

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA PROF. DELBY
FERNANDES DE MEDEIROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

ARISTIDES MEDEIROS LEITE

“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
SOBRE ESPÉCIES BACTERIANAS POTENCIALMENTE
CAUSADORAS DE ENDOCARDITE INFECCIOSA”.

JOÃO PESSOA – PB

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ARISTIDES MEDEIROS LEITE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
SOBRE ESPÉCIES BACTERIANAS POTENCIALMENTE
CAUSADORAS DE ENDOCARDITE INFECCIOSA”.

Tese apresentada na UFPB como exigência para
obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos, na área de Farmacologia, do Centro de
Ciências da Saúde.

ORIENTADORA:

Prof^a Dr^a Edeltrudes de Oliveira Lima

CO-ORIENTADORES:

Prof^a Dr^a Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

João Pessoa - PB

2007

ARISTIDES MEDEIROS LEITE

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
SOBRE ESPÉCIES BACTERIANAS POTENCIALMENTE
CAUSADORAS DE ENDOCARDITE INFECCIOSA”**

BANCA EXAMINADORA:

Profª Drª Edeltrudes de Oliveira Lima (orientadora)

Profª Drª Margareth de Fátima F. Diniz (co-orientadora)

Prof. Dr. Adailson Pereira de Souza (examinador)

Prof. Dr. João Modesto Filho (examinador)

Profª. Drª Leônia Maria Batista (examinadora)

Profª Drª. Maria Carmeli Correia Sampaio (examinadora)

Profª Drª Tereza Helena C. de Vasconcelos (examinadora)

Aprovado em: 30 de novembro de 2007

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho:

aos meus filhos Lucas e Bianca,

minha esposa Cláudia

e a meus pais Edmilson e Beatriz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão da minha existência, por toda força e proteção nessa caminhada.

A meus pais José Edmilson e Beatriz Medeiros por seus exemplos de vida.

A minha esposa Cláudia e aos meus filhos Lucas e Bianca pela paciência e compreensão nos momentos de ausência.

Aos professores doutores Edeltrudes de Oliveira Lima, Margareth de Fátima F. Melo Diniz e Isac Almeida de Medeiros por acreditarem na execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Evandro Leite Souza pela imprescindível colaboração.

A Prof^a. Dr^a. Rilva de Sousa Lopes pela ajuda na análise estatística dos resultados.

Ao farmacêutico Vinícius N. Trajano pelo apoio na execução dos experimentos.

Aos professores, funcionários e alunos do Laboratório de Micologia do CCS da UFPB pela sua acolhida.

Aos professores de Semiologia Médica da UFPB, pelo apoio.

Enfim, agradeço a todos aqueles que incentivaram e contribuíram direta ou indiretamente para que essa meta fosse alcançada.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor. Mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus, não somos o que éramos”.

Martir Luther King

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade biológica *in vitro* de óleos essenciais e fitoconstituintes sobre bactérias potencialmente envolvidas na etiopatogênese da Endocardite Infecciosa. Nesse contexto, para os ensaios biológicos foram utilizados óleos essenciais de *Aloe vera* L., *Caryophyllus aromaticus* L., *Eucalyptus globulus* L., *Eugenia uniflora* L., *Laurus nobilis* L., *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita* L., *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L., *Pimpinella anisum* L. e *Rosmarinus officinalis* L., além dos fitoconstituintes alfa-pineno, beta-pineno, citral e eugenol frente as bactérias *Escherichia coli*, *Eikenella corrodens*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*. Todas as espécies bacterianas, Gram-negativas e Gram-positivas, foram sensíveis ao *L. nobilis* e *O. vulgare* com halos de inibição superiores a Penicilina G Cristalina e Gentamicina (grupo controle). A atividade antibacteriana foi determinada pela medida da Concentração Inibitória Mínima - CIM, e pelo nível de resistência, verificadas através da curva de Cinética Bacteriana. Os óleos essenciais de *L. nobilis* (1,25 µL/mL) e *O. vulgare* (20 µL/mL) se destacaram por apresentarem inibições de 80 % e 100 %, respectivamente, frente às bactérias. Alfa-pineno (40 µL/mL), beta-pineno (40 µL/mL) e eugenol (1,25 µL/mL) inibiram 75%, 90% e 100% das cepas bacterianas, respectivamente. Todas as espécies bacterianas ensaiadas se apresentaram resistentes ao citral. As curvas de cinética bacteriana do *S. aureus* ATCC 6538 foram significativamente efetivas frente a alfa-pineno (20 µL/mL), beta-pineno (20 µL/mL) e eugenol (10 µL/mL). Os ensaios de toxicidade frente a *A. salina* foram considerados altamente ativos, com

valores de CL_{50} de 89,88 (*L. nobilis*), 14,91 (*O. vulgare*), 47,16 (eugenol) e 9,59 (alfa-pineno) e foi demonstrado toxicidade sobre as larvas de *A. aegypti*, onde *O. vulgare* e *C. aromaticus* mataram 100% das larvas em 24 horas. A efetiva atividade bacteriana desses óleos essenciais e fitoconstituintes, bem como sua citotoxicidade, possibilitam o seguimento de pesquisas com essas substâncias naturais bioativas, em busca de futuras terapias alternativas.

Palavras-chaves: óleo essencial; endocardite infecciosa; atividade antibacteriana; toxicidade.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the *in vitro* biological activity of essential oils and phytochemicals on bacteria potentially involved in etiopathogenesis of Infective Endocarditis. In this context, for the biological tests were used essential oils of *Aloe vera* L., *Caryophyllus aromaticus* L., *Eucalyptus globules* L., *Eugenia uniflora* L., *Laurus nobilis* L., *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita* L., *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L., *Pimpinella anisum* L. and *Rosmarinus officinalis* L., in addition to fitoconstituíntes alpha-pinene, beta-pinene, citral and eugenol front the bacteria *Escherichia coli*, *Eikenella corrodens*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. All bacterial species, Gram-negative and Gram-positive, were sensitive to *L. nobilis* and *O. vulgare* with halos of inhibition exceeding Penicilina G Cristalina and Gentamicin (control group). The antibacterial activity was determined by measuring the Minimum Inhibitory Concentration - MIC, and the level of resistance, verified by the curve of kinetics of bacterial. The essential oils of *L. nobilis* (1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and *O. vulgare* (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) was highlighted by submitting inhibitions of 80% and 100%, respectively, off the bacteria. Alpha-pinene (40 $\mu\text{L}/\text{mL}$), beta-pinene (40 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and eugenol (1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) inhibited 75%, 90% and 100% of the bacterial strains, respectively. All bacterial species tested came resistant to citral. The curves of kinetics of bacterial *S. aureus* ATCC 6538 were significantly effective in the face of alpha-pinene (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$), beta-pinene (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and eugenol (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Tests of toxicity front of *A. salina* were considered highly active, with values of LC_{50} of 89.88 (*L. nobilis*), 14.91 (*O. vulgare*), 47.16 (eugenol) and 9.59 (alpha-Pinene), and was shown on the toxicity

larvae of *A. aegypti*, where *O. vulgare* and *C. aromaticus* killed 100% of the larvae within 24 hours. The effective bacterial activity of essential oils and phytochemicals and its cytotoxicity, enable the tracking of searches with these natural substances bioactives, looking for future alternatives therapies.

Keywords: essential oil; infective endocarditis; antibacterial activity; toxicity.

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1: <i>Aloe vera</i> L. (Liliaceae) – babosa _____	32
Figura 2: <i>Caryophyllus aromaticus</i> L. (Myrtaceae) – cravo _____	33
Figura 3: <i>Eucalyptus globulus</i> L. (Myrtaceae) – eucalipto _____	34
Figura 4: <i>Eugenia uniflora</i> L. (Myrtaceae) – pitanga _____	34
Figura 5: <i>Laurus nobilis</i> L. (Lauraceae) – louro-de-cheiro _____	36
Figura 6: <i>Melissa officinalis</i> L. (Lamiaceae) – erva-cidreira _____	37
Figura 7: <i>Mentha piperita</i> L. (Lamiaceae) – hortelã-pimenta _____	38
Figura 8: <i>Ocimum basilicum</i> L. (Lamiaceae) – basilicão _____	39
Figura 9: <i>Origanum vulgare</i> L. (Lamiaceae) – orégano _____	40
Figura 10: <i>Pimpinella anisum</i> L. (Apiaceae) – erva-doce _____	41
Figura 11: <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Lamiaceae) – alecrim _____	42
Figura 12: Estrutura química dos fitoconstituintes ensaiados _____	43
Figura 13: Placa de microdiluição utilizada _____	54
Figura 14: Diâmetro do halo de inibição (mm) de cepas bacterianas sob ação do óleo essencial de <i>L. nobilis</i> _____	62

- Figura 15:** Diâmetro do halo de inibição (mm) de cepas bacterianas sob ação do óleo essencial de *O. vulgare* _____ 62
- Figura 16:** Imagem do halo de inibição do óleo essencial de *L. Nobilis* sobre *P. aeruginosa* (ATCC 25619), difusão em meio sólido _____ 63
- Figura 17:** Diâmetro do halo de inibição (mm) de cepas bacterianas sob ação do óleo essencial de *C. aromaticus* _____ 63
- Figura 18:** Diâmetro do halo de inibição (mm) de cepas bacterianas sob ação do óleo essencial de *M. piperita* _____ 64
- Figura 19:** Viabilidade de *P. aeruginosa* ATCC 9027 sob a ação do óleo essencial de *O. vulgare* em diferentes intervalos de tempo _____ 77
- Figura 20:** Viabilidade de *S. aureus* ATCC 6538 sob a ação do óleo essencial de *L. nobilis* em diferentes intervalos de tempo _____ 77
- Figura 21:** Viabilidade de *S. pneumoniae* ATCC 11773 sob a ação do óleo essencial de *L. nobilis* em diferentes intervalos de tempo _____ 78
- Figura 22:** Viabilidade de *S. aureus* ATCC 6538 sob a ação do fitoconstituente alfa-pineno em diferentes intervalos de tempo _____ 79
- Figura 23:** Viabilidade de *S. aureus* ATCC 6538 sob a ação do fitoconstituente beta-pineno em diferentes intervalos de tempo _____ 79
- Figura 24:** Viabilidade de *S. aureus* ATCC 6538 sob a ação do fitoconstituente eugenol em diferentes intervalos de tempo _____ 80

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Média dos halos de inibição (em mm) da atividade antibacteriana dos óleos essenciais “in natura” e antibióticos sobre espécies bacterianas _____	61
Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de <i>L. nobilis</i> sobre espécies bacterianas, pela técnica de microdiluição _____	67
Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> sobre espécies bacterianas, pela técnica de microdiluição _____	69
Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima do fitoconstituente alfa-pineno sobre espécies bacterianas, pela técnica de microdiluição _____	71
Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima do fitoconstituente beta-pineno sobre espécies bacterianas, pela técnica de microdiluição _____	73
Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima do fitoconstituente eugenol sobre espécies bacterianas, pela técnica de microdiluição _____	74
Tabela 7: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fitoconstituente citral sobre espécies bacterianas, pela técnica de microdiluição _____	75

Tabela 8: Atividade moluscicida de óleos essenciais e fitoconstituintes utilizando o teste de letalidade para *A. salina* L. _____ 82

Tabela 9: Atividade larvicida de óleos essenciais de plantas medicinais sobre larvas (estágio L1) de *A. aegypti* _____ 85

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1: Espécies vegetais das quais foram obtidos os óleos essenciais para os ensaios microbiológicos e suas principais indicações medicinais _____	49
Quadro 2: Relação nominal e origem das cepas bacterianas utilizadas nos ensaios microbiológicos _____	51
Quadro 3: Relação dos principais fitoconstituintes encontrados nos óleos essenciais de <i>L. nobilis</i> e <i>O. vulgare</i> _____	66

LISTA DE ABREVIATURAS:

AHA : American Heart Association

ATCC: American Type Culture Collection (EUA)

CCS: Centro de Ciências da Saúde

CIV : Comunicação Interventricular

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CL₅₀: Concentração Letal para 50% da amostra.

CVA: Centro de Vigilância Ambiental

DNA: Ácido Desoxiribonuclêico

DMSO: Dimetilsulfóxido

EI: Endocardite Infecciosa

EIRA-2: The Endocarditis Infecciosa en la República Argentina–2 Study

EUA: Estados Unidos da América

FIOCRUZ: Fundação Osvaldo Cruz

HACEK: Grupo de bactérias emergentes (*Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus aphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetencomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e *Kingella Kingae*)

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana.

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da FIOCRUZ.

LABETOX: Laboratório de Ensaio Toxicológicos

LFB: Laboratório de Fisiologia Bacteriana (FIOCRUZ - Brasil)

LTF: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensíveis a meticilina.

NCCLS: National Committee on Clinical Laboratory Standards

PVM: Prolapso da Valva Mitral

SSI: Statens Seruminstitut (Dinamarca)

UFC: Unidade Formadora de Colônias

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco.

