*Enterococcus faecalis* ATCC 7080, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *B. cereus* ATCC 11778) e três bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC19115, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076).

#### **2.2.1.2.Fungos**

No estudo foram utilizadas estirpes ATCC: uma espécie de fungo unicelular (*Candida albicans* ATCC 10231) e seis espécies de fungos filamentosos (*Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Aspergillus niger* ATCC 605963, *Penicillium aurantiogriseum* ATCC16404, *Fusarium culmorum* ATCC 12973, *Fusarium solani* ATCC 36031. *Botytis cinerea* pertence à colecção do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Santarém.

#### **2.2.1.3.Padronização das culturas bacterianas**

A suspensão bacteriana foi padronizada preparando uma cultura de 24 horas a partir de cada estirpe padrão em meio NB (*Nutrient broth, Biokar*), com excepção *Listeria monocytogenes* em que o meio utilizados foi TSB (*Tryptone Soy Broth, Biokar*). A partir das culturas de 24 horas foram lançadas novas culturas até atingirem crescimento exponencial (18 horas).

#### **2.2.1.4.Padronização das culturas fúngicas**

A suspensão de *Candida albicans* foi padronizada preparando uma cultura de 24 horas a partir da estirpe padrão em meio GYEP (glucose, 20 g;

peptona, 10 g; extracto de levedura, 5 g). A partir das culturas de 24 horas foi lançada nova cultura até atingir crescimento estacionário (18 horas).

A suspensão de esporos dos fungos filamentosos foi padronizada preparando uma cultura de 48 horas a 72 horas a partir da estirpe padrão em meio PDA (*Potato Dextrose Agar, Biokar*). A partir destas culturas de 24 horas foram lançadas novas culturas até atingirem bom desenvolvimento e esporulação (48 horas).

#### **2.2.1.5.Preparação de soluções das substâncias de referência para o controlo positivo**

Como controlos positivos foram usados cloranfenicol para as bactérias e anfotericina B para os fungos.

A solução de cloranfenicol (*Oxoid*) foi preparada em etanol, ficando a uma concentração de 16,7 mg/mL. A solução de anfotericina B (*Sigma*) foi preparada em DMSO, ficando a uma concentração de 250 µg/mL.

#### **2.2.2.Método de avaliação da actividade antimicrobiana**

As actividades antibacteriana e antifúngica foram avaliadas utilizando o método de difusão em ágar, de acordo com a adaptação do procedimento do CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards) por Silva e colaboradores (2008).

Em placas de Petri esterilizadas, adicionaram-se 20,0 mL de meio *NA* (*Nutrient agar at 2 %, Biokar*), obtendo-se assim a camada-base. Após a solidificação, utilizaram-se as culturas de bactérias em fase estacionária em meio *NB* (*Nutrient broth, Biokar*), sendo as sementeiras em superfície realizadas com zaragatoa em direcções opostas, de forma a garantir um tapete de células uniforme.

No caso dos fungos, em placas de Petri esterilizadas, adicionaram-se 20,0 mL de meio *PDA*, obtendo-se assim a camada-base. Para a levedura, a sementeira em superfície do meio *PDA* foi efectuada com zaragatoa em direcções opostas, a partir de uma cultura em fase estacionária em meio *GYEP*, de forma a garantir um tapete de células uniforme. Para os fungos

filamentosos, a sementeira em superfície do meio *PDA* foi efectuada com zaragatoa em direcções opostas, a partir de suspensão do micélio e esporos em água estéril, preparada de uma cultura bem desenvolvida e esporulada, de forma a garantir um tapete micelar uniforme.

As substâncias em estudo foram absorvidas em discos de papel estéreis de 6 mm de diâmetro (*Becton, Dickinson and Company*), colocados em duplicado no meio de cultura sólido já semeado com o microrganismo em estudo.

Para o estudo da actividade antimicrobiana dos extractos aquoso, de éter dietílico, de acetato de etilo e de butanol da planta *Genista tenera*, foram usados 15 µL por disco de soluções com concentração de 20 mg/mL, correspondendo 300 µg de extracto.

Para o estudo da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. e de *Thymus citriodorus*, foram usados 15 µL por disco, directamente de cada um dos óleos em estudo.

No estudo da actividade antimicrobiana dos compostos de síntese, foram usados 15 µL por disco de soluções com concentração de 20mg/mL diluídas em *DMSO*, correspondendo 300 µg de composto de síntese em estudo.

Como controlos positivos foram usados 300 µg de cloranfenicol (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*) e 300 pg de anfotericina B (*Aspergillus niger*, *Botytis cinerea*, *Candida albicans*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*), preparados de acordo com o ponto 2.2.1.5.. Como controlos negativos foram usados o etanol e o *DMSO*.

As bactérias foram incubadas a 37 °C, 24 horas, e fungos a 25 °C, 24h a 48h. Após a incubação, as placas de Petri apresentaram um tapete uniforme de biomassa microbiana e, quando aplicável, o diâmetro mais próximo dos halos de inibição de crescimento foi medido em milímetros. Considerando a variabilidade do método, os resultados foram apresentados pelo diâmetro médio da zona de inibição, determinado em duas repetições. A representação

pelos símbolos -, +, corresponde a uma gama de diâmetros, equivalentes ao aumento da sensibilidade do microrganismo à substância testada (+++++,  $\geq 26$  mm; +++++,  $22 \text{ mm} \leq \varnothing < 26 \text{ mm}$ ; +++,  $18 \text{ mm} \leq \varnothing < 22 \text{ mm}$ ; ++,  $14 \text{ mm} \leq \varnothing < 18 \text{ mm}$ ; +,  $12 \text{ mm} \leq \varnothing < 14 \text{ mm}$ ; -,  $\varnothing < 12 \text{ mm}$ ). Miyazawa e colaboradores (2000) relataram de forma semelhante os resultados do método de difusão em ágar, com utilização de discos.

### **2.3.Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de compostos de síntese**

A concentração mínima inibitória foi avaliada pelo método de macrodiluição e microdiluição, com base nos procedimentos descritos por EUROCAST (2003).

#### **2.3.1.Padronização do inóculo para determinação da MIC por macrodiluição usando o antibiótico cloranfenicol e *Escherichia coli***

O crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em meio NB, foi estudado acompanhando uma cultura preparada a partir de uma cultura em fase estacionária de *Escherichia coli* (18 horas). A incubação foi efectuada a 37°C com agitação (150 rpm), durante 190 minutos, até atingir 0,5 de Absorvância a 625 nm.

Para a determinação da MIC o inóculo foi preparado, a partir de uma cultura em fase estacionária de *Escherichia coli* (18 horas) em meio NB e incubação a 37°C com agitação (150 rpm). A suspensão de células foi preparada a  $5 \times 10^5$  células/mL em meio NB, utilizando a correspondência de uma unidade de densidade óptica a  $8 \times 10^8$  células/mL de *Escherichia coli*. Para confirmação da concentração de células foi efectuada uma subcultura em meio NA, incubada a 37°C, 18 a 20 horas, podendo oscilar entre  $3$  a  $7 \times 10^5$  células/mL (EUROCAST, 2003).

Para a determinação da concentração mínima inibitória foram testadas as seguintes concentrações do antibiótico cloranfenicol:

- 3000 µg, 300 µg, 30 µg e 3 µg por mL da suspensão de células, num total de 4,5 mL por tubo de ensaio;
- 300 µg, 30 µg, 15 µg, 10 µg, 5 µg, 4 µg, 3 µg, 2 µg e 1 µg por mL da suspensão de células, num total de 4,5 mL por tubo de ensaio.

Foi usado um tubo só com meio de cultura *NB* e um tubo só com a suspensão de células correspondendo, respectivamente, ao controlo negativo e positivo. A incubação foi realizada a 37°C, 18 a 20 horas. A determinação da MIC foi efectuada através da observação e selecção do último tubo sem turvação do meio de cultura.

A possível influência da fase de crescimento da cultura nas células da suspensão usadas para a determinação da MIC, foi testada pelo método de microdiluição, usando 300 µg, 30 µg, 15µg, 10 µg, 5 µg, 4 µg, 3 µg, 2 µg e 1 µg de cloranfenicol por mL de suspensão de células de *Escherichia coli* ATCC 25922, preparadas a partir de uma cultura em fase estacionária ou de uma cultura em fase exponencial com uma Absorvância, a 630nm, de 0,5. O meio de cultura *NB* e a suspensão de células de *Escherichia coli* ATCC 25922 de cada preparação foram usados, respectivamente, como controlo negativo e positivo. Os resultados apresentados são as médias ponderadas das três réplicas efectuadas para cada situação em estudo.

