



Universidade Federal de São João del-Rei
Coordenadoria do Curso de Química



Metodologias utilizadas em ensaios antimicrobianos de óleos essenciais.

Raíra da Cunha

São João del-Rei –2016

Metodologias utilizadas em ensaios antimicrobianos de óleos essenciais

Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso, apresentada no 1º semestre do ano de 2016 ao Curso de Química, Grau Acadêmico Bacharelado, da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Química.

Autor: Raíra da Cunha

Docente Orientador: Luiz Gustavo de Lima
Guimarães

Modalidade do Trabalho: Revisão Bibliográfica

São João del-Rei – 2016

RESUMO

Os óleos essenciais são misturas de substâncias lipofílicas, obtidas por meio da destilação por arraste a vapor de diferentes partes dos vegetais. Estes compostos têm sido objeto de muitos estudos quanto as suas propriedades antimicrobianas, devido o grande número de resultados que demonstram estas propriedades sobre diversos microrganismos, tais como bactérias (Gram positivas e Gram negativas), fungos e vírus. Atualmente existe um grande número de trabalhos que apresentam as atividades antimicrobianas destes compostos, porém, há uma dificuldade de padronização dos ensaios utilizados, causando a obtenção de resultados muito específicos, dificultando a comparação entre os resultados obtidos e impedindo a obtenção de dados conclusivos. Dentre os vários métodos utilizados para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos óleos essenciais, os mais conhecidos são: o método de difusão em ágar, microdiluição e fumigação. Este trabalho teve como propósito realizar uma revisão bibliográfica abordando as principais metodologias utilizadas para avaliação antibacteriana e antifúngica de diferentes óleos essenciais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. DESENVOLVIMENTO	3
2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	3
2.2 MÉTODOS UTILIZADOS EM ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIBACTERIAA E ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	4
2.2 A . Métodos de Difusão.....	4
2.2 B. Métodos de Diluição	7
2.3 Método de Fumigação.....	10
3. CONCLUSÃO	11
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular por possuírem diversas propriedades farmacológicas e apresentarem vantagens quando comparados a alguns medicamentos, como por exemplo, a volatilidade, pois os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente inalações (BANDONI; CZEPAK, 2008). Possuem potencial medicinal, apresentando atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica e inseticida. As atividades dos óleos essenciais, bem como de seus constituintes, são bem documentadas, havendo um destaque em relação às atividades antimicrobianas (CASTRO et al., 2004b; CASTRO et al., 2010; BURT, 2004).

Nas últimas décadas a atividade antibacteriana vem sendo exaustivamente estudada, isso ocorre devido ao agravamento da resistência a antimicrobianos por determinadas populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar. A pesquisa de novos agentes antibacterianos se faz necessária devido ao surgimento de micro-organismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA et al., 2001)

Atualmente tem se observado um aumento na incidência de infecções fúngicas e também na resistência de algumas espécies de fungos aos fungicidas utilizados na prática médica e na agricultura, deste modo tem se estudado formas para desenvolver estratégias eficazes para o tratamento de doenças fúngicas oportunistas, considerando o aumento do número de pacientes imunocomprometidos e o uso indiscriminado de antibióticos. Além disso, tem se observado um interesse em diminuir o uso de fungicidas sintéticos na agricultura, questionando o impacto ambiental e o potencial risco sanitário relacionado ao uso desses compostos, existindo então uma grande demanda por novos antifúngicos de diferentes classes estruturais, agindo seletivamente e apresentando menos efeitos colaterais (ZANARDI et al., 2008; AMARAL E BARA, 2005; ABAD; ANSUATEGUI; BERMEJO, 2007).

No entanto, uma das principais características físico-química dos óleos essenciais é a sua lipofilicidade, dificultando as suas aplicações em meio aquoso. Havendo assim a necessidade de diferentes condições para sua aplicação, como por exemplo, a utilização de um sistema de liberação controlada (MARQUES, 2010). Sendo assim tem-se a necessidade de métodos de investigação *in vitro* que produzam resultados confiáveis e possam ser reproduzidos e validados, mas devido às peculiaridades que os óleos essenciais apresentam, essa tarefa tem sido bastante dificultada, deste modo para avaliar as atividades antibacterianas e fungitóxicas dos óleos essenciais é necessário levar em consideração a

técnica usada, o meio de cultura e os óleos essenciais testados (NASCIMENTO et al., 2007).