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO	Página
RESUMO _____	vi
ABSTRACT _____	viii
LISTA DE FIGURAS _____	x
LISTA DE TABELAS _____	xii
LISTA DE QUADROS _____	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS _____	xv
1 – INTRODUÇÃO _____	2
2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA _____	7
2.1 – ENDOCARDITE INFECCIOSA _____	7
2.1.1 – Aspectos gerais _____	7
2.1.2 – Agentes etiológicos _____	8
2.1.3 – Fisiopatogenia _____	15
2.1.4 – Critérios diagnósticos _____	17
2.1.5 – Terapêutica antibacteriana _____	21
2.2 – ÓLEOS ESSENCIAIS _____	24
2.2.1 – Aspectos gerais dos óleos essenciais _____	24
2.2.2 – Potencialidade antimicrobiana dos óleos essenciais _____	27

2.2.3 – Características das espécies vegetais, óleos essenciais e dos fitoconstituintes estudados _____	31
3 – OBJETIVOS _____	45
3.1 - Objetivo geral _____	45
3.2 – Objetivos específicos _____	45
4 – MATERIAL E MÉTODOS _____	47
4.1 – Locais de trabalho _____	47
4.2 – Óleos essenciais e fitoconstituintes ensaiados _____	47
4.3 – Antibióticos testados _____	48
4.4 – Espécies bacterianas _____	50
4.5 – Meios de cultura _____	50
4.6 – Inóculo bacteriano _____	51
4.7 – Ensaio de atividade antibacteriana _____	52
4.7.1 – Triagem da atividade antibacteriana dos óleos essenciais_	52
4.7.2 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima _____	53
4.7.3 – Determinação da cinética de morte bacteriana _____	55
4.8 – Ensaio Toxicológicos _____	55
4.8.1 – Bioensaios de toxicidade com óleos essenciais e fitoconstituintes selecionados frente à <i>Artemia salina</i> _____	55
4.8.2 – Bioensaio de embriotoxicidade <i>in vitro</i> com óleos essenciais selecionados frente às larvas de <i>Aedes aegypti</i> _____	56
4.9 – Análise estatística _____	58

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	60
5.1 – Triagem da atividade antibacteriana dos óleos essenciais____	60
5.2 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima _____	65
5.3 – Determinação da cinética de morte bacteriana _____	76
5.4 – Ensaio toxicológicos _____	81
5.4.1 – Toxicidade dos óleos essenciais e fitoconstituintes se- leccionados frente à <i>Artemia salina</i> _____	81
5.4.2 – Embriotoxicidade dos óleos essenciais sobre as larvas de <i>Aedes aegypti</i> _____	84
6 – CONCLUSÃO _____	89
REFERÊNCIAS _____	92

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

As infecções são tão antigas e complexas quanto a própria humanidade. No Brasil, os primeiros relatos de infecção hospitalar, parecem ter como marco o ano de 1956, com estudos sobre esterilização em material hospitalar e o uso inadequado de antibióticos, tais como a penicilina; e tem sido crescente a necessidade de combater a ascendente escalada das infecções, notadamente, as hospitalares (RODRIGUES et al., 1997; BEOVIC, 2006).

As síndromes infecciosas têm demonstrado expressiva resistência bacteriana frente aos antibióticos, fato esse já destacado pela Sociedade Americana de Cardiologia (American Heart Association - AHA) desde a versão da Declaração Universal dirigida às Diretrizes para o Tratamento da Endocardite Infecciosa, publicada em 1995 e, que tem sido referendada pela comunidade científica, de forma global e preocupante, nos anos subsequentes (WILSON et al., 1995; LEFORT et al., 2000; BADDOUR et al., 2005; BEOVIC, 2006).

O Brasil, pela sua vasta biodiversidade vegetal, apresenta grande potencial para descoberta e desenvolvimento de novas moléculas naturais e bioativas com efeitos antibacterianos. Inúmeras plantas são usadas como terapêutica medicinal em várias patologias, dentre elas as infecções bacterianas (ALVES et al., 2000). A etnofarmacologia destaca a relação efetiva dos óleos essenciais com atividades anti-sépticas no combate a bronquites, amigdalites, pneumonias e enterites bacilares (BONSIGNORE et al., 1990; LAVABRE, 1992; ALMEIDA, 1993; SÁ et al., 1995; CHALCHAT et al., 1999; LIMA, 2002; CHAMPS et al., 2003; GAYOSO, 2004, BURT, 2004; SOUZA, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (World Health Organization - WHO) relatou que a maior parte da população mundial, especialmente, África, Ásia e América Latina, extrai sua matéria-prima para a saúde diretamente da natureza (WHO, 2002). Estima-se, por exemplo, que a porcentagem da população que utiliza tratamentos não convencionais, inclusive a fitoterapia, seja de 10% na Dinamarca, 33% na Finlândia, 49% na Austrália e 48% nos Estados Unidos da América (EUA) (CHAMPS et al., 2003). No Brasil, o uso de plantas medicinais é enriquecido pela sua biodiversidade, pela miscigenação das culturas e pelo elevado custo dos medicamentos industrializados. Além disso, o emprego de um produto vegetal com o propósito medicinal tem sua eficácia respaldada pelo uso tradicional, repassada através de gerações ou estabelecida em estudos de eficácia e segurança (GUERRA; NODARI, 2003).

As resistências ou multiresistência aos antimicrobianos são continuamente comprovadas, principalmente pelo emprego desordenado de antibióticos sintéticos, sejam bactericidas ou bacteriostáticos. Autores reportam a preocupação sobre esse crescente número de isolamentos de cepas microbianas multiresistentes aos tratamentos com grupos de antimicrobianos classicamente empregados na terapêutica convencional (BRULL; COOTE, 1999; BURT, 2004; BADDOUR et al., 2005; BEOVIC, 2006).

As bactérias possuem mecanismos genéticos para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana, podendo sofrer mutações cromossômicas, manifestar um gene latente de resistência cromossomial, adquirir novo material de resistência genética através da conjugação por troca direta de Ácido Desoxiribonuclêico (DNA), por transdução via bacteriófago, através de um plasmídeo extra-cromossomial de DNA ou ainda por aquisição de DNA, via transformação (HELLINGER, 2000).

A toxicidade de uma substância bioativa deve ser um dos primeiros parâmetros a se analisar, visando a descoberta de uma alternativa terapêutica segura (RUIZ et al., 2005). É crescente o interesse em estudos toxicológicos com substâncias derivadas de plantas incluindo testes de letalidade sobre *Artemia salina*, bem como na potencial atividade larvicida (ALVES et al., 2000; LUNA et al., 2005).

Considerando a importância da Dengue e a escassez de trabalhos semelhantes com óleos essenciais e fitoconstituintes, propusemos a execução dos ensaios toxicológicos de letalidade também sobre as larvas de *A. aegypti*, pois, o desenvolvimento de novas armas para o controle do *A. aegypti* é de primordial importância pelo papel de propagação que o vetor exerce. A Dengue apresenta-se em formas endêmicas em países da África, Ásia, América Central e do Sul, notadamente, no Brasil, onde se propaga de forma crítica (FUNASA, 2003; LUNA et al., 2005).

No contexto atual, impera a necessidade de mais pesquisas com vistas à descoberta e o desenvolvimento racional de novos compostos ou metabólitos secundários, derivados de produtos naturais, com atividades terapêuticas (ALVES et al., 2000), a exemplo dos óleos essenciais que apresentam, do ponto de vista etnofarmacológico, importantes aplicações biológicas antimicrobianas. Assim, a necessidade de comprovações científicas tem despertado interesse na área de toxicologia, na possibilidade de se ter um produto natural seguro para uso terapêutico (TASSOU et al., 2000; JUGLAL et al., 2002; DAFERERA et al., 2003; SOUZA et al., 2006).

Sendo a Endocardite Infecçiosa uma patologia de importante morbidade e mortalidade (KARCHMER, 2006; WILSON et al., 2007), estudos dessa natureza são fundamentais, pois, buscam selecionar óleos essenciais bioativos e conduzi-los a

testes biológicos antibacterianos e toxicológicos, para o emprego futuro desses ou de seus fitoconstituintes na terapêutica antimicrobiana frente às espécies bacterianas potencialmente causadoras de endocardites.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 - ENDOCARDITE INFECCIOSA

2.1.1. – Aspectos Gerais

A Endocardite Infeciosa (EI) é uma patologia infecciosa não supurativa, que acomete o coração, notadamente, o endocárdio das valvas cardíacas com anormalidade estrutural como nos casos de estenose ou insuficiência valvar, comunicação interventricular (CIV), coarctação da aorta, próteses valvares (mecânicas ou biológicas), eletrodos de marcapassos, cardioversores ou desfibriladores implantados, além de outras cardiopatias sejam congênitas, adquiridas ou mesmo degenerativas.

A incidência de EI tem aumentado nos indivíduos portadores de prolapso da valva mitral (PVM) com refluxo valvar, na doença valvar idiopática com comprometimento das cúspides ou do anel valvar (espessamento, calcificação ou degeneração mixomatosa), na hipertrofia septal assimétrica ou subaórtica idiopática, alcoólatras e nos usuários de drogas injetáveis ou no curso de terapêuticas quimioterápicas e imunossupressoras (AKO et al., 2003; BADDOUR et al., 2005; KARCHMER, 2006). A American Heart Association (AHA), órgão científico que regulamenta e atualiza Diretrizes de EI nos EUA, e endossado pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, publicou, em 2005, a declaração das Diretrizes do Diagnóstico, Terapia Antimicrobiana e Manejo das Complicações da EI (BADDOUR et al., 2005) e, em 2007, as Diretrizes de Prevenção em Endocardite Infeciosa (WILSON et al., 2007).

No Brasil, a maioria dos casos de EI ocorre como seqüelas de valvopatias reumáticas mitrais ou aórticas e nas cardiopatias congênitas estruturais (MANSUR, 2000). Nos Estados Unidos da América (EUA), a EI atinge cerca de 19 mil pacientes por ano, com uma taxa de mortalidade ao redor dos 40%, caracterizando um sério problema de saúde pública e, a despeito do progresso do diagnóstico e profilaxia, a sua incidência não tem declinado nos últimos 30 anos, provavelmente, devido ao maior número de intervenções terapêuticas invasivas e ao aumento das doenças degenerativas com o envelhecimento natural da população (BASHORE et al., 2006).

2.1.2 – Agentes etiológicos

No Brasil, os agentes etiológicos bacterianos de EI mais prevalentes são *Streptococcus* e *Staphylococcus*, seguidos de *Enterococcus* e de emergentes bactérias do grupo HACEK, que incluem *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus aphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetencomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e *Kingella kingae*, e outras bactérias podem estar envolvidas em situações hospitalares ou pós-procedimentos invasivos, tais como *Pseudomonas* e *Klebsiella* (MANSUR, 2000).

Em injúria cardíaca estrutural, quando o indivíduo é submetido a procedimento odontológico invasivo, injeções intramusculares e endovenosas ou manipulação de cavidade vascular e visceral, bactérias outras que, normalmente colonizam a superfície da pele, podem se manifestar como agentes etiológicos oportunistas, a exemplo do grupo HACEK, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (MANSUR, 2000; BADDOUR et al., 2005).

Em cerca de 85% dos casos de EI a etiologia é do tipo bacteriana, no entanto, em apenas 12 a 14 % dos casos se consegue isolar especificamente o agente etiológico. Deve-se ressaltar ainda que, entre os três maiores grupos de espécies bacterianas potencialmente causadoras da EI, tais como, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus*, produziram mudança na susceptibilidade aos antibióticos convencionais (MANSUR, 2000). Relatos em diferentes populações de pacientes reportam resistência a multidrogas entre os grupos dos *Streptococcus viridans* (microbiota orofaríngea) no curso de infecções expressivas, além da elevada resistência a oxacilina entre os portadores de *Staphylococcus aureus* (IOANNIDOU et al., 2001; DIEKEMA et al., 2001).

Nos EUA, foram freqüentes as infecções adquiridas na comunidade resultantes de *S. aureus*, e o mais alarmante em relação a essas espécies foi que a taxa de resistência se mostrou alta ou intermediária frente a vancomicina, já descritas desde 1997 (HIRAMATSU et al., 1997), e subsequentemente, reportados em vários países (SMITH et al., 1999; CHANG et al., 2003).

Com o propósito de comparar a bacteremia da EI entre *S. aureus* do tipo Sensíveis a Meticilina (MSSA) com os *S. aureus* do tipo Resistentes a Meticilina (MRSA), pesquisadores analisaram 104 portadores de EI, onde havia, pelo menos, duas hemoculturas positivas para *S. aureus*, onde prevaleceram o tipo MSSA, ao passo que, no subgrupo de pacientes com EI adquirida via hospitalar, predominaram o tipo MRSA, refletindo o crescimento desses agentes na prática clínica, e ainda sugeriram que, pacientes com bacteremia por *S. aureus* deveriam ser avaliados agressivamente para EI (ABRAHAM et al., 2004).

Análises de 848 casos de EI no Japão, de 2000 e 2001, evidenciaram que 53,9% dos pacientes apresentaram EI sem a origem etiológica conhecida, bem

como nenhuma condição cardíaca predisponente ou relato de algum procedimento invasivo previamente realizado. E como segunda maior causa, foi a de indivíduos que haviam sido submetidos a procedimentos odontológicos invasivos. Nesse estudo, foi destacado que, os agentes etiológicos mais freqüentes foram com cocos positivos, sendo *Streptococcus* com 50% (destes 78% do tipo *S. viridans*) e *S. aureus* com 32%, seguidos dos MRSA com 7,3% e Gram-negativas com 5,9%; e em 90% dos casos de EI por *Streptococcus viridans* foram sensíveis a Penicilina G Cristalina, e todos os casos com *Staphylococcus* MRSA foram sensíveis a vancomicina; e foi constatado em 18% das EI por *S. aureus* procedimentos intravasculares invasivos prévios, como implantes de marcapasso (NAKATANI et al., 2003).