### **2.3.2.Determinação da MIC por microdiluição dos compostos derivados de lactonas carboximetilglicosiladas**

#### **2.3.2.1.Ensaio com o antibiótico cloranfenicol**

Para a preparação do inóculo utilizou-se sempre culturas em fase estacionária de *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis* em meio *NB*. A suspensão de células foi preparada a  $5 \times 10^5$  células/mL, podendo oscilar entre  $3$  a  $7 \times 10^5$  células/mL. Para confirmação da concentração de células foi efectuada uma subcultura em meio *NA*, incubada a 37°C, 18 a 20 horas.

Para a determinação da concentração mínima foi efectuado um ensaio com as seguintes concentrações do antibiótico cloranfenicol: 300 µg, 150 µg, 75 µg, 37,5 µg, 18,8 µg, 9,4 µg, 4,7 µg, 2,3 µg, 1,2 µg, 0,6 µg, 0,3 µg e 0,15 µg por

mL da suspensão de células, num volume final de 150 µL. Cada ensaio foi efectuado em duplicado com três repetições. Os resultados apresentados resultam da média ponderada dos dados obtidos.

Na microplaca o controlo negativo foi o meio NB, colocado na primeira linha de poços (1A-H), e o controlo positivo foi a suspensão de células (*Bacillus cereus*; *Enterococcus faecalis*) colocado nos primeiros poços (11A-H ou 12A-H). A incubação foi realizada a 37°C, 18 a 20 horas.

Após incubação, o crescimento de células foi avaliado pela leitura da Absorvância a 630 nm em espectrofotómetro para microplacas.

### **2.3.2.2. Compostos NX2, NX13, NX15 e NX18 derivados de lactonas carboximetilglicosiladas**

As actividades antibacteriana e antifúngica dos compostos NX2, NX13 e NX15 foram testados para *Enterococcus faecalis*, utilizando o método de difusão em ágar, no trabalho desenvolvido por Xavier e colaboradores (2011).

Para a preparação do inóculo utilizou-se sempre culturas em fase estacionária de *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis* em meio NB. A suspensão de células foi preparada a  $5 \times 10^5$  células/mL, podendo oscilar entre 3 a  $7 \times 10^5$  células/mL. Para confirmação da concentração de células foi efectuada uma subcultura em meio NA, incubada a 37°C, 18 a 20 horas.

Para a determinação da concentração mínima foram seleccionadas as seguintes concentrações dos compostos em NX2, NX13, NX15 e NX18: 300 µg, 150 µg, 75 µg, 37,5 µg, 18,8 µg, 9,4 µg, 4,7 µg, 2,3 µg e 1,2 µg por mL da suspensão de células, num volume final de 150 µL. Os compostos NX2, NX13 e NX15 foram testados para *Enterococcus faecalis* e os compostos NX 2 e NX 18 foram testados para *Bacillus cereus*. O ensaio foi efectuado em duplicado. Os resultados apresentados resultam da média ponderada dos dados obtidos. Na microplaca o controlo negativo foi o meio NB, colocado meio de cultura nos primeiros poços, e nos últimos poços foi colocado suspensão de células (*E. faecalis* e *B. cereus*) como controlo positivo. A incubação foi realizada a 37°C, entre 18 a 20 horas. Após incubação, o crescimento de células foi avaliado pela leitura da Absorvância a 630 nm em espectrofotómetro para microplacas.

### 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1.Avaliação de actividade antimicrobiana de extractos de *Genista tenera*, de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. e de *Thymus citriodorus* e de compostos de síntese

##### 3.1.1.Avaliação de actividade antimicrobiana de extractos de *Genista tenera*

No estudo efectuado a actividade antimicrobiana de um extracto aquoso e três extractos ricos em flavonóides (extractos de éter dietílico, de acetato de etilo e de butanol) da planta *Genista tenera* (Rauter *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2006; Rauter *et al.*, 2009) foram avaliados contra bactérias e fungos seleccionados, pelo método de difusão em ágar descrito no ponto 2.2.2. deste estudo.

Os flavonóides são substâncias fenólicas hidroxilados, mas ocorrem como uma unidade C6-C3 ligados a um anel aromático. Como eles são conhecidos por serem sintetizados pelas plantas, em resposta a infecções microbianas, sendo de esperar que sejam encontrados *in vitro* reacções antimicrobianas. A sua actividade é, provavelmente, devida à sua capacidade de se complexarem com proteínas extracelulares ou com paredes celulares de bactérias, sabendo-se ainda que flavonóides lipofílicos podem também romper membranas microbianas (Tsuchiya *et al.*, 1996, citado por Cowan, 1999)

Os resultados obtidos para os diferentes extractos de *Genista tenera* encontram-se apresentados nas Tabelas IV e V.

Os halos de inibição observados nas bactérias foram limitados a *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) em presença dos extractos de éter dietílico e acetato de etilo, enquanto a actividade antifúngica revelou-se apenas no éter dietílico em relação a *Fusarium culmorum* (ATCC 12973) (Figura 3).



Figura 3 - Halos de inibição fúngica para o extracto de éter dietílico de *Genista tenera*

### 3.1.2. Avaliação de actividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. e de *Thymus citriodorus*

A utilização de substâncias naturais, de origem vegetal, podem tornar os alimentos mais atractivos para o consumidor, por não apresentarem efeitos tóxicos, mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas. Além dos benefícios proporcionados à saúde, diversos estudos têm demonstrado o efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de microrganismos de deterioração e patogénicos transmitidos através de alimentos. Existindo também a perspectiva de substituir os aditivos sintéticos por conservantes naturais presentes nos condimentos (Pereira *et al.*, 2006).

No estudo efectuado a actividade antimicrobiana obtidos para os óleos essenciais encontram-se apresentados nas Tabelas VI e VII.

Dos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. e de *Thymus citriodorus* em estudo, verificou-se a presença de actividade antimicrobiana apenas para o óleo de eucalipto. O óleo de eucalipto mostrou actividade antibacteriana para

*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A actividade antifúngica foi conseguida contra *Botrytis cinerea* e *Fusarium culmorum*.

Chalfoun e colaboradores (2004, citado por Pereira *et al.*, 2006) avaliaram o efeito *in vitro* de óleos essenciais de alho, canela, cravo e tomilho testados em concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000 mg/mL, e do óleo de cravo nas concentrações de 200, 400, 600 e 800 mg/mL, sobre o desenvolvimento micelial dos fungos *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*, e constataram uma inibição total do óleo de canela sobre os fungos testados, os óleos de tomilho e alho tiveram o mesmo efeito nas concentrações mais altas, e o óleo de cravo inibiu o desenvolvimento dos fungos a partir da concentração de 600 mg/mL, excepto para *Penicillium* spp. cujo efeito inibitório só foi verificado na concentração de 800 mg/mL. Segundo Carvalho e colaboradores (2005) os extractos de caules e folhas de *Thymus citriodorus* apresentam uma reduzida actividade antimicrobiana, com excepção para *Salmonella enteritidis*.

O género *Eucalyptus* tem sido considerado útil em diversas áreas e apresenta propriedades antibacterianas e antifúngicas. Na área da saúde, a principal actividade do óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labil) é no aparelho respiratório, o qual tem demonstrado, tanto por via oral como inalatória, actividade expectorante, fluidificante e antisséptica da secreção brônquica (Franco *et al.*, 2005).