Na atualidade, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos óleos essenciais. As variações referentes à CMI (Concentração Mínima Inibitória) de óleos essenciais podem ser atribuídas a diversos fatores, dentre eles a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da colheita, se os óleos essenciais foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade testada. Deste modo, não existe um método padronizado para se obter os resultados de testes antimicrobianos e antifúngicos de óleos essenciais (FENNEL et al., 2004). Diante desta dificuldade de padronização dos ensaios utilizados, observa-se a obtenção de resultados muito específicos para os ensaios, o que dificulta a comparação entre os resultados obtidos e impede a obtenção de dados conclusivos.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica observando as publicações disponíveis relacionadas à aplicação de óleos essenciais no controle de micro-organismos, analisando as metodologias utilizadas para avaliação antibacteriana e antifúngica de diferentes óleos essenciais.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 - Óleos essenciais

Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis ou óleos etéreos, são encontrados em diversas partes das plantas, como nas folhas, sementes e raízes. São importantes matérias primas para as indústrias farmacêuticas e alimentícias (DORMAN & DEANS, 2000, TROMBETTA et al., 2005, EDRIS, 2007). Tratam-se de misturas complexas que podem conter 100 ou mais compostos orgânicos contendo apenas átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. Seus constituintes podem pertencer às mais diversas classes de compostos, porém os terpenos e os fenilpropanos são as classes mais comumente encontradas. Os terpenos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}). Seus constituintes terpênicos podem apresentar diversas funções orgânicas, como álcoois, cetonas, éteres, ésteres, aldeídos, hidrocarbonetos, entre outras (CASTRO et al., 2004; SILVA et al., 2009), como pode ser observado na Figura 1.

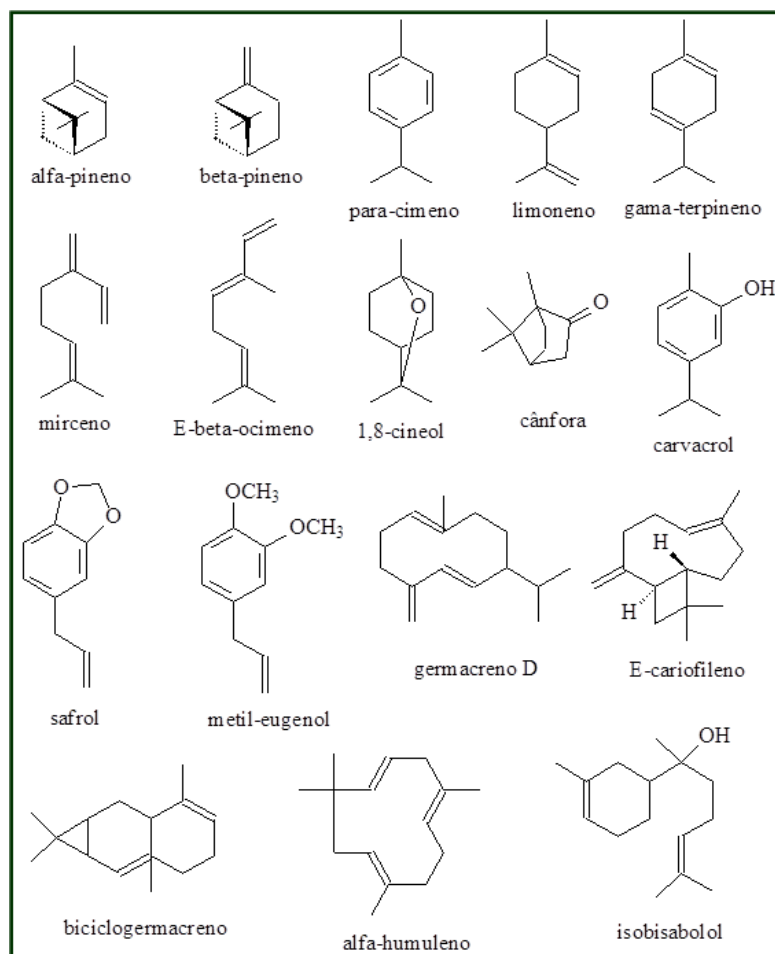


Figura 1 – Estruturas químicas de alguns monoterpenos e sesquiterpenos comumente encontrados na composição de diversos óleos essenciais.

Uma das principais características dos óleos essenciais, é que diferem dos óleos fixos (misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente de semente como óleo de soja, mamona, girassol, etc), por serem constituídos de moléculas de baixo peso molecular (geralmente contendo até quinze átomos de carbono). São líquidos à temperatura ambiente, com coloração variada, obtidos por meio de destilação por arraste a vapor d'água ou hidrodestilação (TROMBETTA et al., 2005; EDRIS, 2007; WOLFFENBUTTEL, 2007).

2.2 - Métodos utilizados em ensaios para avaliação de atividades antibacteriana e antifúngica de óleos essenciais

Nos ensaios para determinação das atividades microbiológicas dos óleos essenciais *in vitro*, é possível verificar uma variedade de metodologias propostas, o que torna a comparação entre esses estudos problemática (Hammer et al., 1999).