Estudo de EI na Argentina, EIRA-2, publicado em 2006, de perfil epidemiológico, clínico e microbiológico da EI, do tipo prospectivo e multicêntrico que envolveu 470 casos de EI em 82 hospitais, mostrou que em, aproximadamente, 83% dos casos o diagnóstico de EI foi definitivamente confirmado; em 80 casos como de possível diagnóstico para a cardiopatia, destacou-se que, as hemoculturas foram negativas em 11% dos casos e que não havia doença cardíaca previamente conhecida em 35%. A proporção de EI associada a prótese valvar foi de 16% e o gênero *Staphylococcus* correspondeu a 37% desses casos (30% de *S. aureus* e 6,9% de *Staphylococcus coagulase negativa*). Esse estudo comparou os dados obtidos com os de 1992, verificando mudança no perfil epidemiológico da EI, com abrangência maior a pacientes em idade mais avançada. Nos pacientes que apresentaram um substrato cardíaco estrutural, doença valvar degenerativa e prótese valvar, além de referir uma maior incidência de EI por *Staphylococcus*, apresentaram maior mortalidade hospitalar, sendo sugerido maior rigor no

diagnóstico precoce, tratamento e prevenção (FERREIROS et al., 2006). O crescente aumento no índice de EI por *S. aureus* nos últimos 30 anos tem merecido destaque (NAKATANI et al., 2003)

Autores de um estudo de análise retrospectiva frente aos agentes etiológicos de EI compararam as décadas de 1980 e 1990, e observaram, respectivamente, uma diminuição no número de EI por *Streptococcus* (45 versus 38%) e um aumento na incidência de *Staphylococcus* nas décadas (de 6,4 para 14,4%, $p=0,06$), e ainda um aumento significativo de MRSA (de 0% para 10,1%, $p=0,006$), sendo mantido o número de hemoculturas negativas em torno de 25%, e com isso, mudando o espectro clínico da patologia e sua terapêutica (AKO et al., 2003). Apesar do avanço no tratamento antimicrobiano da EI, foi destacado que, quando essa vem associada a estafilococos do tipo MRSA, notadamente, está associada a sérias complicações hemodinâmicas em pacientes com cardiopatias congênitas, apresentando pior desfecho com maior morbidade e mortalidade (ISHIWADA et al., 2005).

Em um estudo de indicação de perfil epidemiológico por análises prospectivas, realizado em 18 pacientes internados no Hospital Universitário Lauro Wanderley - João Pessoa (Paraíba), entre 2001 e 2006, com diagnóstico de EI confirmados pelos critérios de DUKE, foi constatado o predomínio de ausência de crescimento bacteriano às hemoculturas em 77% dos casos (BARROS et al., 2006).

Antes do advento dos antibióticos, a incidência de EI por *Streptococcus pneumoniae* variava entre 15 e 25%, e desde a introdução da penicilina sua incidência em valvas cardíacas nativas em adultos decresceu substancialmente, com estimativas de 1 a 3%. No entanto, a porcentagem de *Pneumococcus* penicilina-resistentes tem aumentado substancialmente (WATANABE et al., 2003).

Em necropsias de EI de valvulopatias mitrais, nas quais *S aureus* predominaram (51%), as principais complicações foram rupturas de cordoalhas tendíneas, perfuração do folheto valvar anterior e abscessos do anel valvar (FERNICOLA e ROBERTS, 1993). Cacoub et al. (1998), avaliando 33 pacientes com marcapasso cardíaco associado a EI, verificaram que o agente etiológico prevalente foi *S. epidermidis* (51,5 %), seguido do *S. aureus* (21,2%).

Um estudo epidemiológico australiano verificou que, em 13 anos, a ocorrência de EI nosocomial comparada com a EI adquirida na comunidade apresentou *S. aureus* como agente etiológico predominante na EI do tipo nosocomial (57%), incluindo os MRSA com 13% (SHARON et al., 1992). Issa et al. (2003), estudando 683 casos de EI, constaram que *S. aureus* esteve presente em 41% dos casos e, foram os agentes mais freqüentes entre os pacientes com sintomatologia mais aguda (até 10 dias), apresentando também uma maior mortalidade (36%), ao passo que, naqueles com sintomatologia prolongada, (acima de 20 dias), espécies de *Streptococcus* predominaram (51%).

Um estudo realizado na Espanha com 606 pacientes, buscando uma correlação de EI com osteomielite vertebral, de 1986 a 2002, foi constatado que em, aproximadamente, 31% dos casos ocorreram EI, prevalecendo entre os que tinham cardiopatia estruturais prévias, e foi constatado que o tratamento oral mostrou-se efetivo exceto com estafilococos do tipo MRSA (PIGRAU et al., 2005). Numa série de casos avaliados em 10 anos, em Barcelona, observou-se que nas infecções piogênicas espontâneas de articulações em adultos, a etiologia mais prevalente foi *Staphylococcus aureus* (86%) (NARVÀEZ et al., 2006).

O resultado da avaliação de 629 pacientes com lesões por EI localizadas em câmaras cardíacas esquerdas mostrou que, havia acometimento das valvas nativas

em 64% dos casos e, das valvas protéticas em 36%. E que espécies de *Streptococcus* predominaram com 47% dos casos, seguidos de *S. aureus* com 12%; E ainda que em 13% das hemoculturas realizadas, os resultados foram negativos e a presença de fenômenos embólicos foram mais evidentes com *S. aureus*, principalmente, nos portadores de próteses valvares e na presença de vegetações (FABRI JR et al., 2006).

Nos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) a casuística de EI tem se mostrado crescente, provavelmente, pelo aumento no número de procedimentos invasivos, o que também tem alterado o quadro clínico das infecções nosocomiais (AKO et al., 2003). No entanto, Mansur et al. (2001), afirmavam que os portadores do HIV, em princípio, não apresentariam risco para EI e, não, necessariamente, influenciariam desfavoravelmente no prognóstico desses pacientes. Os fungos, por sua vez, são agentes etiológicos oportunistas na EI em pacientes hospitalizados, portadores de cateteres intracavitários, próteses valvares ou imunocomprometidos (SAMPAIO; GRINBERG, 2002).

Representantes do grupo HACEK compreendem bactérias emergentes do tipo bastonetes, Gram-negativas, fastidiosos, oportunistas e que, em geral, estão associados à EI que evolui de forma insidiosa (DE CASTRO, 2006). Bactérias do gênero *Haemophilus* são os patógenos humanos mais comumente isolados e com presença significativa. A espécie *H. aphophilus*, apesar de ser responsável por EI em valvas cardíacas lesadas, é causa incomum de EI.

Cepas de *A. actinomycetemcomitans* são bactérias anaeróbicas, facultativas, de crescimentos lentos, pertencentes ao gênero *Haemophilus*, porém, tradicionalmente incluída no gênero *Actinobacillus*. Colonizam a orofaringe humana e animal, podendo causar endocardites, bem como, periodontites ou infecções em

mucosa oral lesionada por mordidas e, da mesma forma que os *H. aprophyllus*, são causas incomuns de EI subaguda e prevalecem em valvopatias pré-existentes; a sua característica laboratorial destacada é a propriedade de se aderir ao frasco da hemocultura (DE CASTRO, 2006).

C. hominis são bactérias que apresentam este nome por terem predileção de causar EI em humanos. Essas bactérias são Gram-negativas ou Gram-variáveis, pleomórficas, imóveis e anaeróbias facultativas; fermentativas, indol e oxidase-positivas e catalase-negativas. Apresentam baixa virulência e estão presentes em cerca de 70% dos indivíduos saudáveis. São difíceis de crescerem *in vitro*, exigem dióxido de carbono e umidade em meio ágar e levam de 1 a 2 semanas no meio de cultura para se desenvolverem. Laboratorialmente, se caracterizam como colônias puntiformes de 1 mm. Muitos dos pacientes com EI por *C. hominis* apresentavam cardiopatia estrutural pré-existente e tinham se submetido a tratamento odontológico invasivo. Esse tipo de bactéria quando causam EI, comumente evoluem de forma insidiosa e raramente provocam complicações e, sua recuperação após tratamento, é completa (MURRAY et al., 2006).

E. corrodens são espécies de bactérias que colonizam o trato respiratório superior humano, preferencialmente na orofaringe, onde, de forma semelhante a *C. hominis*, e na presença de cardiopatia estrutural pré-existente, podem causar EI. São anaeróbias facultativas, não esporuladas, imóveis, oportunistas, difíceis de serem detectadas e necessitam de meio seletivo. Seu crescimento é lento, requer de 5 a 10% de CO₂ no meio para se multiplicarem e são capazes de escavar o ágar, característica essa, marcante em 50% dessas bactérias, além de produzirem odor característico de alvejante. Também tem prevalência maior em indivíduos com lesões na cavidade oral por mordidas humanas, imunocomprometidos e

politraumatizados, podendo ocasionar sinusites, rinites, pneumonias, abscessos pulmonares ou cerebrais e meningites. E, por fim, também como representante do grupo HACEK e envolvidas na gênese da EI, as espécies bacterianas *K. kingae*, que também colonizam a orofaringe, são cocos Gram-negativas, anaeróbicos, facultativos, fermentam carboidratos e são morfológicamente parecidos com *Neisserias*. São também responsáveis por artrites sépticas em crianças (MURRAY et al., 2006).

Focado nas evidentes mudanças etiológicas da EI e nas suas co-morbidades, foi que a AHA normatizou as suas diretrizes, em 2005, para o diagnóstico e tratamento, contemplando modificações no espectro clínico evolutivo e nos fatores predisponentes dessa enfermidade, somados a tendência natural e crescente do envelhecimento populacional (BADDOUR et al., 2005).

2.1.3 – Fisiopatogenia

A EI apresenta mecanismos fisiopatogênicos complexos e envolvem, além da ação intrínseca da própria bactéria, a participação de fatores plaquetários, plasmáticos e protéicos que interferem no endotélio, já que o papel da superfície endotelial lesionada é de fundamental importância no entendimento fisiopatogênico da formação da vegetação (massa amorfa) relacionando agregação plaquetária e aderência microbiana (BADDOUR et al., 2005).

Dentre os principais mecanismos fisiopatológicos da EI, quatro são destacados na determinação da sintomatologia clínica: (1º) a infecção propriamente

dita, (2º) as alterações estruturais no coração, (3º) os fenômenos embólicos e, (4º) o estímulo antigênico prolongado.

A infecção propriamente dita é o mecanismo responsável pelas manifestações clínicas que mais suscitam o diagnóstico, como a síndrome febril, anorexia, emagrecimento e adinamia; quanto as alterações estruturais cardíacas, essas podem ser pré-existentes ou determinadas na evolução da infecção, incluindo as disfunções valvares e fístulas intercavitárias; e em cerca de 50% dos casos de EI, as embolias ocorrem antes do início do tratamento, e essas não indicam, necessariamente, infecção ativa ou tratamento antimicrobiano ineficaz; os estímulos antigênicos prolongados são responsáveis pelas alterações nos glomérulos renais e nos territórios vasculares oculares ou cutâneos, podendo surgir no curso do tratamento, a despeito de uma boa resposta terapêutica e, a bacteremia é o que determinará a aderência e a colonização do microrganismo na lesão pré-formada, por intermédio de exoproteínas de aderência ao fibrinogênio como no caso da EI por *S. aureus* (CHAMBERS, 2001; BADDOUR et al., 2005).

Situações de valva aórtica bicúspide, PVM com refluxo valvar e degeneração mixomatosa ou mesmo lesões estruturais mínimas que não são identificadas através do Ecocardiograma com Doppler transtorácico, conferem um substrato cardíaco predisponente para EI. E em cardiopatias estruturais prévias a ocorrência de valvopatias varia de 40 a 65% nos casos de EI, seguidos das cardiopatias congênitas de 07 a 9,1% (NAKATANI et al., 2003; AKO et al., 2003). Em geral, o folheto da valva é acometido e, somado a esse dano na própria cúspide, as lesões nos músculos papilares e/ou no anel valvar adjacente ao miocárdio, facilitam a formação de abscessos, principalmente, no território valvar aórtico, ao passo que, a

formação de fístulas e pseudoaneurismas acometem com maior frequência o anel valvar mitral e o ventrículo esquerdo (SOEJIMA et al., 2002).

Cardiopatias estruturais estiveram presentes em 75% das EI por *Streptococcus* e *Staphylococcus*, onde as maiores complicações incluíram Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC), embolização sistêmica, disfunção renal e formação de abscessos cerebrais (BADDOUR et al., 2005). Para Ako et al. (2003), o PVM foi destaque como fator de risco cardíaco para EI em 10,1% dos casos analisados.

2.1.4 – Critérios diagnósticos

A primeira descrição de um quadro clínico sugestivo de EI data desde 1646, por Lazare Reviere e, em 1885, William Bart Osler reconheceu os nódulos que levariam seu nome (Nódulos de Osler), descrevendo as manifestações cardinais clássicas como as cardiopatias estruturais predisponentes, bacteremias, vasculites ativas e fenômenos embólicos periféricos, permitindo, a partir daí, o aprimoramento nos critérios diagnóstico dessa patologia (BADDOUR et al., 2005).

Pelletier e Petersdorf (1977), sistematizaram os critérios diagnósticos buscando melhor sensibilidade e especificidade, ressaltando parâmetros clínicos associados como febre, sopros regurgitantes recentes, fenômenos vasculares e dados da hemocultura e anatomopatológico. Em 1994, na Duke University, especialistas incluíram nas diretrizes americanas dados precisos do ecocardiograma com Doppler, determinando três possibilidades de diagnósticos, quais sejam,

presença de vegetação valvar, identificação de anomalias anatômicas e alterações hemodinâmicas (DURACK et al., 1994; BADDOUR et al., 2005).

