FRANCINI CORDOVA PASSOS SICHIERI
FRANCISCO DE ASSIS KRETZL

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DE AMOSTRAS COMERCIAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* E DE *Rosmarinus officinalis*

GUARAPUAVA
2019

FRANCINI CORDOVA PASSOS SICHIERI
FRANCISCO DE ASSIS KRETZL

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DE AMOSTRAS COMERCIAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* E DE *Rosmarinus officinalis*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Avaliadora, como critério para obtenção do grau de bacharéis em Biomedicina.

Orientadora: Prof ª. Ms. Rubia Bonapaz.

GUARAPUAVA
2019

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

FIGURA **PÁG.**

1 **Figura 1** – Ilustração dos testes de disco-difusão em ágar com *Candida albicans* (A), *Escherichia coli* (B) e *Staphylococcus aureus* (C), com 5 marcas do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (1) e *Rosmarinus officinalis* (2)..... 20

2 **Figura 2** – Controle positivo (1) e controle negativo (2) com fluconazol para *Candida albicans* (A) e sulfazotrim para *Escherichia coli* (B) e *Staphylococcus aureus* (C)..... 21

QUADRO **PÁG.**

1 **Quadro 1 –** Óleos essenciais comerciais de *M. alternifolia e R. officinalis* obtidos pela técnica de arraste a vapor 08

2 **Quadro 2 –** Quadro de Pontos de Corte Clínicos..... 10

TABELA **PÁG.**

1 **Tabela 1** - Atividade do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre os microrganismos análise de 24 h 10

2 **Tabela 2** - Atividade do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* sobre os microrganismos análise de 24 h 13

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Grau Celsius
≥	Maior que, igual que
≤	Menor que, igual que
µL	Microlitro
µg	Micrograma
ATCC	*American Type Culture Collection*
CSLI	Clinical and Laboratory Standards Institute
et al.	E outros
H	Horas
mL	Mililitros
OE	Óleo Essencial
OEA	Óleo Essencial de Alecrim
OEM	Óleo Essencial de Melaleuca
UFC	Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

RESUMO 5
ABSTRACT 5
1. INTRODUÇÃO 6
2. MATERIAIS E MÉTODO 8
2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS 8
2.2 MICRORGANISMOS 8
2.3 TESTES DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR 9
3. *M. alternifolia* – FRANCINI CORDOVA PASSOS SICHIERI 10
3.1 RESULTADO 10
3.2 DISCUSSÃO 11
3.3 CONCLUSÃO 12
4.*R. officinalis* – FRANCISCO DE ASSIS KRETZL 13
4.1 RESULTADOS 13
4.2 DISCUSSÃO 13
4.3 CONCLUSÃO 15
5. CONCLUSÃO GERAL 15
REFERÊNCIAS 17
APÊNDICES 21

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DE AMOSTRAS COMERCIAIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* E DE *Rosmarinus officinalis*

SICHIERI, Francini C Passos[1]
KRETZL, Francisco de Assis[1]
BONAPAZ, Rubia[2]

RESUMO

Os microrganismos adquirem potencial relevância na área da saúde por estarem associados ao desenvolvimento de diversas doenças e por apresentarem resistência a medicamentos. Com a busca por novos tratamentos alternativos com ação antimicrobiana, as pesquisas *in vitro* são essenciais. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano das amostras comerciais dos óleos essenciais (OE) de *Melaleuca alternifolia* e de *Rosmarinus officinalis,* e, por conseguinte, a real possibilidade de aplicação desses produtos *in vivo* em infecções causadas por fungos e bactérias. No estudo a técnica empregada foi a de disco-difusão em ágar, usada na concentração de 100% dos OE em cepas de *Candida albicans, Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli.* A verificação do potencial de inibição do OE foi determinada avaliando-se o tamanho dos halos formados. Cinco marcas diferentes dos OE de cada planta foram testadas. As cinco marcas de OE de *M. alternifolia*, mostraram resultados satisfatórios e das cinco marcas do OE de *R. officinalis* duas marcas não obtiveram resultados. Sendo assim os óleos comerciais se mostraram positivamente eficientes no controle do desenvolvimento dos respectivos microrganismos, sendo considerada uma alternativa no tratamento contra os patógenos testados.

Palavras-chave: Alecrim. Antimicrobiano. Melaleuca. Óleo essencial.

ABSTRACT

Microorganisms acquire potential relevance in the health area because they are associated with the development of various diseases and because they have resistance to medications. With the search for new alternative treatments with antimicrobial action, *in vitro* research is essential. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antimicrobial effect of commercial samples of essential oils (OE) of *Melaleuca alternifolia* and *Rosmarinus officinalis*, and, consequently, the real possibility of applying these products *in vivo* in infections caused by fungi and bacteria. In the study, the technique used was disk-diffusion in agar, used in the concentration of 100% of OE in strains of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The verification of the inhibition potential of the OE was determined by evaluating the size of the formed halos. Five different OE brands from each plant have been tested. The five OE brands of *M. alternifolia* showed inhibitory results and only two OE of *R. officinalis* did not get satisfactory results. Thus, commercial oils were positively efficient in controlling the development of these microorganisms, being considered an alternative in the treatment against tested pathogens.

Keywords: Rosemary. Antimicrobial. Melaleuca. Essential oil.

[1]Acadêmicos do curso de Biomedicina, Centro Universitário Campo Real.
[2]Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Campo Real, Mestre em Ciência Animal, Universidade Paranaense, Paraná-Brasil.

1. INTRODUÇÃO

A maioria da população possui conhecimento e também emprega as plantas medicinais em seu dia a dia para diversos fins, tais como: perfumaria, culinária e finalidades terapêuticas. Com relação às finalidades terapêuticas nas quais atua, verifica-se que podem ser empregadas tanto no tratamento das doenças quanto na sua prevenção (OLIVEIRA et al., 2015; SAGAVE et al., 2015).