Para a avaliação das atividades antibacteriana, segue-se uma metodologia proposta pelo NCCLS (“*Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards*”), porém para óleos essenciais essa metodologia não pode ser seguida a risca devido a algumas peculiaridades apresentadas por eles, como por exemplo, lipofilicidade e volatilidade (DUARTE et al., 2005; NOSTRO et al., 2004; SAEED; SABIR, 2004; CHRISTOPH et al., 2000). Já para a avaliação das atividades antifúngicas de substâncias puras, a metodologia proposta pela organização americana “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, anteriormente denominada NCCLS) é a diluição em caldo, que apresenta a grande vantagem de propiciar alta reprodutibilidade entre os laboratórios (STOPPA et al., 2009). No entanto as duas metodologias citadas podem ser utilizadas em ambos os ensaios.

Devido a uma enorme variedade de metodologias propostas nos ensaios sobre as atividades farmacológicas *in vitro* dos óleos essenciais, é difícil comparar os resultados presentes na literatura (HAMMER et al., 1999), e conseqüentemente obter dados conclusivos. Dentre os principais métodos utilizados para avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica de diferentes compostos relatados na literatura, destacam-se três: ensaios de difusão, diluição e fumigação. Dentre estes, as técnicas mais conhecidas são difusão em ágar, difusão em disco e a microdiluição em caldo (RIOS et al. 1988; OSTROSKY et al., 2008).

2.2 A - Métodos de Difusão

Os ensaios de difusão são métodos quantitativos, nos quais o efeito e/ou atividade do composto avaliado pode ser determinado. Esses ensaios são fundamentados na difusão da substância a ser testada no meio de cultura sólido e inoculado com o microrganismo. A

partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo, no qual não há crescimento do micro-organismo, denominado halo de inibição. Diferentes tipos de reservatórios podem ser empregados, incluindo discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e poços feitos no meio de cultura. O composto ou uma mistura de compostos (por exemplo o óleo essencial) a ser testada é colocada em contato com o meio de cultura inoculado, e a maneira como se processa esse contato define os diferentes métodos de difusão (SILVEIRA, et al., 2009).

O método de difusão em ágar é o mais conhecido, foi descrito por Bayer e Kirby em 1966, e é um teste qualitativo e um dos métodos mais sensíveis, confiáveis e um dos mais utilizados pelos laboratórios de microbiologia. Eles também são chamados de difusão em placas e é um método físico no qual um micro-organismo é inserido em um meio com a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência e o halo de inibição de crescimento é medido partindo da circunferência do disco até a margem onde há crescimento de micro-organismos. De acordo com a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como sensíveis, moderadamente sensíveis e resistentes (PINTO et al., 2003; SEJAS et al., 2003).

É um método prático, de fácil execução e idealizado para bactérias de crescimento rápido. Os reagentes são relativamente econômicos, não há necessidade de equipamentos especiais, além de apresentar grande flexibilidade na escolha do número e tipo de antimicrobianos a serem testados. Entretanto, este método apresenta algumas limitações, como a dificuldade na avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos que se difundem mal através do ágar, como, por exemplo, a polimixina e até mesmo os óleos essenciais (JORGENSEN 1997; JORGENSEN et al.; 1998).

No intuito de avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais utilizando o ensaio disco-difusão com adaptações, Silveira et al. (2012) realizaram um estudo com os óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda) frente a 11 espécies de bactérias, incluindo espécies de importância em alimentos e em saúde pública. Utilizaram 5 espécies Gram-positivas e 6 espécies Gram-negativas, sendo elas: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia enterocolitica*. Os óleos essenciais puros (25 µL) foram impregnados em discos de papel de filtro e depositados sobre as placas inoculadas. Discos comerciais de ampicilina e cloranfenicol foram utilizados como antibióticos de referência, sendo medido o diâmetro da zona de inibição. O óleo essencial de citronela apresentou maiores zonas de inibição para as espécies Gram positivas, *S. aureus* (33,7 ± 1,5 mm), *L. monocytogenes* (28,0 ± 1,6 mm), *B. cereus* (50,7 ± 2,5 mm) e *B. subtilis* (85 ± 0,0 mm)

sendo a atividade contra *S. aureus* equivalente a da ampicilina. Já os óleos de eucaliptos apresentaram atividades inferiores às apresentadas pelo óleo de citronela sobre os mesmos micro-organismos, *S. aureus* ($22,9 \pm 0,5$ mm), *L. monocytogenes* ($21,5 \pm 1,3$ mm), *B. cereus* ($22,4 \pm 1,2$ mm) e *B. subtilis* ($22,5 \pm 1,1$ mm), no entanto, o óleo essencial de lavanda apresentou o maior espectro de ação sobre todos os micro-organismos avaliados, incluído Gram positivos e Gram negativos com CMI variando $11,7 \pm 0,3$ mm a $21,6 \pm 1,4$ mm.