Evidências do envolvimento endocárdico, obtidas pelas imagens do ecocardiograma, são positivas para EI quando mostram uma vegetação intracardiaca oscilando na valva, em estruturas de suporte, na trajetória de jatos regurgitantes, em material implantado na ausência de uma explicação anatômica, ou na presença de abscesso, nova descência parcial de prótese valvar ou em nova regurgitação valvar (seja por piora ou mudança na característica de sopro pré-existente). O ecocardiograma executado via transtorácica deve ser recomendado, reservando-se a técnica transesofágica para pacientes portadores de próteses valvares mitral ou aórtica e com suspeita clínica de EI ou na presença de complicações como abscessos perivalvares ou fístulas intercavitárias (BADDOUR et al., 2005).

Diretrizes internacionais para diagnóstico e tratamento da EI firmam o diagnóstico da EI na presença de critérios Maiores e Menores de Duke modificados, nos quais, os 2 critérios Maiores incluem hemoculturas positivas para EI e evidência de envolvimento endocárdico, onde essas hemoculturas serão consideradas positivas, quando realizadas em 2 coletas separadas e apresentarem microrganismos típicos compatíveis com EI, a exemplo de *S. viridans*, *S. aureus*, *Streptococcus bovis*, bactérias do grupo HACEK. Além desses, espécies de *Enterococcus* adquiridos na comunidade na ausência de foco primário; ou microrganismos consistentes com EI persistentemente positivos em hemoculturas definidas no seguimento (pelo menos em 2 amostras de hemoculturas positivas retiradas além de 12 horas de separação; ou 3 ou mais de 4 hemoculturas separadas (com a primeira e a última amostras colhidas pelo menos com 1 hora de

diferença). Ainda é considerado como critério Maior, a presença de hemocultura positiva isolada para *Coxiella burnetti* ou uma titulação de anticorpo IgG > 1:800 (LI et al., 2000; BADDOUR et al., 2005).

Em análise na admissão hospitalar de 125 casos com EI, o ecocardiograma identificou vegetações em 57% dos casos, abscessos em 6% e perfurações intracavitárias em 11,2%; a sintomatologia clínica de ICC (55%) foi a mais expressiva, seguida das embolizações periféricas (32%) e anormalidades neurológicas (20%); as valvas mais acometidas foram a mitral (52,8%) e aorta (37%) (AKO et al., 2003).

Os critérios Menores compreendem: 1º) condição cardíaca predisponente ou usuários de drogas injetáveis; 2º) febre maior que 38°C; 3º) fenômenos vasculares como embolia arterial, infarto pulmonar séptico, aneurisma micótico, hemorragia intracraniana, hemorragia conjuntival e lesões de Janeway; 4º) fenômenos imunológicos como glomerulonefrite, nódulos de Osler, Manchas de Roth e fator reumatóide positivo; e 5º) evidência microbiológica como hemocultura positiva mas com microrganismos não encontrada nos critérios Maiores (a exemplo dos estafilococos coagulase-negativo) (BADDOUR et al., 2005).

O diagnóstico definitivo de EI é estabelecido na presença de dois critérios Maiores, ou um Maior e três Menores, ou cinco critérios Menores. Ao passo que, o diagnóstico de possibilidade de EI só é determinado nas infecciosas suspeitas com a presença de um critério Maior e um Menor, ou três critérios Menores.

O diagnóstico de EI é rejeitado quando se tem um diagnóstico alternativo firmado com explicação evidente, ou onde há resolução da síndrome infecciosa com terapia antibiótica por menos de quatro semanas, ou quando não há nenhuma evidência patológica de EI na cirurgia ou na autópsia de pacientes submetidos a

antibioticoterapia por menos de quatro semanas, ou ainda quando não se encontram critérios de possibilidade como descritos para EI (BADDOUR et al., 2005).

A variabilidade da evolução clínica da EI requer estratégia diagnóstica, pois, dependendo da virulência do agente infeccioso, ela poderá evoluir de forma aguda ou subaguda. A forma aguda evolui de forma rápida e mais agressiva, caracterizando-se por febre alta e persistente, dor torácica, dispnéia, tosse, microhemorragias na palmas das mãos e planta dos pés, podendo, nos casos mais graves apresentar choque séptico com hipotensão arterial, palidez e colapso circulatório. Essas formas mais severas ocorrem mais freqüentemente pelo *S. aureus* que colonizam o endocárdio, levando formação de vegetações e liberação de êmbolos sépticos sistêmicos para rins, pulmões e cérebro.

Ao passo que, a forma subaguda é mais insidiosa, evoluindo com febre leve e prolongada, calafrios, sudorese noturna, mialgias, artralgias, cefaléia, fadiga, dispnéia, anorexia, emagrecimento e maior ocorrência de fenômenos imunológicos vasculares. Essa forma, em geral, é causada pelos estreptococos da microbiota orofaríngea. As espécies *Streptococcus bovis* e *Streptococcus equines* também podem causar endocardites tipicamente em pacientes portadores de câncer de cólon (BADDOUR et al., 2005).

Em culturas antimicrobianas rotineiras em 220 cirurgias de substituição valvar, foi elevada a incidência de resultado falso-positivo, com 14,4% das hemoculturas positivas para *Staphylococcus* coagulase-negativa e o resultado de cultura positiva não foi preditor de EI em prótese valvar, já que nesse subgrupo, apenas 01 paciente apresentou EI no pós-operatório (CAMPBELL et al., 2000). *S. viridans*, presentes em cerca de 40 a 50% das EI comunitárias, têm reconhecida capacidade de aderência aos depósitos fibrinoplaquetários e apresentam associação à manipulação dentária.

Nos pacientes hospitalizados, *S. aureus* foram os agentes etiológicos mais freqüentes, principalmente, nos portadores de próteses valvares, cateteres endovenosos ou imunocomprometidos, enquanto que, *Enterococcus* e outros bacilos Gram-negativos prevalecem em infecções genito-urinárias e intestinais (CHAMBERS, 2001; GORDON et al., 2002).

Classicamente, o gênero *Streptococcus* tem sido o mais abundante nas hemoculturas positivas para EI, apesar de ter sido detectado a presença mais freqüente do *S. aureus*, notadamente, em usuários de drogas injetáveis (CABELL et al., 2002). Com o aprimoramento do diagnóstico pela ecocardiografia, constatou-se que esse subgrupo de pacientes é de risco para EI mesmo na ausência de cardiopatia estrutural prévia e com hemoculturas negativas (AKO et al., 2003). As afecções neurológicas da EI por *S. aureus* em uma revisão de 260 casos de bacteremia, em não viciados de drogas injetáveis, ocorreram em 35% dos casos com média de evolução de 10 dias, sendo destacada a hemiparesia em 45% dos casos (ROODER et al., 1997).

2.1.5 – Terapêutica antibacteriana

Assim como para o diagnóstico, as hemoculturas são fundamentais para o tratamento, possibilitando a identificação específica do agente etiológico. A espécie de *S. aureus* tem sido considerada como os microrganismos mais envolvidos nas lesões valvares severas por EI. O seu diagnóstico etiológico deve ser centrado nas hemoculturas e na ecocardiografia com Doppler, principalmente, naqueles pacientes com febre a esclarecer e fatores de riscos altos para EI, já que sua terapêutica

convencional requer combinações padronizadas de antibióticos (GIAMARELLOU, 2002; ANGUERA et al., 2005).

Na suspeita clínica de EI, inicialmente, não deve ser instituído o tratamento antibacteriano empírico, salvo sob condições imperativas de gravidade clínica, pois, o uso prévio de antimicrobianos é a causa mais freqüente de hemocultura negativa (BADDOUR et al., 2005).

A EI por *S. aureus* é, geralmente, mais restrita ao folheto valvar, entretanto, podem invadir o anel valvar formando abscessos perivalvares o que caracteriza pior prognóstico e maior mortalidade (BONOW et al., 1998). Nesse subgrupo de pacientes graves, com lesões valvares severas e que não estejam respondendo adequadamente a terapêutica antimicrobiana, recomenda-se a intervenção cirúrgica de urgência (SOEJIMA et al., 2002), mesmo como indicação precoce (BASHORE et al., 2006).

Rooder et al. (1997), com 206 casos de EI demonstrou que, a presença de vegetação valvar associada as manifestações neurológicas apresentaram elevada mortalidade.

Pelo maior risco de evoluir com comprometimento hemodinâmico, bem como nos casos de persistência da infecção grave após 10 dias de tratamento antibiótico específico ou na presença de vegetação valvar maior que 10 mm ou nas de etiologias fúngicas (as quais tendem a responder, desfavoravelmente, à terapêutica antimicrobiana), o tratamento cirúrgico deve ser indicado (BADDOUR et al., 2005). Remadi et al. (2005), analisando 54 pacientes com EI por *S. aureus* afirmaram que, o tratamento cirúrgico foi superior ao tratamento clínico isoladamente, principalmente, pelo risco de severidade séptica.

Barros et al. (2006), publicaram que nos pacientes com EI, o tratamento cirúrgico para troca valvar foi necessário em 16,6%, devido a situações como presença de abscesso do anel valvar, rotura de cordoalha e piora funcional por embolia.

Portadores de imunodeficiência, cateteres intracavitários, próteses valvares, idosos ou com resistência antibiótica, apresentaram significativa letalidade em torno de 20 a 30% (NIWA et al., 2003). Em análises multivariadas e multicêntricas dos fatores de prognósticos de mortalidade na EI de valva aórtica complicada com formação de abscesso, identificou *S. aureus* associado com o aumento do risco de morte independente (ANGUERA et al., 2005).

Niwa et al. (2003), constataram que os pacientes com doenças valvares em pré-operatórios ou pré-procedimentos invasivos, a profilaxia antibiótica peri-operatória foi instituída com sucesso em 92% dos casos, sendo 73% destes casos feitos com penicilina oral. A AHA orienta a profilaxia para todos os pacientes susceptíveis que vão se submeter à cirurgia ou a procedimentos de risco para EI, podendo ser feita cerca de duas horas antes dos procedimentos e mantidos por no mínimo oito horas após. E além do mais, recomenda que antes de procedimentos odontológicos cruentos seja usado anti-séptico oral à base de clorhexedine e, também que, nos portadores de PVM sem disfunção ou degeneração valvar, em princípio, a antibióticoprofilaxia não está indicada. (BADDOUR et al., 2005).

A presença de vegetação valvar pode permanecer na maioria dos doentes, mesmo depois do tratamento antimicrobiano bem sucedido, pois, embora os antibióticos descolonizem a vegetação, os demais elementos como fibrina e plaquetas ainda permanecem durante a fase de resolução cicatricial, e dessa forma, a prevenção da recorrência da infecção deve ser considerada (MARTIN, 2002).

Apesar do progresso no manuseio da EI, o atraso no diagnóstico e as terapias antimicrobianas diante das resistências podem influenciar adversamente na sua morbidade e mortalidade.

Bactérias do grupo HACEK tem merecido importante destaque no manuseio da endocardite, pois, cepas de *H. aphophilus* já se mostraram resistentes a ampicilina e o tratamento pode ser feito com cefalosporinas de amplo espectro, azitromicinas ou fluorquinolonas; e a quimioprofilaxia antibiótica passou a ser um fator importante e devendo ser sempre considerada em procedimentos de alto risco. Já bactérias do tipo *A. actinomycetemcomitans*, em geral, são cepas sensíveis a cefalosporinas, tetraciclinas e fluorquinolonas, sendo incomum a resistência a penicilinas e macrolídeos (DE CASTRO, 2006; MURRAY et al., 2006).

Bactérias da espécie *C. hominis* são susceptíveis a penicilinas e ampicilinas, devendo ser usadas de 2 a 6 semanas e, em geral, são resistentes a eritromicina. Com relação a *E. corrodens*, usualmente, são bactérias susceptíveis a penicilina, ampicilina, cefalosporinas de última geração, tetraciclinas e fluorquinolonas, costumando ser resistentes a oxacilina, cefalosporinas de primeira geração, eritromicina e aminoglicosídeos. Ao passo que, espécies de *K. kingae*, geralmente, são sensíveis aos beta-lactâmicos, incluindo penicilinas, tetraciclinas, fluorquinolonas e aminoglicosídeos (MURRAY et al., 2006).

2.2 – ÓLEOS ESSENCIAIS

2.2.1 – Aspectos gerais dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos líquidos complexos, orgânicos, solúveis em solventes orgânicos apolares, lipofílicos, voláteis, delicados, aromáticos, de sabor ácido ou picante, incolores quando recentemente extraídos ou ligeiramente amarelados e de aparência oleosa. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências e podem ser extraídos de diversas partes das plantas como folhas, flores, sementes, brotos, galhos, cascas de caule, frutos e raízes. Em contato com a água, os óleos essenciais apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas denominadas hidrolatos. E por serem voláteis, necessitam ser estocados em conteúdo hermeticamente fechados e protegidos da luz direta, calor, umidade e metais (SIMÕES; SPITZER, 2003).

O método de produção dos óleos essenciais por destilação foi o primeiro usado no oriente (Egito, Índia e Persa) há mais de 2000 anos atrás e foi aperfeiçoado no século IX pelos Árabes (GUENTHER, 1948; BAUER et al., 2001). A primeira descrição autêntica escrita de destilação dos óleos essenciais é atribuída ao físico catalão Villanova (1235 – 1311 a.C.) (GUENTHER, 1948).

No século XIII, os óleos essenciais começaram a ser manipulados em farmácias e seus efeitos farmacológicos descritos em farmacopéias (BAUER et al., 2001), no entanto, seu uso só passou a ser difundido na Europa a partir do século XVI (CROSTHWAITE, 1998; BURT, 2004). Uma das primeiras medições experimentais feitas em laboratório, das propriedades bactericidas dos vapores dos óleos essenciais, foi realizada por De La Croix, em 1881 (BOYLE, 1955). As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais são conhecidas para o uso popular desde a antiguidade, sendo os óleos de turpentine já mencionados com essas atividades pelos historiadores gregos e romanos (GUENTHER, 1948).