De fato, os produtos naturais têm sido amplamente utilizados na sociedade desde 3500 a.C., bem como os métodos medicinais variam da medicina popular a tratamentos validados. Considera-se o médico Paracelsus como o fundador da medicina com base em plantas medicinais. Suas descobertas, junto com outros pesquisadores, consolidaram o conhecimento no âmbito de produtos naturais. Entre as propriedades medicinais de produtos naturais, encontram-se propriedades anti-inflamatórias, antiespasmódicas, antitumoral, antimutagênicas, antibacterianas, antifúngicas, antivirais e como vermicidas (MOGOSANU et al., 2015).

Os óleos essenciais (OE) compõem um grupo de substâncias muito utilizado, isoladas de plantas, e os componentes dos OE têm sido amplamente descritos na literatura científica como versáteis no tratamento de muitas enfermidades. Seus ingredientes ativos são geralmente vários terpenos, metabólitos secundários excretados pelos vegetais para expulsar predadores ou agentes nocivos. O isolamento de moléculas bioativas também é realizado em fontes naturais, além das células vegetais. Alguns metabólitos produzidos por microrganismos também são fontes importantes de novas substâncias bioativas (BLUNT et al., 2013; FELIPE et al., 2018).

Melaleuca alternifolia, ou “Tea Tree” (árvore do chá ou Melaleuca) pertence à família da Myrtaceae*.* É uma árvore considerada de pequeno porte, apresentando-se, de no máximo, até sete metros de altura. Possui casca fina, e folhas afiladas. É precedente da costa sudeste da Austrália, região de New South Wales, e cresce próxima de regiões pantanosas ou de rios (VIEIRA, 2004).

Estudos mais antigos relataram a ação antibacteriana do OE de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), e nesta época esses estudos empregaram em suas análises parâmetros diversos e diferentes constituintes do produto natural (PACKER; LUZ, 2007).

O OE de *tea tree* (melaleuca) pode ser obtido a partir da hidro destilação das folhas de *M. alternifolia*, e a composição química varia de acordo com o método de extração e a região da cultura. Geralmente, esse óleo é uma mistura complexa de monoterpenos e terpenóides (50% de oxigênio e 50% de hidrocarbonetos) e aproximadamente 100 outras substâncias (BUSTOS-SEGURA; KÜLHEIM; FOLEY, 2015). De fato, dentre as substâncias encontradas no OE de melaleuca, o terpinen-4-ol é o componente primário (30%), inclusive

sendo indicado como o ingrediente ativo responsável pelas propriedades terapêuticas dessa planta. No entanto, em um estudo realizado na década de 1980, verificou-se que a atividade antimicrobiana do OE de melaleuca foi maior, quando comparada com a atividade do terpinen-4-ol isolado, desse modo, mostrando sinergismo entre os componentes da planta (MILLER, 1984).

Por outro lado, a espécie *Rosmarinus officinalis*, mais conhecido como alecrim apresenta diversos outros nomes, tais como: alecrim-de-cheiro; alecrim-das-hortas; alecrim-da-casa; alecrim-comum; alecrim-verdadeiro e rosmaninho. Esta planta é encontrada em todo o mediterrâneo, e pertence à família Lamiaceae a qual inclui cerca de 236 gêneros e 6900 a 7200 espécies em todo o mundo, sendo considerada como uma das maiores e mais distintas famílias de plantas com flores (RAJA, 2012).

A planta possui porte subarbustivo lenhoso, ereto e pouco ramificado de até 1,5 m de altura. Folhas são lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. Flores azulado-claras, pequenas e de aromas forte e muito agradável (LORENZI, H.; MATOS, F., 2006).

O óleo essencial de Alecrim vem sendo muito estudado pelo seu poder antioxidante e pela sua atividade farmacológica atribuída aos compostos fenólicos (AFONSO; SANT'ANA; MANCINI FILHO, 2010), sendo seus principais compostos 1,8-cineol, cânfora, α-pineno e β-pineno, aos quais podem ser atribuídas para atividades antibacterianas (BARRETO et al., 2014).

Verifica-se que o gênero *Candida* é o mais predominante nas infecções fúngicas. Entre as espécies desse gênero, existem espécies mais comuns e que estão mais presentes no dia a dia da saúde pública, como *C. albicans; C. rugosa; C. parapsilosis; C. krusei; C. glabrata; C. guilliermondii; C. lusitaniae* e *C. tropicalis* (RÖRIG; COLACITE; ABEGG, 2009). *C. albicans* é uma levedura geralmente encontrada nas superfícies das mucosas e dos tratos gastrointestinal e urogenital, todavia, com comportamento assintomático e inofensivo para essas superfícies. No entanto, pode-se desencadear uma infecção por *C. albicans* quando o sistema imune está em desiquilíbrio, assim desenvolvendo infecções (SANTANA et al., 2010; CALDERONE; FONZI, 2001).

Staphylococcus aureus é o agente mais comum que se encontra em infecções piogênicas, seja na derme ou em regiões mais profundas. As enfermidades ocasionadas por esse microrganismo variam de infecções simples, como: furúnculos, acne e celulite, até infecções severas, como osteomielite, pneumonia, endocardite, meningite, entre outras. Além dessas infecções citadas, *S. aureus* pode causar diversos tipos de intoxicações, durante um processo infeccioso ou não, doença de Ritter, intoxicação alimentar e choque tóxico da mulher menstruada (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae*,* é anaeróbica facultativa, a temperatura ideal para que essa bactéria cresça é de 37°C (FERREIRA; KNÖBL, 2009). Ela é responsável por aproximadamente 50 % de infecções hospitalares e 90% de infecções no trato urinário, acomete a população de todas as idades e tem uma destreza singular para vencer as barreiras do sistema urinário (KARLOWSKY et. al., 2002).