Utilizando o mesmo método e também papel de filtro para inserir o óleo essencial Seth et al. (2013) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de folhas de *Lantana camara linn* contra cinco espécies bacterianas, *B. cereus*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram utilizadas diferentes diluições dos óleos essenciais em DMSO (dimetil sulfóxido). O óleo essencial exibiu atividade antimicrobiana notável contra todas as cepas bacterianas, demonstrando a alta sensibilidade das bactérias utilizadas, apresentando halos de inibição entre 19 a 24 mm, Estirpes *M. luteu* (24 mm), *E. coli* (24 mm), *S. aureus* (20 mm), *B. cereus* (19 mm), exceto para a bactéria *P. aeruginosa* que apresentou um halo de inibição de 9 mm, obtendo um baixo grau de sensibilidade.

Andrade et al. (2014) também utilizando o método de disco difusão, demonstraram a capacidade inibitória do óleo de *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae) frente a bactérias patogênicas humanas, sendo 4 bactérias Gram positivas: *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus* e *Staphylococcus aureus* e 7 bactérias gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *S. sonnei*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* e *Vibrio cholerae*. Além disso, 7 fungos patogênicos, *Aspergillus niger*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Pityrosporum ovale*, *Trichophyton sp*, *Microsporum sp.* e *Cryptococcus neoformans*. No teste de sensibilidade antibacteriana e antifúngica, utilizando 50 ug / disco de óleo essencial, a maior zona de inibição foi encontrada sobre *Microsporum sp.* (15,76 mm), seguida por *B. megaterium* (15,25 mm), *B. subtilis* (14,81 mm), *S. aureus* (14,53 mm), *S. sonnei* (14,33 mm), *S. paratyphi* (14,53 mm), *C. neoformans* (14,53 mm), *B. cereus* (13,43 mm), *P. ovale* (13,27 mm), *C. albicans* (13,12 mm), *B. dermatitidis* (13,09 mm) e *V. cholerae* (12,12 mm). Por outro lado mostrou-se inativo contra *P. aeruginosa*, *Trichophyton sp.*, *S. dysenteriae*, *S. typhi*, *A. niger* and *E. Coli*, que apresentaram diâmetro inferior a 8 mm.

Almeida et al. (2011) utilizaram o método difusão em disco de papel afim de avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de plantas medicinais sobre diferentes espécies de *Candidas*. Almeida utilizou os óleos essenciais de *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Cyperus articulatus* (piprioca), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Cinnamomum cassia* (canela da china), foi observado que todos os óleos essenciais testados apresentaram atividade antifúngica, com os halos de inibição

variando entre 27 e 30 mm, exceto o óleo essencial de *Cyperus articulatus* que não apresentou nenhuma inibição. Abrantes et al. (2013) avaliou a atividade antifúngica sobre *Candidas* isoladas das mucosas vaginal e anal utilizando os óleos *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela-da-índia), *Citrus limonum* Burm. F. (limão-siciliano), *Coriandrum sativum* L. Krause (coentro), *Eucalyptus globulus* Labill (eucalipto), *Eugenia coryophyllata* Thumb. (cravo-da-índia), *Mentha arvensis* L. Stewart (hortelã comum), *Mentha piperita* L. Briq. (hortelã-pimenta), *Mentha spicata* Schrad. ex Willd (hortelã-peluda), *Ocimum basilicum* Schumach. & Thonn (manjeriço) *Origanum vulgare* L. (G. Beck) Klok (orégano) e *Pimpinella anisum* Gaertn (erva-doce), sendo considerado com atividade o óleo essencial capaz de ocasionar um halo de inibição sobre o crescimento fúngico superior ou igual a 15 mm de diâmetro. Os óleos testados apresentaram forte atividade, pois as médias dos seus halos de inibição oscilaram entre 18 a 49 mm de diâmetro, mostrando-se superiores à média daqueles obtidos com a nistatina (16 mm).

Lima et al. (2006) utilizaram o método de difusão em meio sólido utilizando cavidade em placa, para avaliar as atividades antifúngica dos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Citrus limon* Risso, *Eucalyptus citriodora* HK, *Eugenia uniflora* L., *Peumus boldus* Benth e de *Rosmarinus officinalis* L. sobre cepas de *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea* e *C. tropicalis*. Os óleos que apresentaram maior atividade para *C. albicans* foram os óleos de *C. zeylanicum* e *P. boldus*, ambos apresentando um halo de 13 mm. O óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* apresentou maiores halos de inibição sobre *C. guilliermondii* (24 mm) e sobre *C. parapsilosis* (16 mm), já o óleo essencial de *Peumus boldus* Benth apresentou maiores atividades para *C. stellatoidea* (21 mm) e também para *C. tropicalis* (10 mm).