Os óleos essenciais, comumente, são obtidos através de destilação a vapor ou extração por solventes voláteis. Já a sua extração por meio de dióxido de carbono líquido sob baixas temperaturas e alta pressão é o perfil organoléptico mais natural, porém, o mais dispendioso (MOYLER, 1998). A destilação por arraste a vapor d'água é o método mais comumente usado para produção de óleos essenciais em bases comerciais (SIMÕES; SPITZER, 2003) e, as análises detalhadas da composição dos óleos essenciais podem ser realizadas por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (SALZER, 1977; DAFERERA et al., 2000; DELLAQUIS et al., 2002).

Os óleos essenciais se diferenciam dos óleos fixos e gorduras por sua volatilidade e por serem, em geral, derivados de terpenóides e compostos aromáticos como álcool, éster, aldeído e cetona de cadeia curta, podendo agir como hormônios, reguladores e catalizadores (SIMÕES; SPITZER, 2003; SOUZA, 2006).

Estima-se em mais de 8.000, o número de compostos terpenóides conhecidos e como componentes descritos nos óleos essenciais. E calcula-se um número superior a 150 monoterpenos (10 átomos de carbono) e a 1000 sesquiterpenos (15 átomos de carbono), sendo os monoterpenos correspondentes a cerca de 90% dos compostos terpenóides (WAGNER; BLADT, 1995; SIMÕES; SPITZER, 2003).

Os fitoconstituintes presentes nos óleos essenciais são muito variáveis, podendo ser constituídos por hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, aldeídos, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e, por vezes, compostos com enxofre. Um óleo essencial pode apresentar até mais de 60 fitoconstituintes individuais em sua composição (SENATORE, 1996; RUSSO et al., 1998), podendo seu principal componente corresponder a mais de 85% desse

óleo, ao passo que, outros podem ocorrer apenas como vestígios (SENATORE, 1996; KOKKINI et al., 1997; BAUER et al., 2001; SIMÕES e SPITZER, 2003).

Os óleos essenciais que possuem atividades antibacterianas mais expressivas apresentam maior porcentagem de compostos fenólicos como o carvacrol, eugenol e timol (DENYER; HUGO, 1991; DAVIDSON, 1997; CONSENTINO et al., 1999; JULIANO et al., 2000; JERKOVIC et al., 2001; LAMBERT et al., 2001; NAKATANI et al., 2003, BURT, 2004).

São destacados diversos efeitos medicinais nos óleos essenciais, tais como atividade carminativa, antiespasmódica, analgésica, antitérmica, hipotensora e hipertensora, diurética, vasoconstrictora, anti-séptica, antimicrobiana, expectorante, mucolítica, anti-reumática, anticonvulsiva, parasiticida, disfunção erétil, dentre outras (OLIVEIRA; VENDRAMIN, 1999; SANT'ANA; MANCINI-FILHO, 1999; ALVES et al., 2000; MONTANHER et al., 2002; SAYYAH et al., 2002; UCHIYAMA et al., 2002; LUNA et al., 2005; SIMÕES; SPITZER, 2003; CONFORTI et al., 2006; SILVA et al., 2006).

2.2.2 – Potencialidade antimicrobiana dos óleos essenciais

A busca de produtos naturais com propriedades antimicrobianas é fundamental, já que o uso amplo e desordenado de antimicrobianos tem gerado microrganismos multiresistentes. A importância clínica crescente dada às infecções bacterianas comunitárias e hospitalares por cepas multiresistentes é preocupante, como também pelo desaparecimento da efetividade dos antibióticos usualmente efetivos, o que incentiva a realização de estudos relacionados a bioatividade dos

produtos naturais, destacando óleos essenciais e fitoconstituintes isolados de plantas medicinais (BENKEBLIA, 2004).

Pesquisas têm mostrado que as propriedades biológicas desses óleos também podem variar de acordo com a técnica de cultivo vegetal, origem geográfica, estágio vegetativo e a estação da coleta (ARRAS; GRELLA, 1992; CONSENTINO et al., 1999; MILOS et al., 2000; JULIANO et al., 2000; FALEIRO et al., 2003; ULTEE et al., 2002). Óleos essenciais extraídos de plantas durante ou imediatamente após o florescimento possuem maior atividade antibacteriana (MARINO et al., 1999) e a sua composição pode ser diferente nas diversas partes da mesma planta (DELLAQUIS et al., 2002; BURT, 2004).

Pesquisas com fins medicinais em produtos naturais oriundos dos vegetais, notadamente com óleos essenciais bioativos, vem despertando crescente interesse no manejo, identificação, toxicidade e possibilidade de uso dos seus princípios ativos na prática clínica e aqueles óleos essenciais que possuíram as mais destacáveis propriedades antimicrobianas apresentaram uma alta percentagem de compostos fenólicos (NAKATANI et al., 2003). Além do mais, atividades antifúngicas também foram comprovadas em pesquisas com óleos essenciais e fitoconstituintes isolados (ADEBAJO et al., 1989; ALMEIDA, 1993; TELLES; MOSCA, 2000; SOUZA, 2006). Chaurasia et al. (1977), estudando óleos essenciais demonstraram que, aproximadamente, 35% deles apresentavam atividades antibacterianas e 60% antifúngicas.

Estudos *in vitro* demonstraram atividades dos óleos essenciais contra *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* e *S. aureus*, bem como constataram que bactérias Gram-negativas foram menos susceptíveis aos antimicrobianos que as Gram-positivas (BURT, 2004). Fato esse,

corroborado por diversos autores, utilizando óleos essenciais frente a *P. aeruginosa* (KNOBLOCH et al., 1986; DEANS; RICHIE, 1987; SENATORE et al., 2000; TSIGARIDA et al., 2000; PINTORE et al., 2002). Entretanto, nem todos os estudos com atividades antimicrobianas dos óleos essenciais concluíram que as gram-positivas são mais susceptíveis que os gram-negativas (WILKINSON et al., 2003).

Uma importante característica dos óleos essenciais e seus fitoconstituintes é sua hidrofobicidade, a qual permite a atuação na membrana celular lipídica das bactérias e das mitocôndrias, podendo interferir na estrutura e tradução delas por maior permeabilidade (SIKKEMA et al., 1994).

Na estrutura celular bacteriana, os sítios de localização e os mecanismos de ação dos óleos essenciais ou de seus fitoconstituintes, podem ocorrer de diversas formas, tais como, através da degradação da parede celular bacteriana (THOROSKI et al., 1989; HELANDER et al., 1998), injúria na membrana citoplasmática (KNOBLOCH et al., 1986; SIKKEMA et al., 1994; ULTEE et al., 2000), lesão na membrana protéica e extravazamento de conteúdos intracelulares (GUSTAFSON et al., 1998; HELANDER et al., 1998; COX et al., 2000), coagulação de constituintes citoplasmáticos (GUSTAFSON et al., 1998), depleção da força motora de prótons que proporciona a saída de íons positivos, alteração no fluxo de elétrons e no transporte ativo (ULTEE et al., 1999; ULTEE et al., 2002; CARSON et al., 2002). Dessa forma, se houver perdas significativas de conteúdos intracelulares, moléculas e/ou íons, poderá levar à morte celular (KNOBLOCH et al., 1986; SIKKEMA et al., 1994; GUSTAFSON et al., 1998; COX et al., 2000; CARSON et al., 2002; SOUZA, 2006).

A atividade antibacteriana de um óleo essencial, muito provavelmente, não está relacionada a um único mecanismo específico; acredita-se que ocorram ações

sinérgicas de vários compostos sobre diferentes alvos na bactéria devido a presença dos diversos constituintes químicos presentes nessas substâncias (CARSON et al., 2002) ou ainda, serem ativados como consequência de outros mecanismos previamente desencadeados (SIKKEMA et al., 1995; COX et al., 2000; SOUZA, 2006).

Embora as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais tenham sido estudadas e revisadas, os mecanismos de ação ainda não foram esclarecidos com grandes detalhes (CARSON et al., 2002; BURT, 2004). Os métodos padronizados do National Committee on Clinical Laboratory Standards - NCCLS, direcionado aos testes com antibióticos e susceptibilidade antibacteriana, tem sido ajustado para testar produtos derivados de óleos essenciais com atividades antimicrobianas (NCCLS, 2000 a,b).

A mensuração da atividade antibacteriana dos óleos essenciais é feita pela determinação da Concentração Inibitória Mínima que pode ser entendida como a menor concentração resultante da redução da viabilidade da inoculação do microrganismo (CARSON et al., 1995); ou a menor concentração para completa inibição do teste do organismo até 48 horas de incubação (WAN et al., 1998; CANILLAC; MOUREY, 2001); ou a menor concentração de inibição visível do crescimento bacteriano no teste (HAMMER et al., 1999; DELLAQUIS et al., 2002); ou ainda, a menor concentração que resulte numa significativa diminuição na viabilidade de inoculação (>90%) (CONSENTINO et al., 1999).

A triagem dos óleos essenciais para avaliar atividade antibacteriana é feita, usualmente, pelo método de difusão em disco, os quais são embebidos com óleos essenciais são deitados na placa inoculada com Ágar (SENATORE et al., 2000; BURT; REINDERS, 2003). Apesar das variações, a determinação da CIM dos

óleos essenciais pela diluição em Ágar, geralmente, parece ser aproximadamente na mesma ordem de magnitude (FARAG et al., 1989; PINTORE et al., 2002). A patente baseada no corante indicador resazurina tem sido usada para determinar a Concentração Inibitória Mínima em extratos metanólicos de plantas (SALVAT et al., 2001) e óleos essenciais (BURT; REINDERS, 2003).

Ultee et al. (2000), verificaram que pode haver diminuição da sensibilidade da atividade dos óleos essenciais, identificada pelas mudanças nos ácidos graxos e nos grupos fosfolipídicos da membrana, com redução da fluidez e permeabilidade passiva da membrana celular. Efeitos sinérgicos podem ser explorados para maximizar essa atividade antibacteriana e minimizar as concentrações solicitadas para recompensar o particular efeito antibacteriano. As interações de sinergismo e antagonismo entre os óleos essenciais e seus fitoconstituintes poderão ser melhor esclarecidas com o desenvolvimento da bioengenharia e da química medicinal na síntese, padronização internacional e segurança dessas substâncias (McCASKILL; CROTEAU, 1999; MAHMOUD; CROTEAU, 2002).

2.2.3 – Características das espécies vegetais, óleos essenciais e dos fitoconstituintes estudados

Óleos essenciais provêm de plantas que, na sua maioria, apresentam possibilidade de atividade antibacteriana e, dentre eles, destacam-se *Aloe vera*, *Caryophyllus aromaticus*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia uniflora*, *Laurus nobilis*, *Melissa officinalis*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Pimpinella anisum* e *Rosmarinus officinalis* (ALVES et al., 2000; MONTANHER et al., 2002;

CHAMPS et al., 2003; LUNA et al., 2005; DIP et al., 2004; SILVA et al., 2006; SOUZA, 2006; VIDAL et al., 2007), os quais foram estudados no presente trabalho.

O óleo essencial de *Aloe vera* é obtido das folhas da planta popularmente conhecida como babosa, pertencente à família Liliaceae (Figura 1). São possuidoras de atividade biológicas e, do ponto de vista etnofarmacológico, são indicados em acne, alopecia, anemia, arterioesclerose, artrite, gripe, colite, constipação, cancro, dermatite e úlcera cutânea (CHAMPS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006).

Caryophyllus aromaticus L., conhecido popularmente como cravo, planta pertencente a família Myrtaceae, , pode fornecer por extração óleo essencial, a partir das suas folhas e botões florais (Figura 2). Os preparados medicinais com *C. aromaticus* são indicados no combate a odontalgia, dispepsia, halitose, onicomicose, parasitose intestinal, infecção de vias aéreas superiores, anorexia, perda da libido e como repelente de insetos (DIP et al., 2004). Um dos fitoconstituintes de destaque presentes no óleo essencial de *C. aromaticus* é o eugenol (PEREIRA et al., 2006).



Figura 1: *Aloe vera* L. (Liliaceae) – babosa.



Figura 2: *Caryophyllus aromaticus* L. (Myrtaceae) – cravo.

A planta *Eucalyptus globulus* L., fornece óleo essencial a partir das suas folhas e cascas do caule. É popularmente conhecido como eucalipto e pertence à família Myrtaceae (Figura 3). É originária da Oceania e seu emprego, usualmente, são nos casos de febre, bronquite, sinusite, asma, afonia, parasitoses, como descongestionante nasal e expectorante, além de sua aplicação como anti-séptico, desinfetante e aromatizante de ambientes (FEBRER et al., 2001). O seu fitoconstituente majoritário é 1,8-cineol (eucaliptol) correspondendo a 80% do óleo (SIMÕES; SPITZER, 2003).