Buscando novos tratamentos alternativos com ação antimicrobiana, as pesquisas *in vitro* são essenciais, sendo assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana das amostras comerciais dos OE de *M. alternifolia* (melaleuca) e de *R. officinalis* (alecrim), e por consequência, a real possibilidade de aplicação deste produto *in vivo* para tratamento de infecções causadas por fungos e bactérias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram analisadas cinco marcas comerciais de cada OE de melaleuca e de alecrim, como mostra o Quadro 1. Foram adquiridos comercialmente no Brasil, em frascos âmbar devidamente rotulados, lacrados, contendo o volume de 10 mL e todos os OE foram obtidos pela técnica de arraste a vapor.

Quadro 1 – Óleos essenciais de Melaleuca e de Alecrim obtidos pela técnica de arraste a vapor

Melaleuca e suas marcas comerciais	**Alecrim e suas marcas comerciais**
1 – Arte dos Aromas **(lote: L:S 312, V: 11/21, Reg ANVISA: Nº 230351.166132/2014-17, Fabricado: Diadema/SP)**	**1 – Anil** **(lote: 0001 V: 05/2020 Reg ANVISA: Nº2.05955 Fabricado:Foz do Iguaçu)**
2 – By Samia **(lote:0318077, V: 04/21, Reg ANVISA: Nº 25351.339550/2016-70, Fabricado: São Paulo/SP)**	**2– Chamed** **(lote: 0008V: 05/2021 Reg ANVISA:Nº25351.166031/2018-19 Fabricado: Campo Largo ´PR**
3 – Laszlo **(lote: 1132, V: 02/21, Reg ANVISA: 203740-2, Fabricado:Belo Horizonte/MG)**	**3 – Derma Clean** **(lote:17248 V: 10/2019 Reg ANVISA:Nº25351.288227/2017-47 Fabricado: Juiz de Fora –MG)**
4 – Phytoterápica **(lote: POM 18.04, F: 06/18, V: 06/20, Reg ANVISA: Nº 343/05, Fabricado: Guarulhos/SP)**	**4 – Harmonie** **(lote: 165 V: 06/2021 Reg ANVISA:Nº 343/05 Fabricado:São Jose –SC)**
5 – WFN **(lote: 00915/18, F: 03/18, V: 03/21, Reg ANVISA: Nº 2535.1383826/2008-18, Fabricado: São Paulo/SP)**	**5 – Phytoterápica** **(lote: poar 19.2 V: 03/2021Reg ANVISA: Nº25351.103881/2014-23 Fabricado: Guarulhos-SP)**

2.2 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados foram doados pelo Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Campo Real. Foram utilizadas cepas padrão de *C. albicans* (ATCC90028), e isolados clínicos de *S. aureus* e *E. coli*.

Para garantir a viabilidade e pureza dos microrganismos, as bactérias e leveduras foram repicadas em Ágar sangue e incubadas em estufa a uma temperatura de 35 ±2 °C.

2.3 TESTES DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR

Foram seguidas as recomendações internacionais para testes de sensibilidade por disco-difusão para bactérias (CLSI, 2003) e para leveduras (CLSI, 2009). O experimento foi feito em triplicata para uma maior confiabilidade dos resultados.

As placas para inoculação utilizadas foram de Ágar Mueller Hinton (para as bactérias) – da marca NEWPROV e Ágar Mueller Hinton suplementada com glicose e azul de metileno (para a levedura) – da marca Probac do Brasil, adquiridas comercialmente, prontas e estéreis.

O inóculo foi selecionado através de captura de 3 a 5 colônias distintas de cada microrganismo, e então foram dissolvidas em 5 mL de solução de salina estéril (NaCl 0,85%), em seguida as suspensões foram submetidas ao vórtex por aproximadamente 15 segundos e a concentração foi sendo ajustada até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente 1×10^6 à 5×10^6 UFC/mL (CLSI, 2003; 2009).

Na câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, a superfície das placas estéreis de ágar Mueller-Hinton foram semeadas a partir da suspensão dos microrganismos previamente preparados e ajustados. Para isso, um swab estéril foi mergulhado na suspensão, retirando-se o excesso de líquido pressionando várias vezes contra a parede do tubo e foi feita a semeadura em três direções diferentes de maneira suave, finalizando-se com a passagem do swab na borda da placa (CLSI, 2003; 2009).

Discos estéreis foram dispostos sobre a placa semeada e impregnados com 10 µL de OE de Melaleuca e Alecrim em separado, das respectivas marcas citadas no quadro 1 como solução-teste utilizando uma micropipeta volumétrica. Com o auxílio de uma pinça flambada foi exercido uma leve pressão com a ponta da pinça para melhor adesão dos discos. Isto foi considerado como concentração 100% do OE. Cada placa recebeu cinco discos (um disco para cada óleo), para as cinco marcas diferentes em placas separadas para o OE de cada planta, respeitando a distância de aproximadamente 24 mm entre eles. Para o controle negativo, foi utilizado uma placa única para cada microrganismo utilizando um disco impregnado com 10 µL de solução de salina estéril (NaCl 0,85%). Para o controle positivo também foi utilizada uma placa única para cada microrganismo utilizando discos comerciais de sulfazotrim 25 mcg (sulfametoxazol 23,75 mcg + trimetoprim 1,25 mcg) – da marca CECON, para as bactérias, ao passo que para a levedura foi utilizado disco comercial de fluconazol 25

mcg – da marca CECON. As placas foram invertidas e levadas para a estufa com a temperatura ajustada em 35 ±2 °C (CLSI, 2003; 2009).

Segundo a Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – (BrCAST, 2019), e a bula de Fluconazol, (2019), os valores esperados dos halos estão melhor visualizados no quadro 2:

Quadro 2 - Quadro de Pontos de Corte Clínicos

Ponto de corte p/ diâmetro de halo (mm)	***C. albicans***			***S. aureus***			***E. coli***		
	R	**I**	**S**	**R**	**I**	**S**	**R**	**I**	**S**
Sulfazotrim	-			≤ 14	14 a 16	≥ 16	≤ 11	11 a 13	≥ 13
Fluconazol	≤ 14	15 a 18	≥ 19	-			-		

R- resistente; I - intermediário; S - sensível

Após 24 h de incubação das respectivas placas, foi realizada a leitura das mesmas, a fim de verificar se houve inibição de crescimento por parte dos óleos. Também foi verificado se as placas estavam satisfatoriamente estriadas e se as zonas de inibição resultantes eram uniformemente circulares com um tapete confluente de crescimento.