2.2 B – Métodos de diluição

Nos ensaios envolvendo os métodos de diluição os óleos essenciais são adicionados a um meio de cultura líquido, previamente inoculado com o micro-organismo teste. Após a incubação, o crescimento do micro-organismo é determinado pela leitura visual direta ou pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (VANDEN et al., 1991).

As vantagens deste método são a possibilidade de proporcionar mais informações quantitativas, poder ser aplicado a uma variedade mais ampla de isolados do que os testes de difusão, necessidade de uma pequena quantidade de amostra, ser barato, ter reprodutibilidade, ser 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura e possibilitar um registro permanente (KONEMAN et al., 2001, OSTROSKY et al., 2008).

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do micro-organismo inoculado no meio líquido e a concentração da substância

ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano. O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos micro-organismos. Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada de microrganismo em teste, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana (SAHM & WASHINGTONI, 1991). Nesse método de diluição, duas metodologias podem ser empregadas, são elas macro e microdiluição. A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com um volume do meio de cultura variando em uma faixa de 1 a 10 mL, essa metodologia consome muito tempo e requer grande espaço no laboratório gerando uma grande quantidade de resíduos, o que faz com esta metodologia seja pouco utilizada. Na microdiluição é utilizado microplacas com 96 poços, utilizando um volume de meio de cultura entre 0,1 a 0,2 mL. (OSTROSKY et al., 2008; SAHAM; WASHINGTON, 1991; ZGODA; PORTER, 2001).

Para avaliar a atividade antimicrobiana perante o método de diluição em caldo, Pires et al. (2013) utilizaram os óleos essenciais das folhas (frescas e secas) e flores de *Callisternon viminalis* frente a bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus roseus*; Gram positivas esporuladas: *B. cereus*, *Bacillus subtilis*; Gram negativas: *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella spp*, *P. aeruginosa*, *P. aeruginosa*, utilizando caldo Muller Hinton como meio de cultura e o óleo essencial diluído em DMSO, a CMI para todos os micro-organismos testados foi igual ou superior a 2.000 µg/mL, tanto para os óleos essenciais das folhas frescas, secas e das flores.

Utilizando o mesmo método, Aquino et al. (2010) avaliaram a capacidade antibacteriana dos óleos essenciais extraídos de *Lippia alba* e *Ocimum basilicum* frente a micro-organismos isolados de carnes bovinas, cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.*. Os autores observaram que o óleo de *Lippia alba* apresentou uma CMI de 6,25 µg/mL para *Escherichia coli*, 0,39 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e 6,25 µg/mL para *Salmonella sp.*, já as CMIs do óleo essencial de *Ocimum basilicum* foram de 1,56, 3,12 µg/mL para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus sp*, respectivamente. Pode-se concluir que o óleo essencial de *Lippia alba* apresentou maior eficiência como agente bacteriostático frente à *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.* isoladas de carnes bovinas, e que o óleo de *Ocimum basilicum* foi mais efetivo frente às cepas de *Escherichia*.

Chaibub et al. (2013) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, bem como sua atividade antifúngica sobre *Candida albicans*, utilizando o método de diluição em ágar para determinação da CMI. Foram encontrados valores de CMIs entre

0,195 a 3,125 mg/mL para as bactérias Gram positivas, e entre 6,25 a 12,50 mg/mL para as bactérias Gram negativas, e de 1,562 mg/mL para o fungo *C. albicans*. Lucena et al. (2014) utilizaram o método de micro-diluição em disco para determinar a atividade antibacteriana de *Cymbopogon citratus* frente a linhagens padrões e multirresistentes de *S. aureus*, *E. coli* e de *P. aeruginosa* provenientes de isolados clínicos, utilizando como controle os antibióticos padrões amicacina, neomicina e gentamicina. Os resultados foram analisados pela CMI na ausência e na presença do óleo, a CMI da amicacina foi de 312,5 µg/mL na ausência na ausência de óleo essencial e de 39,06 µg/mL na presença, o valor da CMI também foi diminuída na combinação de gentamicina e neomicina combinada com o óleo essencial.