O óleo essencial de *Eugenia uniflora* é extraído dos frutos e folhas da planta medicinal popularmente conhecida como pitanga e é pertence à família Myrtaceae. É nativa do Brasil e cresce em terrenos sílico-argilosos, caracterizando-se como arbustiva, ramificada, de tronco tortuoso e ramos sinuosos, folhas opostas, oval-agudas, verde-escuras. Suas flores são brancas, hermafroditas, com pétalas delicadas; seu fruto é carnoso podendo se apresentar na coloração vermelho-alaranjada ou vermelho-escuro (Figura 4). A pitanga tem sido empregada como

antitérmica, eupéptica, antidiarrêica, antiparasitária, antiespasmódica, mucolítica, expectorante, antireumática, antihipertensiva, hipoglicemiante, antigotosa, sedativa e contra oleosidade capilar. (ADEBAJO et al., 1989; VIEIRA, 1992; ALMEIDA, 1993; OYEDEJI et al., 1999; MONTANHER et al., 2002; LUNA et al., 2005). No óleo essencial de *E. uniflora* podem ser identificados diversos fitoconstituintes, dentre eles a selina, beta-pineno, germacreno B e D, alfa-humuleno (MORAIS et al., 1994).



Figura 3: *Eucalyptus globulus* L. (Myrtaceae) – eucalipto.

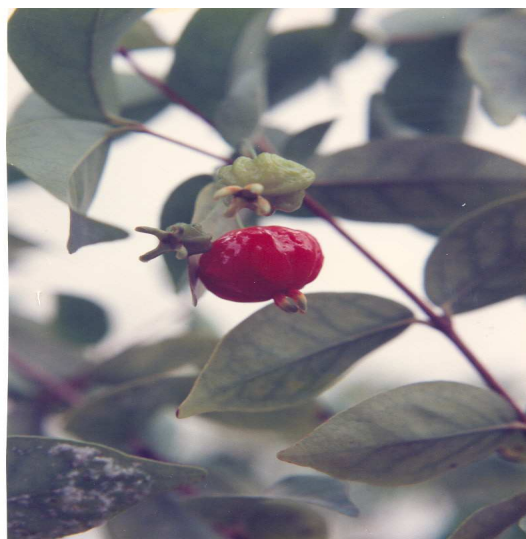


Figura 4: *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) – pitanga.

Laurus nobilis é uma planta pertencente a família Lauraceae, cuja sinonímia popular é louro-de-cheiro; é perene, nativa do mediterrâneo e pode apresentar-se em forma de arbusto ou árvore de pequeno porte, podendo alcançar o tamanho de 2 a 20 metros. Apresenta-se com folhas alternas, coriáceas e muito aromáticas, medindo de 3 a 10 cm (Figura 5).

Seus frutos são pretos e variam da forma globosa a ovalóide. Etnofarmacologicamente, essa planta tem sido usada em forma de pó, chá ou infusão como descongestionante nasal, expectorante, estimulante e antimalárico, além de diurética, antireumática, carminativa, antiácida, cicatricial de mucosas, analgésica, antiespasmódica e narcótica (OLIVEIRA; VENDRAMIN, 1999), no combate a pólipos, escleroses, furúnculos e como repelente a insetos (HERRERA et al., 2004), convulsões e epilepsias (SAYYAH et al., 2002), anti-tripanosoma cruzi (UCHIYAMA et al., 2002), dispepsias, hemorróidas e endoparasitas (FEBRER et al., 2001) e como antioxidante (CONFORTI et al., 2006).

No Brasil, o louro-de-cheiro não produz sementes viáveis, propagando-se, exclusivamente, a partir de processos vegetativos (estaquia e mergulhia), ao passo que na Europa se realiza através de sementes completando o ciclo reprodutivo natural (FUNDAÇÃO DALMO GIACONETTI, 1989; HERRERA et al., 2004). Apresentam vários fitoconstituintes, dentre eles, timol, transcariofileno, vitamina E, linalol, terpineol, fitol, ácido linoléico e eremantine que mostrou maior potência de bioatividade (TANAKA et al., 2006), além do eugenol e pineno, responsáveis pelo efeito anticonvulsivante do óleo essencial (SAYYAH et al., 2002).



Figura 5: *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) – louro-de-cheiro.

Melissa officinalis é uma planta medicinal conhecida popularmente como erva-cidreira ou ainda cidrão, capim cidreira ou sálvia do Brasil. É um arbusto que nasce nas moitas, medindo de 1 a 2 metros de altura, seu caule é quebradiço, retilíneo ou curvo, com ramos engalhados, cilíndricos, sulcados e acinzentados, possui um cheiro aromático forte e é cultivada em quase todo o Nordeste do Brasil (Figura 6).

A *M. officinalis* pertence a família Lamiaceae e o seu óleo essencial pode ser extraído das suas folhas e flores. Essa erva tem finalidade no uso medicinal como calmantes e sedativos, digestiva, antiinflamatória, antipirética, antiespasmódica, antidiarrêica e miorelaxante (LIMA et al., 2005). A melhor produção de óleo essencial de *M. officinalis* se dá na estação da primavera, e o seu fitoconstituente mais destacado tem sido o citral (79%), seguido do linalol, geraniol, nerol e beta-mirceno (SILVA et al., 2006).



Figura 6: *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) – erva-cidreira.

Mentha-piperita pertence à família Lamiaceae, popularmente conhecida como hortelã-pimenta, a qual fornece o óleo essencial a partir das suas folhas (Figura 7). É a erva dos mentalmente lentos em relação à agudeza da percepção. Tem seu uso difundido na prática medicinal como carminativo, antiespasmódico (gastralgia espástica, cólicas intestinais e menstruais), analgésico, antipirético, diurético, broncodilatador, expectorante, descongestionante nasal, anti-hemorroidário, anti-séptico, antiparasitário (intestinal), antiemético, estimulante, antidispéptico e contra halitose.

O óleo essencial obtido de *Mentha-piperita* possui mentol e derivados triterpenos (30 átomos de carbono), taninos, esteróides, hidroquinona e flavonóides que contribuem para a atividade espasmolítica por relaxar a musculatura lisa e, os ácidos fenólicos com efeitos coléricos e colagogos (MATOS, 1998; FEBRER et al., 2001).



Figura 7: *Mentha piperita* L. (Lamiaceae) – Hortelã-pimenta.

Ocimum basilicum é uma planta medicinal pertencente à família Lamiaceae, popularmente conhecida como basilicão, alfavaca ou manjericão. As diferentes variedades de manjericão podem ser classificadas de acordo com o seu aroma, onde o de cor vermelha é o mais aromático e mais raro. O manjericão de cor verde é o mais conhecido (Figura 8). Tem seu uso medicinal costumeiramente indicado como calmante, miorelaxante, antitérmico, analgésico, antiespasmódica, antitussígeno e antigripal, no combate a faringite e bronquite, acne, afta, antraz, erosão mamilar, furúnculo, pirose, hipertensão arterial e déficit de memória.

A extração do óleo essencial de *O. basilicum* é feita normalmente pelo processo de destilação (arraste a vapor) tendo como principal componente o linalol, além do eugenol, cineol, borneol, geraniol e terpineol entre os mais destacados (FEBRER et al., 2001).



Figura 8: *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) – basilicão.

Origanum vulgare é uma erva da família Lamiaceae, nativa do mediterrâneo e apresenta-se de forma perene, tendo seu cultivo disseminado na Europa, América e Ásia, onde são reconhecidas 38 espécies (ALIGIANS et al., 2001). Sua sinonímia popular mais conhecida é o orégano, podendo também ser conhecida por manjerona selvagem. É um arbusto, aromático, com numerosos caules eretos quadrangulares pilosos, além de folhas ovaladas opostas e minúsculas flores terminais com coloração roxa ou cor-de-rosa dispostas em pequenos ramos compactos (Figura 9).

Os oréganos crescem, preferencialmente, em áreas pedregosas, pradarias secas, declives relvados, matagais, terrenos calcários e em montanhas rochosas em uma variável faixa de até 400 metros de altitude, e podem atingir cerca de 90 cm de altura e, apresentam odor herbáceo, amadeirado e levemente picante (LORENZI, 1991; FOREY; LINDSAY, 1996; BAUER, et al., 2001).

Destacam-se entre as indicações medicinais do *O. vulgare*, a atividade analgésica, antireumática, antiespasmódica, anti-séptica, antioxidante, estimulante do apetite, expectorante, laxante, parasiticida (pediculose), eupéptica, sudorífera e cicatricial (LAVABRE, 1992; MATOS, 1998; CERVATO et al., 2000; SELLAR, 2002). Diversos fitoconstituintes são citados em sua composição do seu óleo essencial, tais como, carvacrol, timol, γ -terpineno, p-cimeno, o-cimeno, α -pineno, mirceno, canfeno, limoneno, trans-cariofileno, borneol e cineol (LAWRENCE, 1984; PRUDENT et al., 1995; SIVROPOULOU et al., 1996; RUSSO et al., 1998; DAFERERA et al., 2000; DEMETZOS; PERDETZOGLU, 2001; MARINO et al., 2001, SOUZA, 2006).



Figura 9: *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) – orégano.

A planta da espécie *Pimpinella anisum* pertence à família Apiacea e é, conhecida, popularmente, como erva-doce. É uma erva perene, bianual, com cerca de 60 cm de altura, com flores pequenas, caule verde e cilíndrico e de sementes aromáticas. O óleo essencial pode ser extraído a partir das suas sementes e frutos secos (Figura 10). A planta tem indicação medicinal como antiinflamatória, antiácida,

broncodilatadora, expectorante, antiespasmódica, miorelaxante, analgésica, calmante, lipolítica, antihipertensiva (diurética), antiparasitária e galactorrêica. E seus fitoconstituintes de maior destaque são trans-anetol, estragol, anisaldeídos, além de, cumarinas, miristicina e flavonóides (FEBRER et al., 2001; LIMA et al., 2005).

Rosmarinus officinalis, cuja sinonímia popular é alecrim, pertence à família Lamiaceae e é uma planta medicinal de onde também se pode extrair óleo essencial. Do ponto de vista medicinal, a planta é indicada pelas suas atividades antioxidante, anti-reumática, orexígena e eupeptica (SANT'ANA; MANCINI-FILHO, 1999), além de anti-hipertensiva, tônica (adinamia), analgésica, laxante e anti-séptica bucal (FEBRER et al., 2001). Assim como os demais óleos essenciais, o de *R. officinalis* apresenta uma variedade de fitoconstituintes e dentre os principais citam-se α -pinene (2 a 25%), acetato de bórniol (0 a 17%), cânfora (2 a 14%) e 1,8-cineole (3 a 89%) (DAFERERA et al., 2000; DEMETZOS; PERDETZOGLOU, 2001; PINTORE et al., 2002).



Figura 10: *Pimpinella anisum* L. (Apiaceae) – erva-doce.



Figura 11: *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) – alecrim.

Um óleo essencial, em geral, apresenta variadas funções químicas pela sua diversidade de fitoconstituintes em sua composição, a exemplo de alcoóis (linalol, geraniol, terpinol, mentol, borneol), aldeídos (citral, citronelol, benzaldeído, aldeído cinâmico, vanilina), ácidos (benzóico, cinâmico, mirístico), fenóis (eugenol, timol, carvacrol), cetonas (carvona, mentona, pulegona, cânfora), ésteres (cineol, eucaliptol, anetol, safrol), terpenos (pineno, limoneno, felandreno), lactonas (cumarina), dentre outros (SIMÕES; SPITZER, 2003).

Eugenol é um fitoconstituente fenólico (Figura 12), que além do seu poder anti-séptico, possui propriedades espasmogênicas. No entanto, pela sua toxicidade pode causar dermatite, gengivite e alergia, sendo necessárias formulações com concentrações seguras antes de qualquer liberação de fitoconstituente para uso terapêutico (MANABE et al., 1987; MADEIRA et al., 2002; BLEASEL, 2002; BURT, 2004).

O eugenol tem sido relatado como maior fitoconstituente do *Allium sativum* L. (85%), espécie vegetal popularmente conhecida como alho (FARAG et al., 1989).

Tem sido relatadas concentrações letais de eugenol na inibição da produção de amilase e proteases, além da deterioração da parede celular bacteriana e a alta queda da lise celular (THOROSKI et al., 1989).

Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias químicas presentes nos vegetais, sendo esse termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva do isopreno (possuem 5 átomos de carbono) (SIMÕES; SPTIZER., 2003). Como representantes dos terpenóides, destacamos o alfa-pineno e beta-pineno (Figura 12).

O Citral é um fitoconstituente do tipo aldeído (Figura 12). Em relação ao mesmo, são encontrados relatos de atividades biológicas e sua utilização com fins medicinais (LANCIOTTI et al., 2004).

Pesquisas com plantas medicinais relacionando etnofarmacologia, fitoquímica e bioatividade antibacteriana têm sido periodicamente realizadas, seja para análise da estrutura molecular e de mecanismos de ação dos princípios ativos, buscando, sobretudo, desenvolver modelos para a produção de novos fármacos bioativos naturais ou derivados sintéticos.

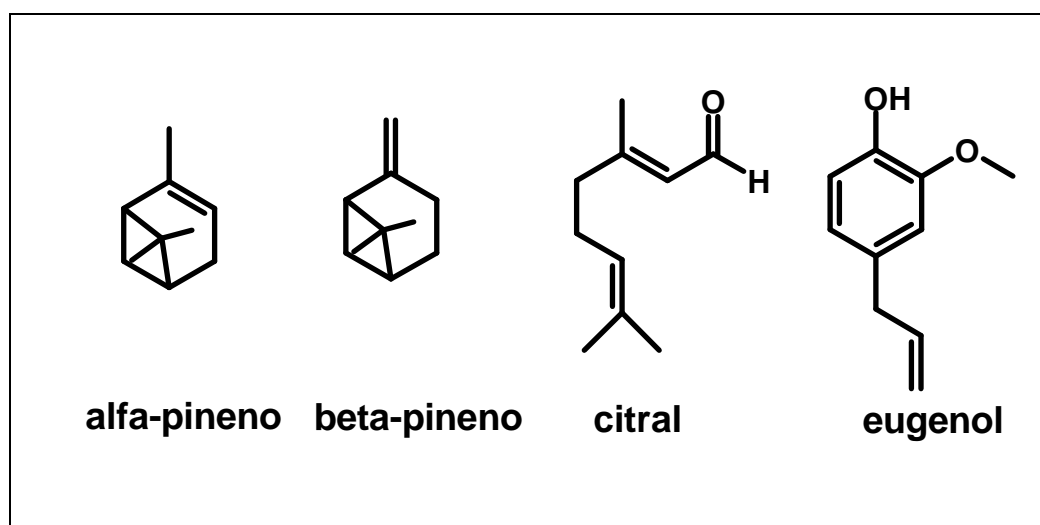


Figura 12: Estrutura química dos fitoconstituintes ensaiados.