3. *M. alternifolia* – FRANCINI CORDOVA PASSOS SICHIERI

3.1 RESULTADOS

A atividade antimicrobiana do OE de melaleuca foi alcançada a partir da técnica de disco-difusão, como pode ser visualizado na Tabela 1 e Figura 1 (apêndice). Todos os óleos testados exerceram efeitos inibitórios sobre o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana do OE de *M. alternifolia* – Média do diâmetro do halo e desvio padrão em análise de 24 h

OEM 100 %	***C. albicans* (ATCC90028)**	***S. aureus***	***E. coli***
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Marca 1	*	24 mm ± 0,40	*
Marca 2	*	17 mm ± 0,36	*
Marca 3	*	16 mm ± 0,20	*
Marca 4	*	19 mm ± 1,66	*
Marca 5	*	21 mm ± 1,54	*
Controle Positivo	32 mm	28 mm	30 mm
Controle negativo	X	X	X

DP-desvio padrão ***-*** Inibição total do crescimento; **X-** sem inibição;

As cinco marcas inibiram totalmente o crescimento da levedura, não sendo possível observar qualquer tipo de crescimento no meio. Nas bactérias teve-se uma inibição total sem crescimento para a *E. coli* e na *S. aureus* houve formação de halos.

3.2 DISCUSSÃO

Verifica-se que a resistência microbiana tem sido uma enorme preocupação para a saúde publica, incluindo severas implicações econômicas e sociais (MIRANTE, 2015). Neste sentido, faz-se necessário um estudo sobre outras terapias e antimicrobianos mais eficazes.

Os antimicrobianos sintéticos por muito tempo conseguiram inibir a presença dos microrganismos, porém houve o aumento da resistência destes e por este motivo os estudos voltados aos antimicrobianos naturais com extratos e óleos vegetais têm se apresentado como tratamento potencial (UCKER, 2016).

A ocorrência de infecções hospitalares por microrganismos está apresentando grande aumento com o decorrer dos anos, têm representado um sério problema de saúde pública, pelas altas taxas de morbidade e mortalidade (DO NASCIMENTO, 2011). Segundo Carson, Hammer e Riley (2006), em um estudo realizado na década de 2000, o fato de inúmeras enfermidades causadas por microrganismos terem se apresentado como resistentes aos tratamentos convencionais desde essa época tem sido motivo para impulsionar a procura por tratamentos com base na medicina natural.

Oliveira et al., (2015) realizou a extração do OE de *M. alternifolia* e avaliou sua composição química, bem como desenvolveu uma formulação semissólida de uso tópico para a incorporação do óleo. De acordo com as análises cromatográficas, verificou-se que com o perfil do óleo extraído os seguintes componentes majoritários foram encontrados: α – terpineno, γ- terpineno, ρ – cimeno, terpinen4-ol e 1,8 – cineol.

O terpinen4-ol foi o composto majoritário do OE de *M. alternifolia* (40%) e o seu potencial antimicrobiano tem sido associado a esse elemento principalmente.

Avaliar a atividade antifúngica dos OE de *M. alternifólia* foi o alvo do estudo realizado por Cavalcanti, Almeida e Padilha (2011). Quando se avaliaram os efeitos das atividades antifúngicas em *C. albicans, C. glabrata e Sacharomyces cerevisiae* do óleo essencial de *M. alternifolia*, verificaram que esse óleo pôde alterar a fluidez e a permeabilidade da membrana nas concentrações de 0,25% e 1,0%, sugerindo-se uma atividade antifúngica devido à alteração das propriedades da membrana e ao comprometimento das funções.

De fato, as infecções fúngicas têm sido responsáveis por muitas mortes em todo o mundo, bem como contribuem para significativos gastos em saúde pública. Entre os possíveis agentes etiológicos, observa-se que *Candida* spp. apresenta considerável

relevância e prevalência. De acordo com McCarty e Pappas (2015), de 15 a 20 microrganismos do gênero *Candida* são descritos como causadores de infecção.

No entanto, quatro espécies do gênero *Candida* causam 96% das infecções: *C. albicans* é o principal agente etiológico, responsável por 42,5% das infecções, seguido por *C. tropicalis* (27,3%), *C. parapsilosis* (21,9%) e *C. glabrata* (4,4%) (LIU et al., 2014).

O desenvolvimento de resistência em *Candida* spp. para o fármaco anfotericina B, contra drogas do grupo azol, equinocandina e fluconazol, tem sido relatado em diferentes regiões do país, e também no mundo, como algumas áreas da América do Sul, Ásia e Oriente Médio. Essas ocorrências são alarmantes tendo em vista que essa resistência se desenvolveu contra medicamentos antifúngicos amplamente utilizados no combate às doenças fúngicas em todo o mundo. Anfotericina B, por exemplo, é um medicamento antifúngico clássico e, em muitos países, é o único medicamento disponível para o tratamento de infecções fúngicas hospitalares (FELIPE et al., 2018).

Packer e Luz (2007) equipararam o desempenho antimicrobiano e antifúngico dos seguintes óleos e de outras fontes como: alecrim; alho; andiroba; copaíba, extrato da folha de oliva; farnesol, melaleuca e própolis contra os microrganismos: *E. coli, C. albicans, S. aureus* e *Pseudomona aeruginosa,* em placas de cultura, onde conseguiu demonstrar que o óleo de melaleuca e de alecrim apresentam maior atividade bactericida e fungicida em relação aos outros óleos testados.

Também pôde ser verificada a atividade antimicrobiana das folhas de *M. alternifolia*. Sabe-se que o OE que pode ser encontrado na forma de chá (*tea tree*), tem sido usado como antisséptico tópico por décadas. Já foi observada a eficácia antimicrobiana da melaleuca (*tea tree*), bem como de nanopartículas de prata sintetizadas com extrato aquoso de folhas contra microrganismos infectantes da pele, tais como: *S. aureus* resistente à meticilina, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. pyogenes, pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Trichophyton mentagrophytes* assim como em *C. albicans*, e vírus do herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2) (RAMADAN et al., 2019).