Usando o mesmo método, porém para determinação da avaliação da atividade antifúngica, Cavalcanti et al. (2011) utilizaram os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Cymbopogon winterianus* (citronela) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) sobre *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. Os óleos essenciais apresentaram atividade antimicrobiana sobre as cepas testadas, sendo que o óleo de *Rosmarinus officinalis* apresentou uma menor CMI 0,5625 mg/mL seguido por *Cymbopogon* com 4,5 mg/ml e *Malaleuca* com 18 mg/mL.

Castro et al. (2011) avaliaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Ocotea odorifera* Vell. Rohwer (sassafrás) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) sobre o gênero *Candida*, para isso utilizou 16 cepas de *Candidas* para determinação de CMI, deste modo observaram uma discreta atividade antifúngica de ambos óleos essenciais, com CMI de 2,5 mg mL⁻¹ para sassafrás e CMI de 5 mg mL⁻¹ para alecrim em 68% e 81% das cepas avaliadas, respectivamente. Sendo possível concluir que os óleos essenciais de *O. odorifera* Vell. e *R. officinalis* L. apresentam fraca atividade sobre cepas de *C. albicans* em infecções da cavidade oral. Ribeiro et al. (2010) utilizaram o óleo essencial das plantas *Curcuma longa* L. e *Achillea millefolium*. frente a 20 cepas de micro-organismos isolados de material clínico humano, sendo 16 leveduras da espécie *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), 3 leveduras isoladas de candidíase vulvovaginal (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*) e uma amostra de *S. aureus* isolado de lesões cutâneas. Entre todos os microrganismos os óleos essenciais não inibiram o crescimento sobre *S. aureus*, que foi capaz de desenvolver até na concentração máxima analisada (5,0 mg mL⁻¹). Verificou-se uma inibição maior do óleo essencial de *A. millefolium* em relação ao óleo essencial de *C. longa* para *C. albicans*, sendo a CMI para *A. millefolim* variou entre 0,312 mg/mL a 1,25 mg/mL, o óleo de *C. longa* variou de 0,625 mg/mL a 2,25 mg/mL, para o fungo *C. glabrata* o óleo *C. longa* teve o menor valor de CMI 0,625 mg/mL e para *A. millefolim* uma CMI de 1,25 mg/mL e para *C. tropicalis* ambos obtiveram uma CMI igual a 1,25 mg/mL.

2.2 C – Método de fumigação

A utilização de ensaios utilizando o método de fumigação para verificação do potencial inseticida e fungicida de óleos essenciais extraídos de várias espécies vegetais, para controle de pragas de grãos armazenados e de micro-organismos em alimentos, tem sido nos últimos anos bastante difundida em diversos países (CHU et al., 2001; SUHR; NIELSEN, 2003; BRITO et al, 2006; ESTRELA et al., 2006). O método consiste na aspersão de gás ou líquido no ambiente para a atividade microbiocida. Tendo em vista a volatilidade apresentada pelos constituintes dos óleos essenciais, este método pode ser utilizado para avaliar o efeito dos vapores do óleo essencial sobre o crescimento e/ou inibição de micro-organismos.

Guimarães et al. (2011) avaliaram os efeitos fungitóxicos do óleo essencial de capim-limão e do seu constituinte majoritário citral sobre a inibição micelial dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum cubense*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris* sp. e *Alternaria alternata*. Os ensaios para verificação das atividades fungitóxicas foram realizados aplicando o teste de fumigação *in vitro* sobre a inibição micelial dos fungos fitopatogênicos estudados. O citral foi o composto que apresentou os menores valores de CMI e para todos os fitopatógenos em relação ao óleo essencial, evidenciando a sua atividade fungitóxica e a sua importância na atividade do óleo essencial.

Já Pimentel et al. (2010) utilizaram o mesmo método no intuito de determinar a ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). As avaliações da atividade antifúngica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (cipó vick) foram realizadas com cepas puras de *Aspergillus flavus* produtora de aflatoxina, isoladas da castanha-do-Brasil. Os resultados da atividade fungitóxica de *Tanaecium nocturnum* foram condizentes com os diversos efeitos biológicos de óleos essenciais relatados por diversos autores. A técnica de fumigação apresentou efeito semelhante em relação à aplicação por meio de contato. Avaliando os dois processos de controles micelial, constatou-se que aos cinco dias de incubação do *Aspergillus flavus* a técnica de contato apresentou baixa superioridade em relação à de fumigação, com inibição total obtida nas concentrações de 781 ppm e 788 ppm, respectivamente.