Tabela V - Avaliação da actividade antifúngica dos extractos *Genista tenera*

Microorganismos	Extractos										Controlo Positivo <sup>a</sup> (300 µg)	
	Butanol	Éter Dietílico	Acetato de Etilo	Água								
	Ø (mm)	Inibição	Ø (mm)	Inibição	Ø (mm)	Inibição	Ø (mm)	Inibição	Ø (mm)	Inibição	Ø (mm)	Inibição
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	14	++
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 605963	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	14	++
<i>Botrytis cinerea</i> <sup>b</sup> ESAS	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	13	+
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	16	++
<i>Fusarium culmorum</i> ATCC 12973	<12	-	14	++	<12	-	<12	-	<12	-	14	++
<i>Fusarium solani</i> ATCC 36031	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	14	++
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> ATCC16025	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	15	++

<sup>a</sup> Diâmetro das zonas de inibição (Ø): +++++, ≥26 mm; +++++, 22 mm ≤ Ø < 26 mm; ++++, 18 mm ≤ Ø < 22 mm; ++, 14 mm ≤ Ø < 18 mm; +, 12 mm ≤ Ø < 14 mm; -, Ø < 12 mm;

<sup>b</sup> Anfotericina B (300 µg);

<sup>c</sup> Microorganismos da colecção do laboratório de microbiologia da Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Santarém.

Tabela VI - Avaliação da actividade antibacteriana de óleos essenciais

Microorganismos	Óleos essenciais					
	<i>Thymus citriodorus</i>	<i>Eucalyptus</i> spp.	Controlo Positivo <sup>b</sup> (300 µg)			
	<sup>a</sup> Ø (mm)	Inibição	Ø (mm)	Inibição	Ø (mm)	Inibição
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<12	-	<12	-	35	+++++
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<12	-	14	++	43	+++++
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080	<12	-	<12	-	32	+++++
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<12	-	14	++	42	+++++
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	<12	-	<12	-	36	+++++
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC13076	<12	-	<12	-	45	+++++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<12	-	15	++	35	+++++

<sup>a</sup> Diâmetro das zonas de inibição (Ø): +++++, ≥26 mm; ++++, 22 mm ≤ Ø < 26 mm; ++, 18 mm ≤ Ø < 22 mm; +, 14 mm ≤ Ø < 18 mm; -, Ø < 12 mm;

<sup>b</sup> Cloranfenicol (300 µg).

Tabela VII - Avaliação da actividade antifúngica de óleos essenciais

Microorganismos	Óleos essenciais					
	<i>Thymus citriodorus</i>			<i>Eucalyptus</i> spp.		
	<sup>(a)</sup> Ø (mm)	Inibição	Ø (mm)	Inibição	Ø (mm)	Inibição
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<12	-	13	+	14	++
<i>Botrytis cinerea</i> <sup>c</sup> ESAS <sup>c</sup>	<12	-	13	+	13	+
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<12	-	<12	-	16	++
<i>Fusarium culmorum</i> ATCC 12973	<12	-	<12	-	13	+
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> ATCC 16025	<12	-	<12	-	13	+

<sup>a</sup> Diâmetro das zonas de inibição (Ø): +++++, ≥26 mm; ++++, 22 mm ≤ Ø < 26 mm; +++, 18 mm ≤ Ø < 22 mm; ++, 14 mm ≤ Ø < 18 mm; +, 12 mm ≤ Ø < 14 mm; -, Ø < 12 mm;

<sup>b</sup> Anfotericina B (300pg);

<sup>c</sup> Microorganismos da colecção do laboratório de microbiologia da Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Santarém.

### 3.1.3. Avaliação de actividade antimicrobiana de compostos derivados de lactonas carboximetilglicosiladas

No estudo efectuado a actividade antimicrobiana os compostos de síntese designados NX2, NX13, NX14, NX15 e NX18 (Xavier *et al.*, 2011), foram avaliados contra bactérias e fungos seleccionados, pelo método de difusão em ágar descrito no ponto 2.2.2.. Os resultados obtidos encontram-se apresentados nas Tabelas VIII a XI. Os halos de inibição observados, nas bactérias e fungos em estudo, comparativamente aos controlos, encontram-se nas Figuras 4 e 5.

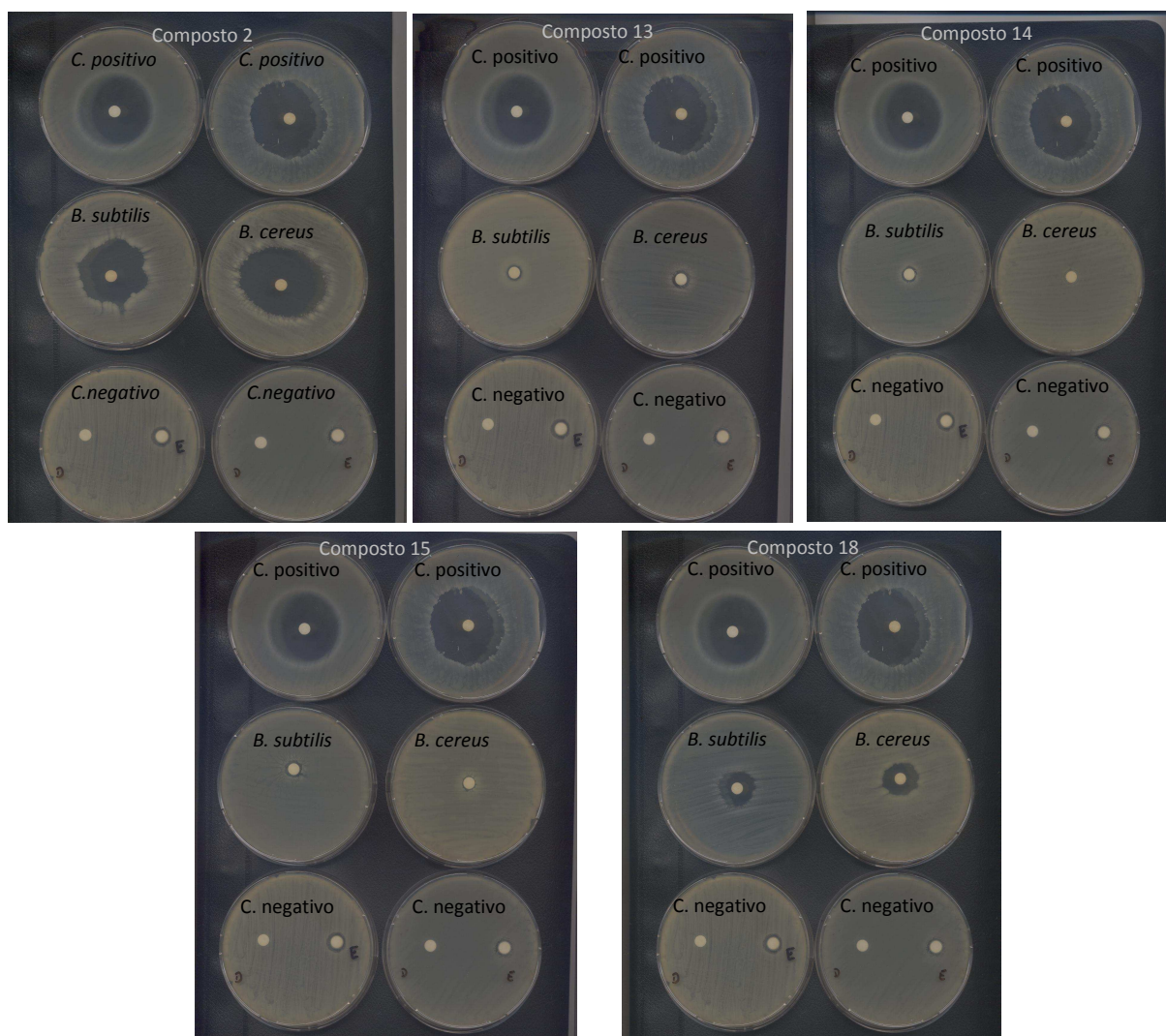
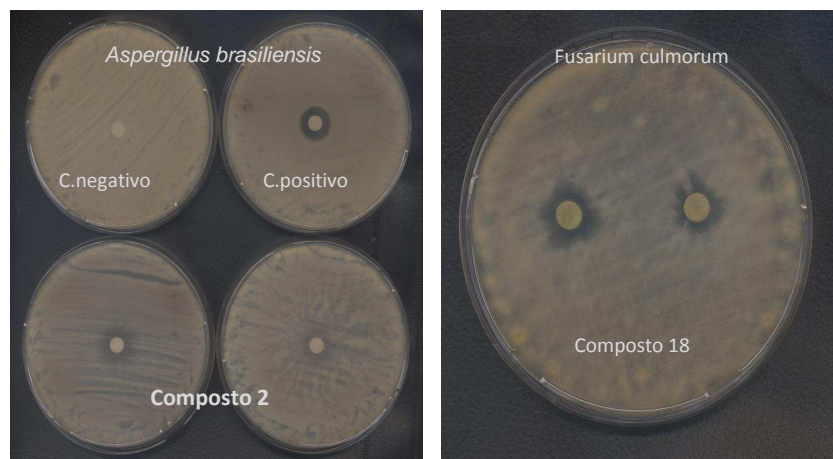


Figura 4 - Halos de inibição bacteriana para os compostos em estudo.