OBJETIVOS

3 – OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral:

Avaliar a atividade biológica de óleos essenciais e fitoconstituintes de plantas medicinais sobre cepas bacterianas potencialmente causadoras de Endocardite Infecciosa.

3.2- Objetivos específicos:

- Realizar triagem dos óleos essenciais na concentração absoluta frente a espécies bacterianas selecionadas para estudo;
- Caracterizar o perfil de resistência das cepas bacterianas testes frente aos antibióticos Gentamicina e Penicilina G Cristalina;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais ensaiados e alguns fitoconstituintes selecionados presentes nesses óleos;
- Avaliar a interferência dos óleos essenciais e fitoconstituintes sobre a viabilidade celular de algumas cepas ensaiadas;
- Executar testes toxicológicos pré-clínicos frente a *Artemia salina* com óleos essenciais e fitoconstituintes que se apresentarem efetivos na inibição do crescimento das cepas bacterianas.
- Avaliar atividade de embriotoxicidade dos óleos essenciais sobre larvas de *Aedes aegypti*.

MATERIAL E MÉTODOS

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Locais de trabalho

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde; no Laboratório de Toxicologia (LABETOX), do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Campus I, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) - João Pessoa, e no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Recife.

4.2 – Óleos essenciais e fitoconstituintes ensaiados

Os óleos essenciais e respectivos fitoconstituintes utilizados nos ensaios biológicos, oriundos de espécies vegetais, foram selecionados seguindo-se as informações na literatura especializada e seu uso na medicina natural ou popular. Os óleos essenciais foram obtidos da empresa FERQUIMA - Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande Paulista - São Paulo). Os produtos vieram acompanhados de um boletim técnico, contendo as informações sobre o processo de extração dos óleos, os quais seguem a técnica padrão adotada – Hidrodestilação (MATOS, 1988; CRAVEIRO et al., 1981), bem como laudos sobre a aparência, cor, impureza, odor, densidade e Índice de refração (20°C), validando a qualidade do produto.

As espécies vegetais das quais foram obtidos os óleos essenciais utilizados para os ensaios microbiológicos e suas principais indicações medicinais, estão expressos Quadro 1.

Os fitoconstituintes utilizados nos ensaios biológicos foram alfa-pineno, beta-pineno, citral e eugenol e, foram cedidos pela professora Dionezine de Fátima Navarro, do Laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa - Paraná.

Os óleos essenciais e fitoconstituintes avaliados quanto a sua atividade antibacteriana foram testados "in natura" nas concentrações de 40 até 0,63 $\mu\text{L/mL}$, seguindo o protocolo de Allegrini et al. (1973). (Óleo essencial e fitoconstituente: 0,4 mL; Tween 80: 0,04 mL; água destilada q.s.p.: 5 mL). Tais concentrações foram obtidas através de diluições seriadas à razão de 2.

4.3 – Antibióticos testados

Para controle de avaliação da atividade antibacteriana dos produtos naturais, foram utilizados como padrão, os antibióticos Penicilina G cristalina (10 $\mu\text{g/mL}$) e Gentamicina (10 $\mu\text{g/mL}$), considerados, convencionalmente, pelas diretrizes internacionais que tratam do diagnóstico e terapêutica antimicrobiana da EI (BADDOUR et al., 2005). Foram avaliados através da técnica de difusão em meio sólido, utilizando discos de papel de filtro – 6 mm (Sensidisc – Diagnóstico Microbiológico Especializado – CECON, Araçatuba - SP), de acordo com a metodologia de Bauer e Kirby (1966).

Quadro 1: Espécies vegetais das quais foram obtidos os óleos essenciais para os ensaios microbiológicos e suas principais indicações medicinais.

Espécie / Família	Sinonímia popular	Partes utilizadas	Indicações medicinais	Referências
<i>Aloe vera</i> L. / Liliaceae	Babosa	Folhas	Acne, alopecia, anemia, arteriosclerose, constipação, dermatite, artrite, colite, cancro e gripe.	Champs et al., 2003. Lima et al., 2005. Oliveira et al., 2006.
<i>Caryophyllus aromaticus</i> L. / Myrtaceae	Cravo	Folhas e botões florais	Odontalgia, onicomicose, halitose, gengivite, faringite, frigidez sexual, parasitose, anorexia e repelente a insetos.	Dip et al., 2004.
<i>Eucalyptus globulus</i> L. / Myrtaceae	Eucalipto	Folhas e cascas	Rinite, sinusite, bronquite, como anti-séptico e aromatizante.	Febrer et al., 2001. Lima et al., 2005.
<i>Eugenia uniflora</i> L. / Myrtaceae	Pitanga	Flores, frutos e folhas	Hepatopatia, bronquite, faringite, diarreia, febre, artrite, parasitose, gota, hipertensão arterial e na oleosidade capilar.	Vieira et al., 1992. Alves et al., 2000. Montanher et al., 2002. Luna et al., 2005. Lima et al., 2005.
<i>Laurus nobilis</i> L. / Lauraceae	Louro-de-cheiro	Folhas	Anorexia, dor articular, cefaléia, cólica intestinal, pirose, dispepsia e bronquite catarral.	Oliveira; Vendramin, 1999. Lima et al., 2005. Conforti et al., 2006.
<i>Melissa officinalis</i> L. / Lamiaceae	Erva-cidreira	Folhas e flores	Ansiedade, dispepsia, cólica intestinal, diarreia, febre e mialgia.	Lima et al., 2005 Silva et al., 2006.
<i>Mentha piperita</i> L. / Lamiaceae	Hortelã-pimenta	Folhas	Cólica, anorexia, asma, febre, tosse, hipertensão arterial, vômito, halitose e endoparasitose.	Matos, 1998. Febrer et al., 2001. Vidal et al., 2007.
<i>Ocimum basilicum</i> L. / Lamiaceae	Basilicão, Alfavaca ou Manjeriçã	Folhas	Afta, antraz, furúnculo, erosão mamilar, febre, acne, bronquite, câimbra, gripe, tosse e faringite.	Febrer et al., 2001. Lima et al., 2005

Continuação do Quadro 1:

Espécie / Família	Sinonímia popular	Parte utilizada	Indicações medicinais	Referências
<i>Origanum vulgare</i> L. / Lamiaceae	Orégano	Folhas	Cólica, cefaléia, constipação, bronquite, artrite, anorexia e pediculose.	Sellar, 2002. Souza, 2006. Souza et al., 2007.
<i>Pimpinella anisum</i> L. / Apiaceae	Erva-doce	Sementes (fruto seco)	Pirose, asma, cólica, cefaléia, câimbra, palpitação, náusea e bronquite catarral.	Febrer et al., 2001. Lima et al., 2005.
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. / Lamiaceae (Labiatae)	Alecrim	Folhas	Anorexia, dispepsia, artrite, artrose, flatulência e como antioxidante.	Sant'Ana; Mancini-Filho, 1999. Febrer et al., 2001.

4.4 – Espécies bacterianas

As espécies bacterianas utilizadas nos ensaios microbiológicos foram fornecidas pelo Laboratório de Microrganismos de Referência, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) - Rio de Janeiro, e pelo Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do CCS, da UFPB – João Pessoa, conforme relação expressa no Quadro 2.

4.5 – Meios de cultura

Para a execução dos ensaios de atividade antibacteriana dos óleos essenciais e fitoconstituintes, foram usados ágar e caldo Muller-Hinton (DIFCO

Laboratories, Detroit, USA). Os mesmos foram preparados conforme a instrução do fabricante.

Quadro 2: Relação nominal e origem das cepas bacterianas utilizadas nos ensaios microbiológicos:

CEPAS BACTERIANAS	CÓDIGO	FORNECEDOR
1 – <i>Eikenella corrodens</i>	*ATCC 23834	(FIOCRUZ)
2 - <i>Escherichia coli</i>	*ATCC 11105	(FIOCRUZ)
3 – <i>Escherichia coli</i>	*ATCC 8739	(CCS/UFPB)
4 – <i>Escherichia coli</i>	*ATCC 10536	(CCS/UFPB)
5 – <i>Haemophilus influenzae</i>	*ATCC 51907	(FIOCRUZ)
6 – <i>Klebsiella pneumoniae</i>	*ATCC 4352	(FIOCRUZ)
7 – <i>Klebsiella pneumoniae</i>	*ATCC 4362	(CCS/UFPB)
8 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*ATCC 9027	(CCS/UFPB)
9 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*ATCC 25619	(FIOCRUZ)
10 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*ATCC 15442	(CCS/UFPB)
11 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*ATCC 27853	(CCS/UFPB)
12 – <i>Staphylococcus aureus</i>	*ATCC 13150	(FIOCRUZ)
13 – <i>Staphylococcus aureus</i>	*ATCC 6538	(CCS/UFPB)
14 – <i>Staphylococcus aureus</i>	*ATCC 25923	(CCS/UFPB)
15 – <i>Staphylococcus aureus</i>	**LFB 126	(FIOCRUZ)
16 – <i>Staphylococcus epidermidis</i>	***SSI 1	(FIOCRUZ)
17 – <i>Staphylococcus epidermidis</i>	*ATCC 12228	(CCS/UFPB)
18 – <i>Streptococcus pneumoniae</i>	*ATCC 11773	(FIOCRUZ)
19 – <i>Streptococcus pyogenes</i>	*ATCC 19615	(FIOCRUZ)
20 – <i>Streptococcus pyogenes grupo A</i>	*ATCC 8668	(FIOCRUZ)

*ATCC = American Type Culture Collection (EUA);

**LFB = Laboratório de Fisiologia Bacteriana – FIOCRUZ (Brasil);

***SSI = Statens Seruminstitut (Dinamarca).

4.6 – Inóculo bacteriano

O inóculo das cepas bacterianas utilizadas nos ensaios microbiológicos foi obtido a partir de culturas com repiques de 24 horas a 35°C. As suspensões foram preparadas em tubos de ensaio (160 x 16 mm), contendo 10 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) esterelizada. Em seguida, tais suspensões foram agitadas durante 2 minutos com auxílio de aparelho Vortex. Após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada e turbidez apresentada pela solução de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala de McFarland, a qual corresponde a um inóculo de, aproximadamente, 10^6 UFC/mL. As suspensões bacterianas foram diluídas 1:9 v/v em solução salina, para obtenção de um inoculo final contendo, aproximadamente, 10^8 UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; NCCLS, 2004).

4.7 – Ensaio de atividade antibacteriana

4.7.1 – Triagem da atividade antibacteriana dos óleos essenciais

A triagem do potencial antibiótico dos óleos essenciais frente às espécies bacterianas selecionadas, foi feita pelo método de difusão em meio sólido com disco. Em placas de Petri (90 x 15 mm), descartáveis e esterelizadas (DISPROLET), foi colocado 1 mL de cada suspensão bacteriana, contendo, aproximadamente, 10^7 UFC/mL. Em seguida, foi vertido 20mL de ágar Muller-Hinton fundido a 45 a 50°C, sendo lentamente homogeneizado. Após solidificação do meio de cultura, discos de

papel de filtro (CECON – SP) foram embebidos com 20 µL de cada óleo essencial “in natura”. Os mesmos foram depositados sobre o meio de cultura contendo o inóculo microbiano.

Os ensaios feitos em duplicata e incubados a 35°C, por 24 horas. E após o tempo de incubação, foram feitas as leituras dos resultados. Foram considerados positivos, os óleos essenciais que produziram halos de inibição iguais ou superiores a 10 mm de diâmetro (WONG-LEUNG, 1988; NAQUI et al., 1991; NCCLS M2-A7, 2000a).

4.7.2 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Na segunda etapa do trabalho, foi determinado a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais selecionados na triagem microbiológica e dos fitoconstituintes. A determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição em placas de poliestireno (TPP/ISO 9001/Switzerland), com tampas esterilizadas (NCCLS M2/A7, 2000a; HADACEK; GREGER, 2000; CLEELAND; SQUIRES, 1991).

Nas placas contendo 96 poços em forma de U, nas colunas de A a H e linhas de 1 a 12, foram colocadas 100 µL do caldo nutriente duplamente concentrado. Logo em seguida, foi acrescentado nos poços da coluna A e linhas de 1 a 12, 100 µL do produto natural testado (óleo essencial), na concentração inicial de 40 µL/mL (ou 4%) preparado na forma de emulsão (ALLEGRIINI et al., 1973). Foi feita a diluição seriada à razão de 2 (40 a 0,63 µL/mL) a partir da coluna A até G. Na última coluna (H), foi utilizada para controle de viabilidade para espécie bacteriana. Uma vez, feitas as

diluições, foi inoculado em todas as cavidades de placas 10 μ L das suspensões. Os ensaios foram feitos em duplicata e incubados a 35°C por 24 horas.