Com relação ao efeito antimicrobiano em *E. coli*, verificou-se que três espécies do gênero *Melaleuca* apresentaram esse efeito, *M. fulgens*, *M. bracteata* e *M. leucadenderon*. Essas três espécies foram coletadas em diferentes regiões do Paquistão; e o éter metílico eugenol foi identificado como o componente majoritário dos óleos essenciais das três: *M. bracteata* (82,3%), *M. fulgens* (87,8%) e *M. leucadendron* (95,4%) (SIDDIQUE et al., 2017).

Nos artigos analisados, o poder inibitório do óleo de *M. alternifolia* mostrou-se com grande potencial antimicrobiano.

3.3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos foram favoráveis à ação antimicrobiana. Dessa forma, o óleo de Melaleuca confirma as expectativas como um ótimo agente antimicrobiano de amplo espectro. Os objetivos desejados com essa pesquisa foram plenamente alcançados indicando que os óleos comerciais de *M.* alternifólia, obtidos pelo método de extração de arraste a vapor, foram eficientes quanto a sua finalidade sendo considerada uma alternativa no tratamento de patógenos. E colabora para que mais pesquisas sejam realizadas no âmbito da saúde com diferentes microrganismos e diferentes concentrações.

4. *R. officinalis* – FRANCISCO DE ASSIS KRETZL

4.1 RESULTADOS

A atividade do OE de *Rosmarinus officinalis* OEA avaliada a partir da técnica de disco-difusão estão dispostas na tabela 2 leitura em 24 h também representadas na figura 1 (apêndice).

Tabela 2 - Atividade do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* sobre os microrganismos análise de 24 h

OEA 100 %	***C.albicans* (ATCC90028)**	***S.aureus***	***E.coli***
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Marca 1	*	7 mm ± 1,15	*
Marca 2	19 mm ± 0,75	X	*
Marca 3	X	6 mm ± 1,2	*
Marca 4	21 mm ± 0,49	7 mm ± 0,58	*
Marca 5	*	7mm ±0,58	*
Controle Positivo	32 mm	28 mm	30 mm
Controle Negativo	X	X	X

DP-desvio padrão ***-** Inibição total do crescimento; **X-** sem inibição;

O OEA apresentou resultados positivos sobre a *C. albicans* onde das cinco marcas apenas o óleo 3 não formou halo de inibição. A cepa da *E. coli* se mostrou sensível pois não houve crescimento, tendo inibição total perante todos os óleos. Já para *S. aureus*, tiveram pequena ou nenhuma inibição do crescimento todos os óleos mostraram resistentes.

4.2 DISCUSSÃO

Novas pesquisas mostram que atualmente, o interesse científico pelo potencial farmacológico de substâncias biológicas vem aumentando, onde a busca por compostos secundários naturais como opção para o controle de fungos e bactérias é

relatado em diversos trabalhos (BRANDT et al., 2017; CORREA, 2011; EVERTON et al., 2019; PEREIRA et al., 2006).

A infecção hospitalar é adquirida após a admissão da paciente em uma internação ou após a alta, onde o grupo dominante é por fungos principalmente *C. albicans*, tendo outras espécies presente e logo em seguida vem a contaminação por bactérias e, com isso, na saúde pública em geral este agravo está crescendo cada vez mais, com o passar dos dias os números de morbidade e mortalidade são bastante preocupantes (DO NASCIMENTO, 2011).

Nessa pesquisa foi encontrada uma suscetibilidade de *C. albicans, E. coli,* e *S. aureus* ao OEA empregado na concentração de 100%, mostrando o potencial inibitório frente ao fungo e as bactérias testados, complementando resultados encontrados em estudos anteriores (JIANG et al., 2011; HENTZ; SANTIN, 2007; SILVA et al., 2009; TAGAMI et al., 2009; WANG et al., 2008).

Ribeiro et al. (2012) apresentam os resultados que demonstraram que o OE de *R. officinalis* tem um potencial de inibição frente as cepas de *E. coli* e *Salmonella* spp., concluindo que os resultados obtidos indicam ser promissora a utilização de OE de alecrim isoladamente ou em associação com antibióticos convencionais no controle a bactérias potencialmente patogênicas de origem alimentar.

A partir dos resultados obtidos por Pinheiro et al. (2012), concluiu-se que o *R. officinalis*, *Calendula officinalis* e *Mikania glomerata* apresentaram ação bactericida e bacteriostática em baixas concentrações sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*.

As soluções aquosas e alcoólicas do OE de *R. officinalis* apresenta um grande potencial para composição de antissépticos ou desinfetantes frente aos agentes Gram positivos como *S. aureus*, *Micrococcus* sp., deixando perspectivas que a partir disso possa desenvolver um agente antimicrobiano eficaz e de baixo custo (DE SOUSA; CONCEIÇÃO, 2007).

Takarada et al., (2004), afirmam que o OE de alecrim demonstrou efeito inibitório da aderência de *S. mutans* e atividade inibitória do crescimento de bactérias Gram-negativas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum.*

Castro e Lima (2011) apontam que os OE de *Ocotea odorifera Vell*. e *R. officinalis*, apresentam uma fraca atividade sobre cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* envolvendo infecções da cavidade oral.

Silva et al. (2008) concluem que o alecrim possui compostos bio-ativos com atividade antimicrobiana *in vitro* sobre bactérias orais planctônicas por ele testados.

Brandt (2017) concluiu que o OEA se mostrou inibidor de crescimento e como um agente bactericida de três gêneros de fungos isolados de extrato de tomate contendo micélios, sendo *Mucor sp; Aspergilus sp; Penicillium* sp. sendo os melhores resultados obtidos para as bactérias gram-negativas *E. coli e Salmonella typhi,* e os resultados dos fungos a inibição foi superior ao do antifúngico clotrimazol.