**Figura 5 – Exemplos de halos de inibição fúngica para os compostos em estudo.**

A partir dos dados de actividade antimicrobiana observados é possível verificar a actividade antibacteriana dos compostos NX2 e NX18 frente às espécies de *Bacillus* estudadas. Quanto à actividade antifúngica o composto NX2 demonstrou características inibitórias contra *Fusarium solani* (ATCC 36031) e *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), enquanto o composto NX18 apenas revelou características inibitórias frente a *Fusarium culmorum* (ATCC 12973).

Tabela VIII: Avaliação da actividade antibacteriana de compostos derivados de lactonas carboximetilglicosiladas

Microrganismos	Compostos						Controlo Positivo <sup>b</sup> (300 µg)
	2 (300µg)	13 (300µg)	14 (300µg)	15 (300µg)	18 (300µg)	18 (300µg)	
	∅ <sup>a</sup> Inibição (mm)	∅ Inibição (mm)	∅ Inibição (mm)	∅ Inibição (mm)	∅ Inibição (mm)	∅ Inibição (mm)	∅ Inibição (mm)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	39 +++++	<12 -	<12 -	<12 -	16 ++	31 +++++	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	40 +++++	<12 -	<12 -	12 +	21 +++	40 +++++	

<sup>a</sup> Diâmetro das zonas de inibição (∅): +++++, >26 mm; +++++, 22 mm ≤ ∅ < 26 mm; +++, 18 mm ≤ ∅ < 22 mm; ++, 14 mm ≤ ∅ < 18 mm; +, 12 mm ≤ ∅ < 14 mm; -, ∅ < 12 mm;

<sup>b</sup> Clovanfenicol (300 µg).

Tabela IX: Avaliação da actividade antifúngica de compostos derivados de lactonas carboximetilglicosiladas

Microorganismos	Compostos										Controlo <sup>d</sup> (300pg)	
	2 (300µg)	13 (300µg)	14 (300µg)	15 (300µg)	18 (300µg)	19 (300µg)	20 (300µg)	21 (300µg)	22 (300µg)	23 (300µg)		
	∅ (mm)	Inibição ∅ (mm)	Inibição ∅ (mm)	Inibição ∅ (mm)	Inibição ∅ (mm)	Inibição ∅ (mm)	Inibição ∅ (mm)	Inibição ∅ (mm)	Inibição ∅ (mm)	Inibição ∅ (mm)	Inibição ∅ (mm)	Inibição ∅ (mm)
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	14	++	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	14	++
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 605963	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	14	++
<i>Botrytis cinerea</i> <sup>c</sup> ESAS <sup>a</sup>	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	23	++++
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	16	++
<i>Fusarium culmorum</i> ATCC 12973	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	14	++	14	++
<i>Fusarium solani</i> ATCC 36031	13	+	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	14	++
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> ATCC 16025	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	<12	-	15	++

<sup>a</sup> Diâmetro das zonas de inibição (∅): +++++, ≥26 mm; ++++, 22 mm ≤ ∅ < 26 mm; ++, 18 mm ≤ ∅ < 22 mm; +, 14 mm ≤ ∅ < 18 mm; -, 12 mm ≤ ∅ < 14 mm; ∅ < 12 mm;

<sup>b</sup> Anfotericina B (300pg);

<sup>c</sup> Microorganismos da coleção do laboratório de microbiologia da Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Santarém.

## 3.2.Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de compostos de síntese

### 3.2.1.Padronização das condições para determinação da MIC por macrodiluição e microdiluição usando o antibiótico cloranfenicol e *Escherichia coli* ATCC 25922

A concentração mínima inibitória foi avaliada pelo método de macrodiluição e microdiluição, com base nos procedimentos descritos por EUROCAST (2003).

Para conhecer as condições de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 em meio *NB* foram acompanhadas três culturas, preparadas a partir de uma cultura em fase estacionária de *Escherichia coli* (18 horas), incubada a 37°C com agitação (150 rpm), durante 190 minutos. A cultura de *Escherichia coli* foi incubada até atingir 0.5 de absorvância a 625 nm, correspondente à fase final do crescimento exponencial (Figura 6). As três culturas apresentaram comportamentos semelhantes, sendo o crescimento de *Escherichia coli* em meio *NB* caracterizado por apresentar um tempo de geração de 40 minutos.

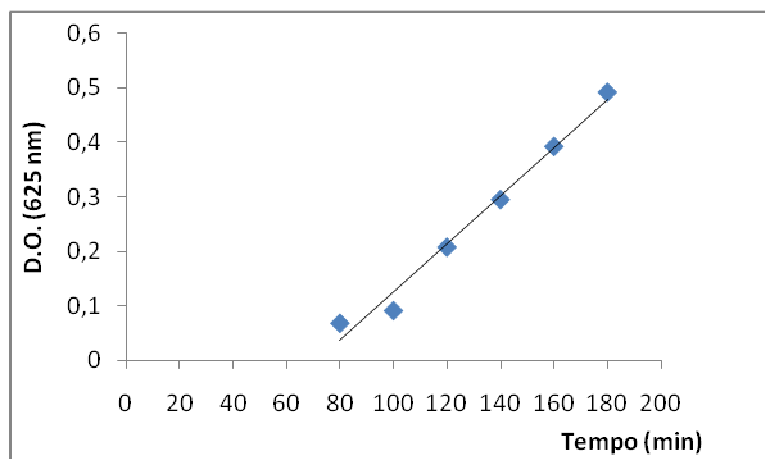


Figura 6 - Cultura de *Escherichia coli* em fase exponencial.

No estudo efectuou-se a padronização do inóculo para determinação da MIC por macrodiluição, usando o antibiótico cloranfenicol e *Escherichia coli* ATCC 25922. O inóculo foi preparado, a partir de uma cultura de trabalho em

fase estacionária de *Escherichia coli* (18 horas), em meio *NB* e incubação a 37°C com agitação (150 rpm). A suspensão de células foi preparada a  $5 \times 10^5$  células/mL em meio *NB*, usando como referencial a correspondência de uma unidade de densidade óptica a  $8 \times 10^8$  células/mL de *Escherichia coli*. Para confirmação da concentração de células foi efectuada uma subcultura em meio *NA*, incubada a 37°C, 18 a 20 horas. Os resultados obtidos estão de acordo com as indicações da EUROCAST (2003), apresentando valores entre 3 a  $7 \times 10^5$  unidades formadoras de colónias por mililitro.

Para a determinação da concentração mínima inibitória foram testadas as seguintes concentrações do antibiótico cloranfenicol:

- 3000 µg, 300 µg, 30 µg e 3 µg por mL da suspensão de células, num total de 4,5 mL por tubo de ensaio;
- 300 µg, 30 µg, 15 µg, 10 µg, 5 µg, 4 µg, 3 µg, 2 µg e 1 µg por mL da suspensão de células, num total de 4,5 mL por tubo de ensaio.

Foi usado um tubo só com meio de cultura *NB* e um tubo só com a suspensão de células correspondendo, respectivamente, ao controlo negativo e positivo. A incubação foi realizada a 37°C, 18 a 20 horas. A determinação da MIC foi efectuada através observação e selecção do último tubo sem turvação do meio de cultura.

Após incubação dos tubos contendo a suspensão de células e as diferentes concentrações do antibiótico, 3000 µg, 300 µg, 30 µg e 3 µg, a observação dos tubos de ensaio para determinação do valor da concentração mínima inibitória de cloranfenicol para *Escherichia coli*, confirmou ser insuficiente a gama de concentrações testadas. Assim, foi realizado novo ensaio em duplicado com outras concentrações de cloranfenicol, 300 µg, 30 µg, 15 µg, 10 µg, 5 µg, 4 µg, 3 µg, 2 µg e 1 µg.