3. CONCLUSÃO

Existem muitos métodos descritos na literatura com o intuito de determinar as atividades antimicrobianas dos óleos essenciais. No entanto, há uma grande dificuldade em comparar os resultados encontrados por estes métodos, principalmente devido a ausência de métodos padronizados. Os métodos diferem em muitos fatores, e conseqüentemente ocasionam grande influência sobre os resultados obtidos. Sendo assim, uma atividade encontrada empregando um determinado método não pode ser comparada com aquela obtida em outro método. Diante do trabalho desenvolvido, observou-se que para a avaliação das atividades fungitóxicas e antibacterianas dos óleos essenciais, o método de diluição em ágar é o mais utilizado, devido à simplicidade de execução e ao baixo custo. Porém o método da microdiluição também tem sido bastante utilizado, principalmente devido à sua sensibilidade e quantidade mínima de reagentes, o que possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados. Já o método de fumigação é geralmente utilizado para a avaliação da atividade antifúngica.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc Online Ed.*, v. vii, p. 116-145, 2007.

ABRANTES, M.R.; LIMA, E.O.; MEDEIROS, M.A.P.; MENEZES, C.P.; GUERRA, F.Q.S.; MILAN, E.P. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida* não albicans. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 94, n. 3, p. 227 – 233, 2013.

ALMEIDA, L. F. D.; CAVALCANTI, Y. W.; VIANA, W. P.; LIMA, E. O. 2011. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre *Candida Albicans*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 14 n. 4, p. 51-56, 2011.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 5- 8, 2005.

ANDRADE, T. C.B.; , LIMA, G. L.; FREITAS, R. M.; ROCHA, M. S. ; ISLAM , T.; SILVA, T. G.; MILITÃO, G. C. G. Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of croton zehntneri (euphorbiaceae). **Anuais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 87, n. 1, p. 73-82, 2015.

AQUINO, L. C. L.; SANTOS, G. G.; TRINDADE, R. T.; ALVES, J. A. B.; SANTOS, P. O.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; CARVALHO, L. M.; Atividade Antimicrobiana dos óleos essenciais de Erva-Cidreira e Manjeriço frente a bactérias de carnes bovinas. **Revista Alimentos e Nutrição Araraquara**. v. 21, n. 4, p. 529-535, 2010

BANDONI, A.L.; CZEPACK, M.P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitória: Edufes, 2008. 624p.

BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. *Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures*. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington: DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125. 1991.

BRANDÃO, G.C. Isolamento biomonitorado de substâncias antimicrobianas de Polygonum spectabil Mart e determinação da CIM para uma chalcona antimicrobiana. 2004. 194p. Tese de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFMG, Belo Horizonte.

BRITO, J.P.; OLIVEIRA, J.E.M.; BORTOLI, S.A. Toxidade de óleos essenciais de *Eucalyptus ssp.* sobre *Callosobruchus maculants* (Coleóptera : Bruchidae). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n 1, p. 96-103, 2006.

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

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários. 2ª Ed. Viçosa, MG: Visconde do Rio Branco, p.103, 2004.

CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L.O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. 2004. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004

CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.

CASTRO, R. D.; LIMA, E.O. Antifungal activity of Brazilian sassafras (*Ocotea odorifera* Vell.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils against the genus *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 13, n. 2, p. 203-208, 2011.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N.; Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. **Revista Odontologia Brasileira Central**. v. 20, n. 52, p. 68-73, 2011.

CHAIBUB, B.A.; OLIVEIRA, T.B.; FIUZA, T.S.; BARA, M.T.F.; TRESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R. Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 225-229, 2013.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology** , v. 91, n. 1, p. 105-108, 2004.

CHRISTOPH, F.; KAULFERS, P. M.; SATAHL, B. E. A comparative study of the in vitro antimicrobial activity of tea tree oils s.l. with special reference to the activity of β - triketones. **Planta Medicinal**, v. 66, n. 6, p. 556-560, 2000.

CHU, C.L.; LIU, W.T.; ZHOU, T. Fumigation of sweet cherries with thymol and acetic acid to reduce postharvest brown rot and blue mold rot. **Fruits**, v. 56, n. 6, p.123-130 .2001

Dorman HJD, Deans SG 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DUARTE, M. C. T; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C.; 2005. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Reserch**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

ESTRELA, J.L.V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉRCIO, M.R.; LIMA, M.S. 2006. Toxidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 217-222, 2006.

FENNEL, C.W.; LINDSEY, K. L.; MC GAW, L. J. SPARG, S. G.; STAFFORD, G. I.; ELGORASHI, E. E.; GRACE, O. M. Review: Assessing African medicinal plants for effi cacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 205-217, 2004.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; SOUSA, P. E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S. S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.

HAMMER, K. A.; DRY, L.; JOHNSON, M.; MICHALAK, E.M.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. **Molecular Oral Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 389-392, 2003.

JORGENSEN, J. H; Laboratory issues in the detection and reporting antimicrobial resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 11, n. 4, p. 790-792, 1997.

JORGENSEN, J.H.; FERRERO, M.J. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 11, p. 973-980, 1998.