Os resultados obtidos nesta pesquisa foram satisfatórios, porém com a necessidade de realizar novas pesquisas, pois nem todas as marcas se mostraram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos na concentração de 100% de OEA.

4.3 CONCLUSÃO

O OEA se mostrou eficaz contra os microrganismos testados com diferentes resultados, onde houve a inibição do crescimento da *C. albicans, E. coli e S. aureus,* mas a eficácia não foi igual para todos. Para a levedura *C. albicans* somente o óleo 3 não apresentou inibição. Para a cepa *S. aureus,* houve pequena inibição, porém, mostrou-se resistente se comparando ao halo esperado para Sulfazotrim. Já na cepa *E. coli*, foi totalmente inibida.

Sendo assim, é necessário realizar novos estudos para uma confirmação da utilização do OEA como terapia alternativa no tratamento da *C. albicans, E. coli* e *S. aureus,* sendo indispensável uma avaliação de diferentes concentrações do OE e da toxicidade do produto para uma melhor segurança na aplicação terapêutica.

5. CONCLUSÃO GERAL

Nas condições deste estudo, conclui-se que os OE comerciais de *M. alternifolia* e de *R. officinalis* apresentaram atividade antimicrobiana sobre as cepas testada com resultados significativos, levando a acreditar que os óleos em pauta tiveram os resultados positivo para que se siga com o estudo *in vivo*.

Os OE comerciais de *R. officinalis* apresentaram uma resposta significativa sobre os microrganismos testados, apenas os óleos 2 e 3 não obtiveram uma resposta satisfatória sobre a levedura *C. albicans* e *S. aureus.*

Na perspectiva da aplicação dos OE de *M. alternifolia* e de *R. officinalis* sendo uma possível opção para o tratamento de doenças infecciosas causadas por *C. albicans, E. coli* e *S. aureus,* onde se torna necessário o desenvolvimento de ensaios pré-clínicos, incluindo a curva de morte microbiana, concentração fungicida, fungistática, bactericida, bacteriostática e a realização de testes complementares para

estabelecer o real mecanismo de ação dos OE *M. alternifolia* e de *R. officinalis* frente aos microrganismos.

REFERÊNCIAS

AFONSO, M. D. S.; SANT'ANA, L. S.; MANCINI FILHO, J. Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas do oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, v. 35, n. 1, p. 129-148, 2010.

BARRETO, H. M. et al. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 59, n. 1, p. 290-294, 2014.

BLUNT JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MHG, Prinsep MR.Marine natural products. Nat Prod Rep**.**, v. 30, n. 1, p. 237-323, 2013.

BRANDT, Cláudia Cristina Machado. **Avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana do óleo essencial de alecrim (Rosmarinus officinalis) na aplicação em extrato de tomate**. 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2017.

BrCAST(Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**. Versão 04.10. 2019.file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/Tabela-pontos-de-corte-clinicos-BrCAST-17-10-2019-final%20(1).pdf

BUSTOS-SEGURA C, KÜLHEIM C, FOLEY W. Effects of terpenechemotypes of *Melaleuca alternifolia* on two specialist leafbeetles and susceptibility to myrtle rust. **J Chem Ecol**., v. 41, n. 10, p. 937-947, 2015.

CALDERONE, R. A .; FONZI, W. A. Fatores de virulência de *Candida albicans*. **Tendências em microbiologia** , v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, jan. 2006.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) E alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero Candida. **Rev Bras Pl Med** , v. 13, n. 2, p. 203-8, 2011.

CAVALCANTI, Y. W.; DE ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade antifúngica de três óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. **Revista Odontológica do Brasil Central**, v. 20, n. 52, 2011.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard - Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road,Suite 1400,Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

CLSI. **Método para antifúngica Disk Difusão Susceptibilidade Teste de leveduras**; Aprovado Guideline- Second Edition. Documento. CLSI M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; De 2009.

CORREA, Y. D. C. G. **Resposta de populações de *Sitophilus zea* mais à exposição dos óleos essenciais de cravo e de canela**. 2011. Tese de Doutorado. Dissertaçao de Mestrado, UFV.

DE SOUSA, T. M. P.; CONCEIÇÃO, D. M. Atividade antibacteriana do alecrim (Rosmarinus officinalis L.). **Ensaios e Ciência**, v. 5, n. 5, p. 7-13, 2007.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais:** verdades e mentiras - o que os usuários e os profissionais da saúde precisam saber. São Paulo: UNESP, 2007.

DO NASCIMENTO, A. R. Monografias de Especialização Infecção relacionada à assistência à saúde causada por leveduras do gênero Candida. 2011.

EVERTON, G. O. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim). **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 1 p. 60-81, 2019.

FELIPE, Lorena de Oliveira et al. Produtos naturais à lactoferrina, quitosana e Melaleuca alternifolia que se mostram promissores no tratamento da candidíase. **Revista Brasileira de Microbiologia** , v. 49, n. 2, p. 212-219, 2018..

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. In: JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: Facta. cap.4, p. 457-474, 2009.

FLUCONAZOL. Responsável técnico: Ana Paula Cotrim. São Paulo – SP: CECON Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos LTDA, 2019. Bula de discos para antifungigrama.

HENTZ, S. M.; SANTIN, N. C. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* l.) contra *Salmonella sp*. **Evidência-Ciência e Biotecnologia**, v. 7, n. 2, p. 93-100, 2007.

JIANG, Y. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 32, n. 1, p.63-68, 2011.

KARLOWSKY, J. A. et al. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2540-2545, 2002.

LORENZI, H, MATOS, F. J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**/ Francisco José de Abreu Matos/ Primeira Edição/ Instituto Plantarum/ Nova Odessa/ 512 pp. 2006.

LIU, S. et al. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 5, p. 395-402, 2014.

McCARTY, T.P., PAPPAS, P.G. Invasive candidiasis. **Infect Dis ClinNorth Am**. 30:103–124, 2015.