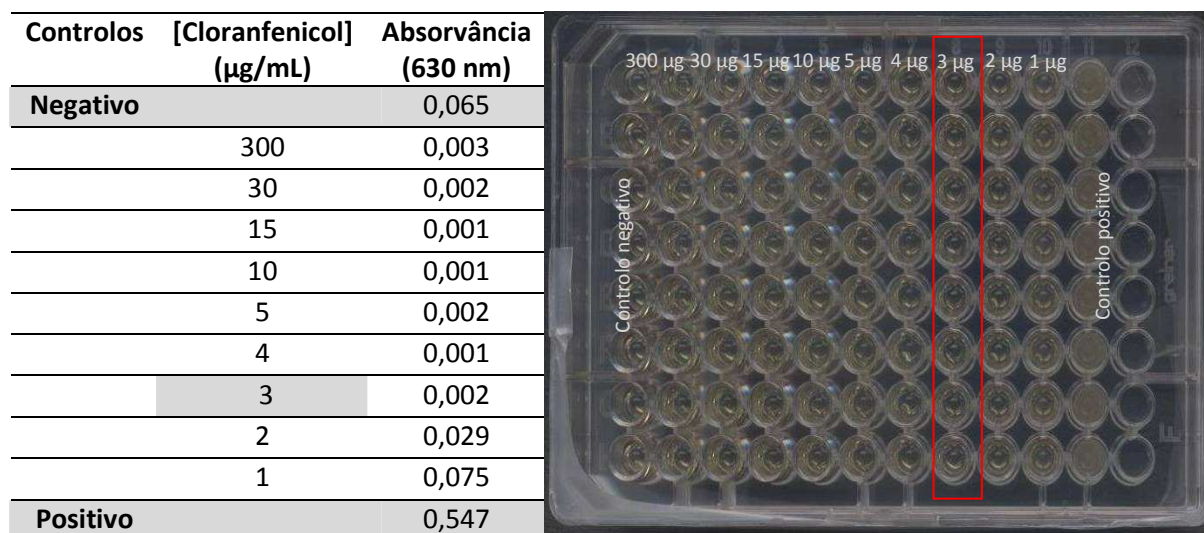
Através dos resultados de observação da turvação dos tubos de ensaio (Tabela X), em relação ao controlo negativo e ao controlo positivo, verificou-se que a concentração mínima inibitória é de 4 µg/mL. O resultado obtido corresponde ao indicado nos testes de monitorização da qualidade da EUROAST (2003) para *Escherichia coli* ATCC25922.

**Tabela X - Determinação da MIC de cloranfenicol contra *Escherichia coli* ATCC25922 por macrodiluição**

Controlo Negativo	Suspensão de <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 /[Cloranfenicol] ( $\mu\text{g/mL}$ )									Controlo Positivo
Meio NB	300 $\mu\text{g}$	30 $\mu\text{g}$	15 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{g}$	5 $\mu\text{g}$	4 $\mu\text{g}$	3 $\mu\text{g}$	2 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$	Suspensão de <i>E. coli</i>
-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++
-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++

- ausência de turvação; + turvação ligeira; ++ turvação média; +++ turvação intensa.

Sendo um dos objectivos a determinação da concentração mínima inibitória pelo método da microdiluição e perspectivando a utilização de microplacas de 96 poços, retiraram-se 200  $\mu\text{L}$  suspensão bacteriana a partir dos tubos de ensaio usados na anterior determinação pelo método da macrodiluição. Tendo o ensaio sido realizado em duplicado, de cada tubo foram preenchidos quatro poços, dando um total de oito poços para cada concentração de cloranfenicol testada contra *Escherichia coli* ATCC 25922. A concentração mínima inibitória foi avaliada pela leitura de Absorvância a 630nm em espectrofotómetro para microplacas (Figura 7).



**Figura 7 - Determinação da concentração mínima inibitória de cloranfenicol contra *Escherichia coli* ATCC 25922 pelo método de macrodiluição: os valores de absorvância a 630 nm são a média ponderada dos oito poços por concentração de cloranfenicol.**

A substituição da observação da turvação em tubo de ensaio pela leitura em espectrofotómetro, tornou a determinação da concentração mínima inibitória de cloranfenicol contra *Escherichia coli* ATCC 25922 mais sensível, uma vez que a MIC obtido foi de 3 µg/mL, em vez de 4 µg/mL.

Para além da padronização da preparação do inóculo, pareceu importante esclarecer se o estado de viabilidade das células microbianas, afectava os resultados da determinação da MIC. Neste contexto, realizou-se a determinação da concentração mínima inibitória de cloranfenicol contra *Escherichia coli* ATCC 25922, usando uma suspensão de células preparadas por diluição de uma cultura em fase estacionária (18 horas) e de uma cultura na fase exponencial.

A Tabela XI apresenta os valores médios ponderados de Absorvância a 630nm, obtidos para cada uma das suspensões de células usadas. A preparação do inóculo a partir de uma cultura em fase estacionária, não alterou a sensibilidade das células de *Escherichia coli* em relação ao cloranfenicol, comparativamente ao inóculo preparado a partir de uma cultura em fase exponencial.

**Tabela XI – Verificação da influência da fase de crescimento da cultura na determinação da MIC de cloranfenicol contra *Escherichia coli* ATCC25922 por microdiluição**

[Cloranfenicol] (µg/mL)	Fase da Cultura de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922/Absorvância a 630nm	
	Exponencial	Estacionária
30µg	0,002	0,001
15µg	0,002	0,001
7,5µg	0,002	0,003
5µg	0,003	0,004
4µg	0,004	0,003
3µg	0,006	0,005
2µg	0,057	0,097
1µg	0,248	0,371
<b>Controlo Positivo</b>	0,631	0,648
<b>Controlo Negativo</b>	0,071	0,069

Controlo Negativo: meio NB; Controlo Positivo: suspensão de *Escherichia coli* ATCC 25922, preparada a partir de cada cultura.

### 3.2.2. Determinação da MIC por microdiluição dos compostos derivados de lactonas carboximetilglicosiladas

A actividade antimicrobiana dos compostos derivados de lactonas carboximetilglicosiladas designados NX2, NX13, NX14, NX15 e NX18 foram avaliados contra bactérias no estudo efectuado por Xavier e colaboradores (2011) e neste estudo (ponto 3.1.). De acordo com os resultados obtidos os compostos NX2, NX13 e NX15 foram testados para *Enterococcus faecalis* e os compostos NX 2 e NX 18 foram testados para *Bacillus cereus*. Atendendo à quantidade muito limitada dos compostos analisados, nestes testes não foi usado *Bacillus subtilis*, optando por *Bacillus cereus* por ser uma bactéria responsável por toxinfecções alimentares. A utilização do método da microdiluição, facilita o trabalho especialmente quando se trabalha com compostos de síntese, uma vez que as quantidades disponíveis são sempre reduzidas.

Numa primeira fase foi efectuado um ensaio de optimização de condições (em duplicado), utilizando o método de microdiluição para a determinação da concentração mínima inibitória de cloranfenicol contra *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus* (Tabela XII). Através da análise dos valores da Tabela XII, verificou-se que a MIC de cloranfenicol frente a *Bacillus cereus* é de 1,2 µg/mL e frente a *Enterococcus faecalis* é de 2,3 µg/mL.

**Tabela XII – Determinação da MIC de cloranfenicol frente a *Enterococcus faecalis* e a *Bacillus cereus***

[cloranfenicol] (µg/mL)	Absorvância (630 nm)	
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
300	0,005	0,004
150	0,004	0,007
75	0,003	0,005
37,5	0,003	0,004
18,8	0,005	0,005
9,4	0,003	0,002
4,7	0,003	0,003
2,3	0,004	0,003
1,2	0,005	0,085
0,6	0,148	-
0,3	0,159	-
0,15	0,152	-
<b>Controlo Positivo</b>	0,250	0,194
<b>Controlo Negativo</b>	0,067	0,079

Para a determinação da MIC para os compostos que demonstraram actividade antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis*, foram utilizadas as seguintes concentrações dos compostos NX2, NX13 e NX15: 300 µg, 150 µg, 75 µg, 37,5 µg, 18,8 µg, 9,4 µg, 4,7 µg, 2,3 µg e 1,2 µg. Para a determinação da MIC para os compostos que demonstraram actividade antimicrobiana frente a *Bacillus cereus*, foram utilizadas as seguintes concentrações dos compostos NX2 e NX18: 300 µg, 150 µg, 75 µg, 37,5 µg, 18,8 µg, 9,4 µg, 4,7 µg, 2,3 µg, 1,2 µg, 0,6 µg, 0,3 µg e 0,15 µg. As quantidades disponíveis só permitiram efectuar um duplicado para cada concentração em estudo.