KARAMAN, I.; GULLUCE, M.; OGTUTÇU, H.; SENGUL, M.; ADIGUZEL, A.. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 231-235, 2003.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, p.1465, 2000.

LIMA, O. L.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista brasileira Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LUCENA, B. F. F.; TINTINO, S. R.; FIGUEIREDO, F. G.; OLIVEIRA, C. D. M.; AGUIAR, J. J. S.; CARDOSO, E. N.; AQUINO, P. E. A.; ANDRADE, J. C.; COUTINHO, H. D. M.; MATIAS, E. F. F. 2014. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. **Acta biológica Colombiana**, v. 20, n. 1, p. 39-45, 2015.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 313–326, 2010.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A. L. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTOLIOLLI, A. R.; SANTOS, P.O.; JÚNIOR, A. M.B.; TRINDADE, R.C.; Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant *staphylococci* to oregano essential oil, *carvacrol* and *thymol*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R.; Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SILVA, D. M. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazonica**, v. 40 n. 1, p. 213-220, 2010.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUANES, M.C.; MUNOZ, J.D., CRUANES, J., FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 37-40, 2001.

PINTO, T.J.A.; KANEKO T.M.; OHARA M.T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: **Atheneu Editora**, p. 325, 2003.

PIRES, C. H.; PAULA, J. A. M.; TRESVENZOL, L. M. F.; FERRI, P. H.; PAULA, R. P.; FIUZA, T. S.; BARA, M. T. F.; Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e flores de *Callistemon viminalis* (sol. ex Gaertn.) *G. Don ex Loudon* (Myrtaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 597-601, 2013.

RIBEIRO, D. I.; ALVES, M. S.; FARIA, M. G. I.; SVIDZINSKI, T. I. E.; NASCIMENTO, I. A.; FERREIRA, F. B. P.; FERREIRA, G. A.; GAZIM, Z. C. Determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) e de *Achillea millefolium* (Asteraceae) cultivadas no Noroeste do Paraná. **Arquivos de Ciência Saúde UNIPAR**, v. 14, n. 2, p. 103-109, 2010.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.

SAEED, M. A.; SABIR, A. W. Antibacterial activities of some constituents from oleo-gum-resin of *Commiphora mukul*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 204-208, 2004.

SAHM, D. F.; WASHINGTON II, J. A. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: Balows, A.; Hauser, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shamody, H.J. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1105-1116, 1991.

SEJAS, L.M.; SILBERT, S.; REIS, A.O.; SADER, H.S; Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2003.

SETH, R.; MOHAN. M.; SINGH, P.; HAIDER, S. Z.; GUPTA, S.; BAJPAI, I.; SINGH, D.; DOBHAL, R.; Chemical composition and antibacterial properties of the essential oil and extracts of *Lantana camara* Linn. from *Uttarakhand (India)*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S1407-S1411, 2012.

SILVA, C. B.; SIMIONATTO, E.; HESS, S. C.; PERES, M. T. L. P.; SIMIONATTO, E. L.; JÚNIOR, A. W.; POPPI, N. R.; FACCENDA, O.; CÂNDIDO, A. C. S.; SCALON, S. P. Q. 2009. Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *Hydrocotyle bonariensis* Lam (araliaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2373-2376, 2009.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, J. S.; CRUZ, A.L.N.; MENDES, J.C.; Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão, **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SILVEIRA, S. M.; CUNHA, A.; SCHEUERMANN, G. N.; SECCHI, L.; VERRUCK, S.; KROHN, M.; VIEIRA, C. R. W.; Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 471-80, 2012.

SPRINGFIELD, E. P; AMABEOKU, G.; WEITZ, F.; MABUSELA, W.; JOHNSON, Q. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 434-439, 2003.

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H.; CUNHA, W. R.; ANDRADE, M. L.; MARTINS, C. H. G. 2009. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**. v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

SUHR, K. I.; NIELSEN, P. V. 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye spoilage fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 4, p. 665-674, 2003.

TROMBETTA, D.; CASTELI, F.; SARPIETRO, G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M. T.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G.; Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

Vanden Berghe, D.A.; Vlietinck, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Dey, P.M., Harbone, J.D. (eds), *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, v.38, n. 2, p. 47-69, 1991.

WOLFFENBUTTEL, A. N.. Óleos essenciais. Informativo CRQ-V, ano XI, n.º105, págs. 06 e 07 novembro/dezembro/2007.

ZANARDI, D.; NUNES, D. H.; PACHECO, A. S.; TUBONE, M. Q.; SOUZA FILHO, J. J. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 2, p. 119-24, 2008.

ZGODA, J. R.; PORTER, J. R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Journal of Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 3, p. 221-225, 2001.