MILLER, C. Pouring a healing oil over troubled waters. **Aust Dr.** V. 7, n. 1, p.14-15, 1984.

MIRANTE, D. C**. Desenvolvimento Tecnológico e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Micropartículas de Polilisina e de Nanocápsulas contendo óleo essencial de Melaleuca Alternifolia Cheel (Myrtaceae).** 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Ponta Grossa, 2015.

MOGOSANU G.D. et. al. Prevention of microbial communities: novel approaches based on natural products. **Curr Pharm Biotechnol,** v. 16, n. 2, p. 94-111, 2015.

OLIVEIRA, M. I. et al. Extração e caracterização do óleo essencial de melaleuca e desenvolvimento de uma formulação semi-sólida de uso tópico. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 5, n. 1, p. 2 - 4, 2015.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev Bras Farmacogn**, V. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PEREIRA, M. C. et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PINHEIRO, M. A. et al. Efeito antimicrobiano de tinturas de produtos naturais sobre bactérias da cárie dentária. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 25, n. 2, p. 197-201, 2012.

RAJA, R. R. Medicinally potential plants of *Labiatae* (Lamiaceae) family: an overview. **Research journal of medicinal plant**, v. 6, n. 3, p. 203-213, 2012.

RAMADAN M.A., Shawkey AE, RABEH M.A., ABDELLLATIF A.O. Promising antimicrobial activities of oil and silver nanoparticles obtained from *Melaleuca alternifolia* leaves against selected skin-infeting pathogens. ***J Herb Med***. p. 100289, 2019; *in press.*

RIBEIRO, D. S. et al. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 687-695, 2012.

RÖRIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero Candida. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 2, p. 225-227, 2009.

SAGAVE, L. et al. *Melaleuca alternifolia* activity in nanoformulations and terpinen-4-ol against *Rhodococcus equi* isolates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 221-226, 2015.

SANTANA, D. P. et al. Prevalência de fatores de virulência de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças portadoras e não portadoras de síndrome de Down. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n.11, p.1-10, 2010.

SIDDIQUE, S. et al., Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils from leaves of three Melaleuca species of Pakistani flora. v.13, n.1, p.67-74, 2017.

SILVA, M. D. S. A. et al. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* L. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmaco**. n, v. 18, n. 2, p. 236-40, 2008.

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

TAGAMI, O. K. et al. Fungitoxidade de Bidens pilosa, *Thymus vulgaris, Lippia alba* e *Rosmarinus officinalis* no desenvolvimento in vitro de fungos fitopatogênicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 285-294, 2009.

TAKARADA, K. et al. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral microbiology and immunology**, v. 19, n. 1, p. 61-64, 2004.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

UCKER, C. D. L. Óleo **Essencial de Sementes e Folhas de *Syzygium cumini* e Óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia*:** Potencial Antimicrobiano e Antioxidante.**Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2016. 167 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.**

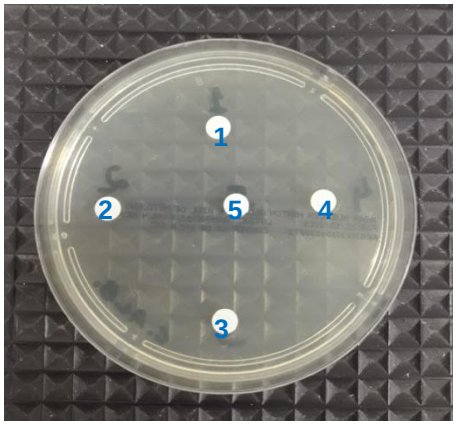
VIEIRA, Tatiana R. et al . Constituintes químicos de Melaleuca alternifolia (Myrtaceae). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 536-539, 2004.

WANG, W. et al. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1019-1022, 2008.

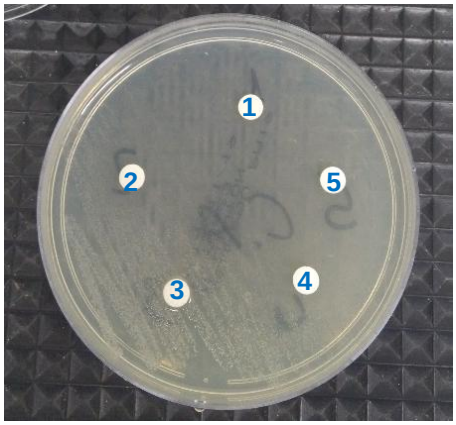
APÊNDICES

Figura 1 – Ilustração dos testes de disco-difusão em ágar com *Candida albicans* (A), *Escherichia coli* (B) e *Staphylococcus aureus* (C), com 5 marcas de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (1) e *Rosmarinus officinalis* (2).