A microplaca foi incubada a 37°C durante 18 a 20 horas. Após incubação foram lidas as absorvâncias a 630 nm em espectrofotómetro para microplacas.

As Tabelas XIII e XIV apresentam os valores médios ponderados de Absorvância a 630nm, obtidos para a determinação da MIC para os compostos NX2, NX13 e NX15 frente a *Enterococcus faecalis* e para os compostos NX2 e NX18 frente a *Bacillus cereus*, respectivamente.

**Tabela XIII – Determinação da MIC para os compostos NX2, NX13 e NX15 frente a *Enterococcus faecalis***

[cloranfenicol] (µg/mL)	Compostos		
	NX2	NX13	NX15
300	0,005	0,004	0,004
150	0,006	0,009	0,003
75	0,006	0,443	0,004
37,5	0,007	0,558	0,004
18,8	0,099	0,517	0,006
9,4	0,112	0,516	0,005
4,7	0,106	0,512	0,006
2,3	0,528	0,527	0,119
1,2	0,484	0,519	0,319
<b>Controlo Positivo</b>	0,582	0,529	0,637
<b>Controlo Negativo</b>	0,053	0,053	0,053

Através da análise dos valores da Tabela XIII pode-se afirmar que a MIC para o composto NX2 é de 37,5 µg/mL, para o composto NX13 é de 150 µg/mL e para o composto NX15 é de 4,7 µg/mL, frente a *Enterococcus faecalis*.

**Tabela XIV – Determinação da MIC para os compostos NX2 e NX18 frente a *Bacillus cereus*.**

[cloranfenicol] (µg/mL)	Compostos	
	NX2	NX18
300	0,009	0,007
150	0,008	0,007
75	0,006	0,009
37,5	0,005	0,006
18,8	0,005	0,007
9,4	0,006	0,009
4,7	0,009	0,479
2,3	0,232	0,758
1,2	0,756	0,842
<b>Controlo Positivo</b>	0,860	0,857
<b>Controlo Negativo</b>	0,050	0,050

Através da análise dos valores da Tabela XIV pode-se afirmar que a MIC para o composto NX2 é de 4,7 µg/mL e para o composto NX18 é de 9,4 µg/mL, frente a *Bacillus cereus*.

## 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação da actividade antimicrobiana apresenta-se como uma saída para o combate contra os microrganismos, quer a razão seja o grande aumento da resistência dos microrganismos patogénicos a múltiplas drogas e a necessidade de novas alternativas terapêuticas, quer seja a procura de substâncias que sejam eficazes e menos agressivas tanto para o meio ambiente como para o homem, contribuindo assim para uma melhor qualidade de vida. Entretanto, para que soluções efectivas sejam encontradas, devem-se promover um inter-relacionamento das diferentes áreas do conhecimento, incluindo botânica, microbiologia, fotoquímica e a epidemiologia.

A revisão bibliográfica efectuada neste estudo salientou a valorização dada, ao longo dos anos, à actividade antimicrobiana de substâncias extraídas de plantas. Os estudos incidentes nesta área iniciaram-se muito cedo e até nos dias de hoje têm uma elevada relevância em diversas áreas, com maior incidência na área da medicina e na área alimentar. Na área da medicina estes estudos têm melhorado o conhecimento de novos compostos com potencialidade para serem utilizados como antibióticos ou antifúngicos, bacteriostáticos ou antisépticos, na área alimentar são bastante utilizados como aromatizantes e conservantes.

No sentido de evidenciar a importância da avaliação da actividade antimicrobiana, neste trabalho estudaram-se: um extracto aquoso e três extractos ricos em flavonóides (extractos de éter dietílico, de acetato de etilo e de butanol) da planta *Genista tenera* foram avaliados contra bactérias e fungos seleccionados, pelo método de difusão em ágar; os óleos essenciais extraídos de folhas frescas de *Eucalyptus* spp. (Eucalipto) e *Thymus citriodorus* (tomilho-limão); derivados de lactonas carboximetilglicosiladas e os compostos de síntese derivados de lactonas carboximetilglicosiladas, designados NX2, NX13, NX14, NX15 e NX18 (Xavier *et al.*, 2011), foram avaliados frente a bactérias e fungos seleccionados, pelo método de difusão em ágar e efectuada a determinação da MIC pelo método da microdiluição, nas situações que se consideraram com interesse de aplicação.

A avaliação da actividade antimicrobiana de 300 mg do extracto aquoso, de éter dietílico, de acetato de etilo e de butanol da planta *Genista tenera*, revelou halos de inibição em *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) em presença dos extractos de éter dietílico e acetato de etilo, enquanto a actividade antifúngica revelou-se apenas no éter dietílico em relação a *Fusarium culmorum* (ATCC 12973).

Considerando as propriedades antidiabéticas da planta *Genista tenera*, e conhecendo que muitas das complicações secundárias associadas à diabetes estão relacionadas com infecções, teria interesse aprofundar o estudo, não só variando a concentração dos extractos que não revelaram actividade antimicrobiana, como estudando outros extractos ricos em componentes que não os flavonóides.

Relativamente aos resultados obtidos dos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. e de *Thymus citriodorus* em estudo, verificou-se a presença de actividade antimicrobiana apenas para o óleo de eucalipto. O óleo de eucalipto mostrou actividade antibacteriana frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A actividade antifúngica foi conseguida frente a *Botrytis cinerea* e *Fusarium culmorum*.

Tendo em conta que, actualmente, as refeições e alimentos pré-confeccionados têm sofrido uma grande procura por parte dos consumidores, a adição de produtos naturais como os óleos essenciais, é uma mais-valia em termos de aromatizantes e ao mesmo tempo conservantes. Desta forma, os alimentos são naturalmente conservados pela adição de substâncias naturais, mantendo as suas características tradicionais de confecção. Considerando os estudos já efectuados, seria relevante verificar os condimentos e especiarias ainda não avaliados e aprofundar os conhecimentos sobre a aplicação dos óleos essenciais com actividade antimicrobiana na área alimentar.

Quanto aos compostos de síntese, como referido anteriormente, a estrutura química destes compostos naturais é facilmente identificada permitindo o isolamento, aperfeiçoamento e síntese dos princípios activos das plantas. O aperfeiçoamento dos compostos podem torná-los mais eficazes quanto à sua actividade antimicrobiana, no entanto as quantidades obtidas são extremamente reduzidas.

Os resultados obtidos da actividade antimicrobiana dos compostos de síntese obtidos de lactonas carboximetilglicosiladas são coerentes com o que foi referido anteriormente. Os compostos NX2 e NX18 demonstram actividade antibacteriana bastante significativa, pelo método de difusão em ágar, frente *Bacillus cereus* e *B. subtilis*. Relativamente à actividade antifúngica o composto NX2 foi eficaz frente a *Aspergillus brasiliensis* e *Fusarium solani* e o composto NX18 foi eficaz frente a *F. culmorum*.

Uma vez verificada a existência de actividade antimicrobiana eficaz em alguns dos compostos em estudo, foi verificada a concentração mínima inibitória para os compostos NX2, NX13 e NX18 frente a *Enterococcus faecalis* e os compostos NX2 e NX18 frente a *Bacillus cereus*, pelo método de microdiluição. Verificou-se que a concentração mínima inibitória para os compostos NX2 e NX18 é de 4,7 µg/mL e 9,4 µg/mL, respectivamente, frente a *B. cereus*. Para os compostos NX2, NX13 e NX18 a concentração mínima inibitória foi, respectivamente, de 37,5 µg/mL, 150 µg/mL e 4,7 µg/mL, frente a *E. faecalis*.

Destes resultados podemos concluir que, em geral, os compostos de síntese são biologicamente activos, sendo importante aprofundar as possibilidades de aplicação como antibacterianos, especialmente considerando a baixa toxicidade apresentada (Xavier *et al.*, 2011). Quanto aos compostos com características antifúngicas, será necessário adaptar os procedimentos que permitiram determinar as MIC de fungos produtores de conídios.

Ao concluir este estudo, verifica-se que a aplicação da avaliação da actividade antimicrobiana é uma ferramenta de estudo que ainda pode ser explorada em múltiplas vertentes, sendo ideal poder definir condições padronizadas para diferentes grupos de substâncias, como as já existentes para os antibióticos estabelecidas pela *Nacional Comitee for Clinical Laboratory Standarts* (CLSI) e pelo *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

## Bibliografia

- Al-Bakri, A. G., Afifi, F. U. (2007) **Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration.** Journal of Microbiological Methods v.68:19-25.
- Baris, O., Gulluce, M., Sahin, F., Ozer, H., Kilic, H., Ozkan, H., Sokmen, M., Ozbek, T. (2006). **Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea Biebersteinii* Afan.** (Asteraceae). Turk. Journal Biol. 30: 65-73.
- Burt, S. A. (2007). **Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food; Tese de dissertação.** Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Veterinary Public Health; Utrecht University.
- Carson, C. F., Mee, B. J., Riley, T. V. (2002) **Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance Assays and electron microscopy.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.46(6): 1914-1920.
- Carson, C. F., Riley, T. V. (1993) **Antimicrobial activity of the essential oils of *Melaleuca alternifolia*, A review.** Letters in Applied Microbiology V. 16: 49-55.
- Carvalho, H.H.C., Cruz, F.T., Wiest, J.M. (2005) **Actividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil.** Rev. Bras.Pl. Med., Botucatu, v.7(3):5-32.
- Ceylan, E., Fung, D.Y. C. (2004) **Antimicrobial Activity of Spices.** Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, v. 1: 1-55.
- Chanthaphon, S., Chanthachum, S., Hongpattarakere, T. (2007) **Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* spp. against food-related microorganisms.** Songklanakarin Journal Science Technology, v. 30(1):125:131.
- Chitravadivu, C., Bhoopathi, M., Elavazhagan, T., Jayakumar, S., Balakrishnan V. (2009) **Screening of Antimicrobial Activity of Medicinal Plant Oils Prepared by Herbal Venders, South India.** Middle-East Journal of Scientific Research, v. 4 (2):115-117.
- Coelho, Meirilene G. (2009) **Óleos Essenciais para Aromaterapia.** Tese de Mestrado, Center of Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Science (CITAB).

Costa, A.C.B.P., Pereira, C.A., Freire, F., Junqueira, J.C., Jorge, A.O.C. (2009) **Actividade antifúngica dos extractos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*.** Revista de odontologia da UNESP, v. 38(2):111-116.

Cowan, M.M. (1999) **Plant Products as Antimicrobial Agents.** Clinical microbiology reviews, v.12(4):564-582.

Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G. (2000) **The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil).** Journal of Applied Microbiology, v. 88: 170-175.

d'Azevedo, P. A. (2004) **Avaliação de um sistema automatizado na identificação de espécies de *Enterococcus*.** Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 40(4): 237-239.

Das, K., Tiwari, R.K.S., Shrivastava D.K., (2010) **Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends.** Journal of Medicinal Plants Research, v. 4(2): 104-111.

Davies J. (1994) **Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes.** Science, v.264: 375-382.

Dorman, H.J.D., Deans, S.G. (2000) **Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.** Journal of Applied Microbiology v.88(2): 308-316.

Doyle, M.P., Beuchat, L. (2007) **Food Microbiology, fundamentals and frontiers**, 3ª edição. ASM Press. Washington, DC.

Duraipandiyan, V., Ayyanar, M., Ignacimuthu S. (2006) **Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India.** BMC Complementary and Alternative Medicine v., 6:35.

Edwards, E.L., Rodrigues, J. A., Ferreira, J., Goodall, D. M., Rauter, A. P., Justino, J., Thomas-Oates, J. (2006) **Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Characterisation of Secondary Metabolites from the Antihyperglycaemic Plant *Genista tenera*.** Electrophoresis v. 27: 2164-2170.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) (2000), Eucast Definitive Document - **Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution** Clinical Microbiology and Infection, V.6 (9):509-515.

Fernandes, T.T., Santos, A.T.F., Pimenta, Pimenta, F.C. (2005) **Actividade antimicrobiana das plantas *Planthymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*.** Revista de Patologia Tropical, v.34(2):113-122.

Ferreira, W.F.C., Sousa, J.C.F. (2000) **Microbiologia**, volume II. Lidel, edições técnicas. Lisboa.

Ferreira, W.F. C., Sousa, J.C F., Lima, N. (2010) **Microbiologia**. Lidel, edições técnicas. Lisboa.

Ferronato, R., Marchesan, E.D., Pezenti, E., Bednarski, F., Onofre, S.B. (2007) **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae)**. Revista Brasileira de Farmacognosia v. 17(2): 224-230.

Filho, V.C., Yunes, R.A. (1998); **Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente activos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para optimização da actividade**. Quimica Nova, v. 21(1):99-105.

Franco, J., Nakashima, T., Franco, L., Boller, C. (2005) **Composição química e actividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.15(3):191-194.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P. (2010) **Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites**. Química Nova, v.30, n.2, p.374-381.

Gur, S., Turgut-Balik, D., Gur, N. (2006) **Antimicrobial activities and some fatty acids of turmeric, ginger root and linseed used in the treatment of infectious diseases**. World Journal of Agricultural Sciences, v. 2(4): 439-442.

Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. (1999) **Antimicrobial activity of essential oils and plant extracts**. Journal of Applied Microbiology, v. 86(6): 985-990.

ICMSF - *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (2000) **Microorganismos de los Alimentos, su significado y métodos de enumeración**. 2ª edição. Editorial Acribia.

Itako, A.T., Schwan-Estrada K.R.F., Stangarlin, J.R., Tolentino Júnior, J.B., M.E.S., Cruz (2009). **Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extractos de plantas medicinais**. *Arquivo do Instituto de Biologia*, São Paulo, v.76(1):75-83.

Jay, J.M. (2000) **Modern food microbiology**, 6ª Edição. Aspen Publishers. Gaithersburg, Maryland.

Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., Figueiredo, A. C., Tilney, P. M., Van-Zyl, R. L., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Van-Vuuren, S. F. (2007) **Trichomes, essential oil composition and biological activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica* Codd, two species from the Cape region of South Africa**. *South*

*African Journal of Botany*, v.73: 102-108.

Kaur, K. Kaur H. (2010) **The Antimicrobial activity of essential oil and plant extracts of *Woodfordia fruticosa***. *Archives of Applied Science Research* v. 2 (1):302-309.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G-J.E (2001) **A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol**. *Journal of Applied Microbiology* v. 91:453-462.

Lourens, A.C.U., Reddy, D., Baser, K.H.C., Viljoen, A.M., Van-Vuuren, S.F. (2004). **In vitro biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species**. *Journal Ethnopharmacol*, v.9: 253-258.

Magro, A., Matos, O., Carolino, M., Bastos, M., Mexia, A. (2008) **Utilização de extractos aquosos de plantas na protecção de produtos agrícolas armazenados**. Workshop Plantas Medicinais e Práticas Fitoterapêuticas nos Trópicos. IICT / CCCM.

Mazza, P. (1994) **The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism**. *Bollettino chimico Farmaceutico*, v.133:3-18.

Michelin, D.C., Moreschi, P.E., Lima, A.C., Nascimento, G.G.F., Paganelli, M.O., Chaud, M.V. (2005) **Avaliação da actividade antimicrobiana de extractos vegetais**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15(4): 316-320.

Mihajilov-Krstev, T., Radnović, D., Kitić, D., Stojanović-radić, Z., Zlatković, B. (2010) **Antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against pathogenic microbial strains**. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, v. 62 (1):159-166.

Miyazawa, M., Shimabayashi, S. M., Hayashi, S. H., Nakamura, S., Kosaka, H., Kameoka, H. (2000) **Synthesis and biological activity of alpha-methylene-gamma-lactones as new aroma chemicals**. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48:5406-5410.

Montville, T.J., Matthews, K.R. (2008) **Food microbiology, an introduction**, 2<sup>a</sup> Edição. ASM Press. Washington, DC.

Nascimento, P.F.C., Nascimento, A.C., Rodrigues, C.S., Antonioli, A.R., Santos, P.O., Barbosa Júnior, A.M., Trindade, R.C. (2007) **Actividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifactorial dos métodos**. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v.17(1): 108-113.