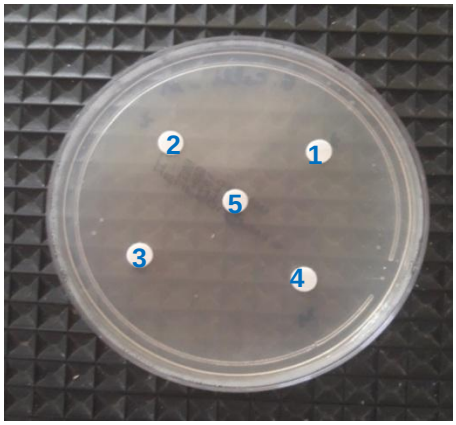
A1 – OEM



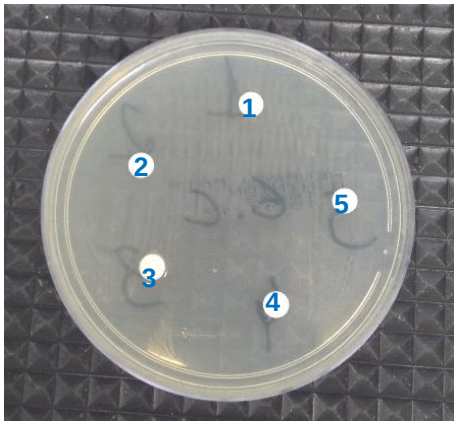
A2 – OEA



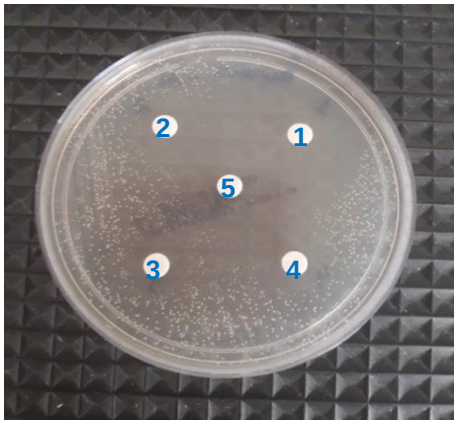
B1



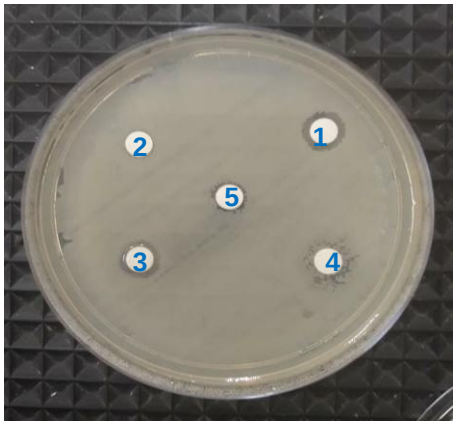
B2



C1



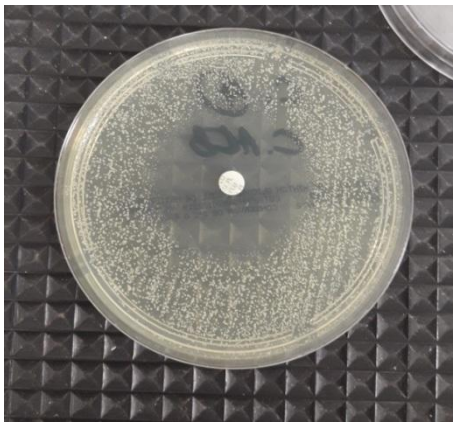
C2



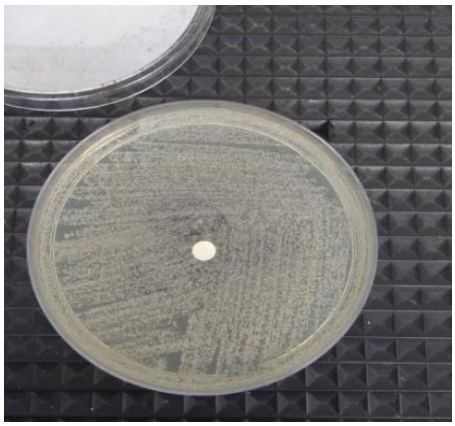
OEM: óleo essencial de Melaleuca; OEA: óleo essencial de Alecrim.

Figura 2 – Controle positivo (1) e controle negativo (2) com fluconazol para *Candida albicans* (A) e sulfazotrim para *Escherichia coli* (B) e *Staphylococcus aureus* (C).

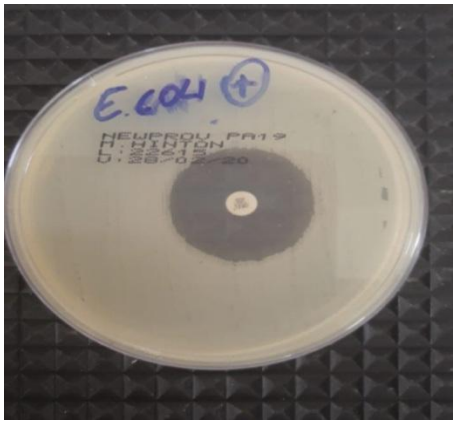
A1 – C +



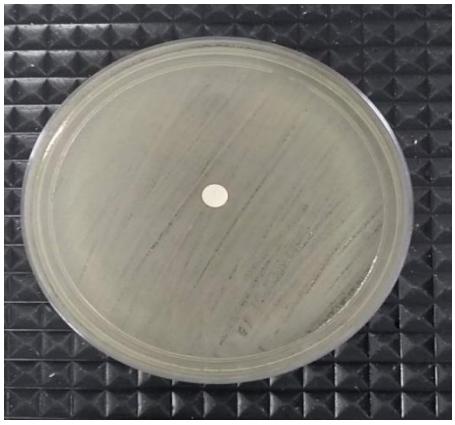
A2 – C –



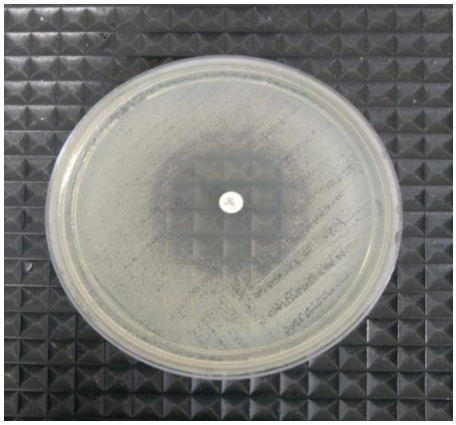
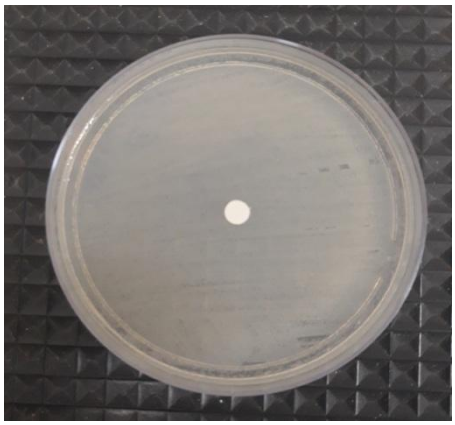
B1



B2



C1



C2