Nogueira, M.A., Diaz, M.G., Tagami, P.M., Lorscheide, J. (2007) **Actividade microbiana de óleos essenciais e extractos de própolis sobre bactérias cariogénicas**. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28(1):93-97.

Nostro, A., Germano, M.P., D'Angelo, V., Marino, A., Cannatelli, M.A. (2000). **Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity.** Journal of Applied Microbiology, v.30(1): 379-384.

Okeke, M. I., Iroegbu, C. U., Eze, E. N., Okoli, A. S., Esimone, C. O. (2001) **Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity.** Journal of Ethnopharmacology, v. 78: 119-127.

Omer, S.A., Adam, S.E.I., Mohammed O.B. (2011) **Antimicrobial activity of *Commiphora myrrha* against some bacteria and *Candida albicans* isolated from gazelles at king khalid wildlife research centre.** Research Journal of Medicinal Plant, v. 5(1):65-71.

Ostrosky, E.A., Mizumoto, M.K., Lima, M.E. L., Kaneko, T.M., Nishikawa, S.O., Freitas, B. R. (2008) **Métodos para avaliação da actividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18(2): 301-307.

Packiyasothy, E. V., Kyle S. (2002) **Antimicrobial properties of some herb essential oils.** Food Australia, v.54:384-387.

Palmeira, J.D., Ferreira, S.B., Souza, J.H., Almeida, J.M., Figueiredo, M.C., Pequeno, A.S., Arruda, T.A., Antunes, R.M.P., Catão, R.M.R. (2009) **Avaliação da actividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extractos hidroalcoólicos de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.** RBAC, v.42(1):33-37.

Paradella, T.C, Koga-ito, C.Y, Jorge, A. O. C. (2007) ***Enterococcus faecalis*: clinical and microbiological considerations.** Rev Odontol. UNESP, v.36(2): 163-68.

Pereira, M.C., Vilela, G.R., Costa, L.M.A.S., Silva, R.F., Felicori, F.A., Fonseca, E.W.N., Piccoli, R.H. (2006) **Inhibition fungi growth through of utilization essential oils of spice.** Ciênc. agrotec., Lavras, v. 30(4):731-738.

Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S. (2006) ***In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils.** BMC Complementary and Alternative Medicine, v.6:39.

Rauter, A. P., Lucas, S., Almeida, T., Sacoto, D., Ribeiro, V., Justino, J., Neves, A., Silva, F. V. M., Oliveira, M. C., Ferreira, M. J., Santos, M. S., Barbosa, E. (2005) **Synthesis, surface active and antimicrobial properties of new alkyl 2,6-dideoxy-L-arabino-hexopyranosides.** Carbohydr. Res., v.340 (2):191-201.

Rauter, A. P., Martins, A., Borges. C., Ferreira, J., Justino, J., Bronze, M. R., Coelho, A. V., Choi, Y. H., Verpoorte, R. (2005) **Liquid Chromatography-diode Array Detection-electrospray Ionisation Mass Spectrometry/Nuclear Magnetic Resonance Analyses of The Antihyperglycemic Flavonoid Extract of *Genista tenera*. Structure Elucidation of a New Flavonoid-C-Glycoside.**

Journal Chromatogr. A. v. 1089:59-64.

Rauter, A. P., Piedade, F., Almeida, T., Ramalho, R., Ferreira, M. J., Resende, R., Amado, J., Pereira, H., Justino, J., Neves, A., Silva, F. V. M., Canda, T. (2004) **Sugar bislactones by one-step oxidative dimerization with pyridinium chlorochromate versus regioselective oxidation of vicinal diols.** Carbohydr. Res.,v.339:1889-1897.

Rauter, A.P., Almeida, T., Xavier, N.M., Siopa, F., Vicente, A. I., Lucas, S.D., Marques, J. P., Ribeiro, F.R., Guisnet, M., Ferreira, M. J. (2007) **Acid zeolites as efficient catalysts for O- and S-glycosylation.** Journal of molecular Catalysis A: Chemical v.275, 206-213.

Rauter, A.P., Martins, A., Lopes, R., Ferreira, J., Serralheiro, L. M., Araújo, M. E., Borges, C., Justino, J., Silva, F. V., Goulart, M., Oates, J. T., Rodrigues, J. A., Edwards, E., Noronha, J. P., Pinto, R., Filipe, P. M. (2009) **Bioactivity Studies and Chemical Profile of the Antidiabetic Plant *Genista Tenera*.** Journal of Ethnopharmacol. v.122:384-393.

Rosa, M.B., Oliveira, T.G., Carvalho, C.A., Silva, F.D., Carvalho, L.M., Nascimento, P.C., Peres, R.L. (2008) **Estudo espectrofotométrico da actividade fotoprotectora de extractos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea var. capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale (jacq.) cass* e *Sonchus oleraceus*.** Revista Eletrônica de Farmácia, v. 5(1):101-110.

Sabulal, B., Dan, M., Pradeep, N.S., Valsamma, R.K., George, V. (2006) **Composition and antimicrobial activity of essential oil from the fruits of *Amomum cannicarpum*.** Acta Phar, v. 56:473-480.

Salie, F., Eagles, P.F.K., Lens, H.M.J. (1996). **Preliminary antimicrobial screening of four South African *Asteraceae* species.** Journal Ethnopharmacol, v. 52(1): 27-33.

Santos, I.M., Venâncio, A.E., Lima, N. (1998). **Fungos Contaminantes na Indústria Alimentar.** Micoteca da Universidade do Minho.

Silva, F., Goular, M., Justino, J., Neves, A., Santos, F., Caio, J., Lucas, S., Newton, A., Sacoto, D., Barbosa, E., Santos, M. S., Rauter, A. P. (2008) **Alkyl deoxy-arabino- hexopyranosides: synthesis, surface properties and biological activities.** *Bioorg. Med. Chem.*, v. 16: 4083- 4092.

Silva, N.C. C. (2010) **Estudo comparativo de acção antimicrobiana de extractos e óleos de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas;** Tese de Dissertação. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu.

Simões, C; Schenkel, E; Gosmann, G; Mello, J; Mentz, L; Petrovick, P. (2007) **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 6ª Edição. Editora

Universidade/URFGS/Ed. Da UFSC. Florianópolis, Porto Alegre.

Svoboda, K.P., Hampson, J.B. (1999) **Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities.**

Taloro–Taloro (2002) **Foundations in Microbiology**, 4ª edição. The McGraw–Hill Companies.

Umeh, E.U., Oluma, H.O.A., Igoli, O. (2005). **Antibacterial screening of four local plants using an indicator-based microdilution technique.** Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. v.2(3): 238-243.

Ushimaru, P.I., Silva, M.T.N., Di Stasi, L.C., Barbosa, L., Fernandes, A.Jr. (2007) **Antimicrobial activity of medicinal plant extracts.** Brazilian Journal of Microbiology, v.38:717-719.

Valarmathy, K., Gokulakrishnan, M., Kausar, M.S., Paul, K. (2010) **A study of antimicrobial activity of ethanolic extracts of various plant leaves against selected microbial species.** International Journal of Pharma Sciences and Research v.1(8):293-295.

Vasinauskiene, M., Radusiene, J., Zitikaite, I., Surviliene, E. (2006) **Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria.** Agronomy Research, v. 4 (special issue):437-440.

Veiga Junior, V. F., Pinto A.C., Maciel, M. A. M. (2005) **Medicinal plants; safe cure?** QuímicaNova, v. 28(3):519-528.

WHO, 2002a. **Food safety and foodborne illness.** World Health Organization Fact sheet 237, revised January 2002. Geneva.

WHO, 2002b. World health report 2002: **Reducing risks, promoting healthy life.** Geneva, World Health Organization, 30 October 2002. ISBN 92 4 156207 2 ISSN 1020-3311, p. 248.

Xavier, N. M., Goulart, M., Justino, J., Neves, A., Chambert, S., Rauter, A.P., Queneau Y. (2011) **Synthesis of Sugars Embodying Conjugated Carbonyl Systems and Related Triazole Derivatives from Carboxymethyl Glycoside Lactones. Evaluation of their Antimicrobial Activity and Toxicity.** Bioorganic & Medicinal Chemistry 19(2):926-38.

Zgoda, J. R., Porter, J. R. (2001) **A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi.** Pharma Biol., v.39: 221-225.