Com a finalidade de se evidenciar a CIM dos produtos frente às espécies bacterianas testadas, foi preparada e usada uma solução indicadora de resazurina sódica (SIGMA) em água destilada esterelizada na concentração de 0,01% (p/v). Depois de decorrido o tempo de incubação adequado, foram adicionados 20 μ L de solução de resazurina em cada cavidade, deixando-se agir por um período de três horas em estufa a 35°C. Em seguida, foi feita a leitura do resultado, sendo observado a mudança da coloração azul para rosa, indicando a redução da resazurina mediante o crescimento das cepas bacterianas (Figura 13). A interpretação dos resultados foi visualizado com maior segurança em relação a CIM, definida como a menor concentração do produto natural que inibiu o crescimento bacteriano, pela evidência da cor azul do indicador utilizado (MANN; MARKHAM, 1998; PALOMINO et al., 2002).

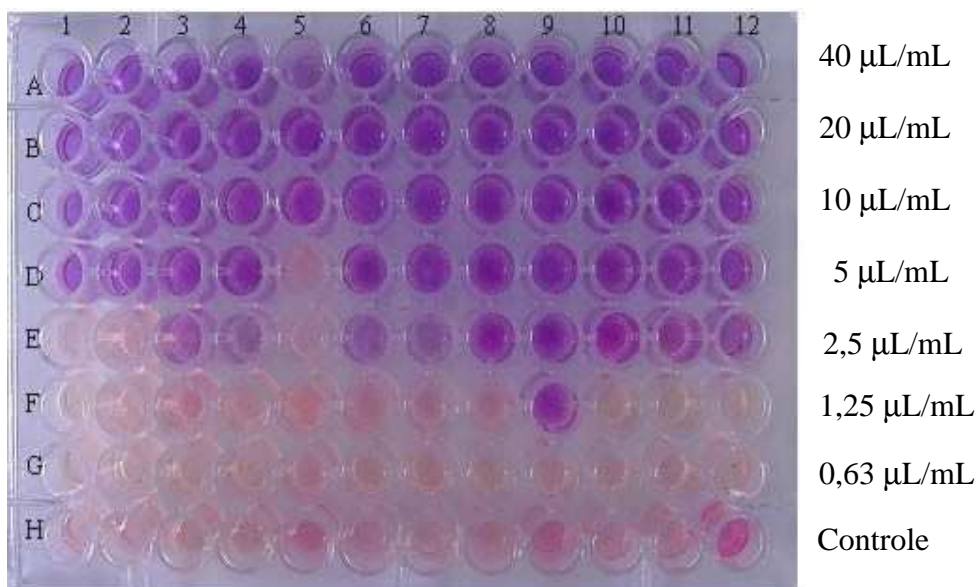


Figura 13: Placa de Microdiluição utilizada.

4.7.3 – Determinação da cinética de morte bacteriana

O estudo da interferência dos óleos essenciais ou fitoconstituintes sobre a viabilidade das cepas bacterianas foi realizado através do método de contagem de células viáveis. Neste ensaio, foi observado o comportamento das cepas bacterianas frente à CIM previamente determinada. Inicialmente, 1 mL da suspensão bacteriana foi inoculado em 4mL de caldo nutriente com concentração ajustada para 10 mL. Em seguida, adicionou-se 5 mL da solução do óleo essencial ou fitoconstituente com concentração de duas vezes a da CIM determinada.

O sistema ficou incubado a 35 - 37°C. Nos intervalos 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas pós-incubação, uma alíquota de 1,0 mL da suspensão foi diluída seriadamente (1:9 v/v) em água peptonada 0,1% (10^{-1} – 10^{-5}) e uniformemente inoculada em placa de Petri contendo ágar nutriente. Foi realizado o experimento controle onde a solução do óleo essencial ou fitoconstituente foi substituída por 5 mL de soro fisiológico estéril adicionado de 0,04 mL de Tween 80. Os ensaios ficaram incubados a 35 - 37°C por 24 horas, de modo que após o fim do período de incubação, realizou-se a contagem do número de células viáveis, e expressas em Log de UFC/mL (SAGDIÇ, 2003).

4.8 – Ensaio toxicológicos

4.8.1 – Bioensaios de toxicidade com óleos essenciais e fitoconstituintes selecionados frente à *Artemia salina*

As larvas de *A. salina* têm sido amplamente utilizadas como organismos alvos (microcrustáceo – Brine Shrimp) para se detectar a bioatividade de compostos de plantas e estabelecer a sua toxicidade através da determinação da Concentração Letal 50% (CL₅₀) (ALVES et al., 2000; LIMA et al., 2002; CALDWELL et al., 2003; SVENSSON et al., 2005; LUNA et al., 2005; CUADRA et al., 2005).

Para a obtenção dos náuplios (larvas de 24 horas), cistos de *Artemia salina* foram colocados em um recipiente contendo água salina (pH 8,5 e 29 °C), o qual ficou sob iluminação artificial por 24 h. Por fim, após esse período, observou-se se houve eclosão dos cistos e obtenção dos náuplios.

O óleo foi solubilizado com Tween 80, DMSO e água salina, a fim de se obter uma solução mãe de 10 mg/mL. A partir desta, foram efetuadas diluições para concentrações inferiores de 10 - 1000 µg/mL. Colocou-se 5 mL de cada uma dessas soluções em tubos de ensaio e adicionou-se de 13 a 15 náuplios.

Cada concentração foi testada em triplicata e repetida em três experimentos. Um grupo controle foi preparado contendo apenas os solventes e as larvas. O conjunto em incubação foi deixado sob luz artificial por 24 h e, finalmente, realizou-se a contagem do número de larvas vivas e mortas.

A CL₅₀, concentração considerada letal para 50% das larvas, foi determinada de acordo com o método estatístico de Probitos utilizando o programa computadorizado Microcal Origin 6.0. Para CL₅₀ menor que 1000 µg/mL, as espécies são consideradas bioativas (McLAUGHIN; ROGERS, 1998).

4.8.2 – Bioensaios de embriotoxicidade *in vitro* com óleos essenciais selecionados frente às larvas do *Aedes aegypti*

Esse bioensaio foi realizado no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, com a participação do Programa de Saúde Ambiental da Prefeitura da cidade do Recife.

As larvas e ovos do *A. aegypti* foram obtidos no insetário do Centro de Vigilância Ambiental (CVA), prefeitura do Recife, Pernambuco-Brasil. As larvas foram criadas de acordo com a metodologia já definida (SILVA et al., 1998).

As larvas dos mosquitos *A. aegypti* foram criadas a partir de ovos coletados nos criadouros do Distrito Sanitário VI. O desenvolvimento e ecdise das larvas (L1, L2, L3 e L4) e das pupas resultaram em mosquitos adultos. Estes constituem geração parental, da qual se podem adquirir novas linhagens puras. Os insetos adultos foram abrigados em gaiolas apropriadas, com laterais telados e fundos de acrílico. Foram criadas sete linhagens de *A.aegypti* e todas foram utilizadas para obtenção de ovos e larvas.

Dez larvas no primeiro estágio (L1) foram cultivadas na presença de diferentes diluições dos óleos essenciais, por 72 horas, em temperatura ambiente e fotofase aproximada de 12 horas. Cada diluição foi testada em triplicata e utilizou-se o DMSO (dimetilsulfóxido) como controle. A cada 24 horas foi verificado o desenvolvimento das larvas.

O ensaio experimental consistiu em cultivar as larvas do vetor, as quais foram analisadas estatisticamente e morfológicamente, quanto ao fator de inibição do desenvolvimento produzido pelos óleos essenciais. Os resultados foram analisados durante o período de cultivo através de microscópio invertido (Leica) com contraste

fase e as imagens dos estágios de desenvolvimento foram capturadas com Câmera Leica DFC-280.

Após obtenção dos estágios de desenvolvimento das larvas, os mesmos foram imersos em solução fixadora 2,5%, paraformaldeído a temperatura de aproximadamente 4°C durante três horas. Cerca de cinco larvas de cada grupo foram analisadas utilizando o microscópio invertido (fator de ampliação 100x). Da mesma forma, as fotomicrografias foram obtidas com Câmera Leica DFC-280. As leituras de desenvolvimento das larvas foram avaliadas em 24 horas após o início dos experimentos até 72 horas após o início do bioensaio e os resultados notificados em tabelas (SILVA et al., 1998).

4.9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados foram utilizados testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e de estatística inferencial (teste *t de Student*), adotando-se probabilidades estatisticamente significantes de 5% ($p < 0,05$). Os valores da CL_{50} foram calculados, a partir de regressões não-lineares e lineares feitas pelo método do mínimo quadrado das curvas concentração-respostas individuais. Para realização das análises estatísticas foram utilizados softwares SPSS versão 11 e o Probitos Microcal Origin 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Triagem da atividade antibacteriana dos óleos essenciais

Para avaliação do potencial antibacteriano, foi realizada uma triagem com os óleos essenciais de *A. vera*, *C. aromaticus*, *E. globulus*, *E. uniflora*, *L. nobilis*, *M. officinalis*, *M. piperita*, *O. basilicum*, *O. vulgare*, *P. anisum* e *R. officinalis* frente a todas as espécies bacterianas inicialmente ensaiadas, bem como com os antibióticos Penicilina G Cristalina e Gentamicina. Foram selecionadas as espécies bacterianas potencialmente causadoras de EI, tais como, *E. coli* ATCC 8739, *E. corrodens* ATCC 23834, *K. pneumoniae* ATCC 4352, *P. aeruginosa* ATCC 25619, *S. aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* ATCC 25923 (Tabela 1).

Todas as cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas foram 100% sensíveis aos óleos essenciais de *L. nobilis* e *O. vulgare*, apresentando halos de inibição entre 10 e 34 mm e, respectivas médias de 18 e 30 mm de diâmetros (Figura 14, 15 e 16). Tais resultados também foram superiores à média dos halos de inibição produzidos pela gentamicina (16 mm de diâmetro) e penicilina (12,5 mm de diâmetro) (Tabela 1).

Os óleos essenciais de *C. aromaticus* e *M. piperita* apresentaram inibição significativa sobre o crescimento de 4 (67%) das 6 cepas bacterianas (Figura 17 e 18). No entanto, os demais óleos essenciais ensaiados de *A. vera*, *E. globulus* e *O. basilicum* apresentaram atividade antibacteriana em 50% das cepas bacterianas, ao passo que, os de *E. uniflora*, *M. officinalis* e *P. anisum* obtiveram essa atividade em menos da metade das cepas selecionadas (Tabela 1).

Tabela 1: Média dos halos de inibição (em mm) da atividade antibacteriana dos óleos essenciais “in natura” e antibióticos sobre espécies bacterianas.

Óleos Essenciais	Cepas Bacterianas					
	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>E. corrodens</i> ATCC 23834	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 4352	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
	Halos de inibição (mm)					
<i>A. vera</i>	25	11	14	7	0	0
<i>C. aromaticus</i>	16	10	0	8	11	10
<i>E. globules</i>	10	9	11	7	10	8
<i>E. uniflora</i>	0	8	14	8	8	7
<i>L. nobilis</i>	25	28	16	16	12	10
<i>M. officinalis</i>	24	0	8	7	0	0
<i>R. officinalis</i>	24	10	0	8	0	8
<i>M. piperita</i>	20	10	12	8	0	15
<i>O. basilicum</i>	30	9	8	9	11	12
<i>O. vulgare</i>	32	24	34	33	30	30
<i>P. anisum</i>	18	7	8	7	0	0
Antibióticos:	Halos de inibição (mm)					
Gentamicina	15	10	13	15	25	18
Penicilina G.	20	20	0	0	15	20

Os óleos essenciais de *A. vera*, *M. officinalis* e *P. anisum* não apresentaram atividade antibacteriana em nenhuma das espécies de *Staphylococcus aureus*. No entanto, vale ressaltar que a espécie *E. coli* ATCC 8739 foi sensível a todos os óleos essenciais experimentados, com exceção do óleo essencial de *E. uniflora* (Tabela 1).

Levando em consideração os resultados obtidos com o ensaio de atividade antibacteriana com o padrão de Gentamicina e Penicilina G. cristalina frente às espécies bacterianas trabalhadas nesse estudo, vale ressaltar o potencial farmacológico encontrado dos óleos essenciais de *L. nobilis* e *O. vulgare*. Ambos os óleos essenciais de *L. nobilis* e *O. vulgare*, são citados na literatura com atividades

anti-sépticas, desinfetantes, inseticidas, parasitárias dentre outras propriedades farmacológicas (PANIZZA, 1997; SELLAR, 2002; SOUZA, 2006).

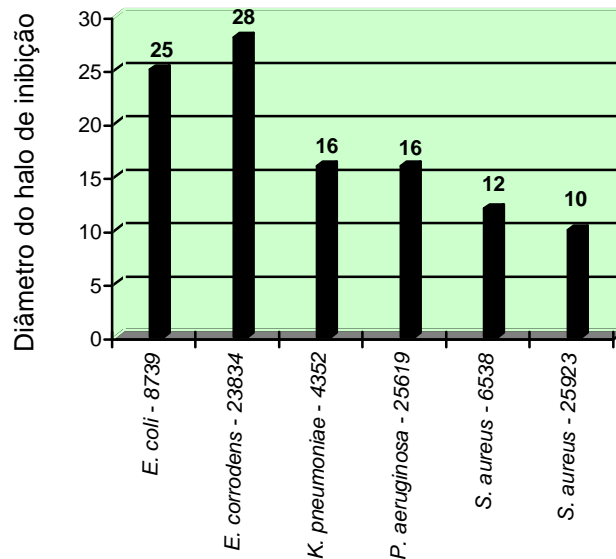


Figura 14: Diâmetro do halo de inibição (mm) de cepas bacterianas sob ação do óleo essencial de *L. nobilis*.

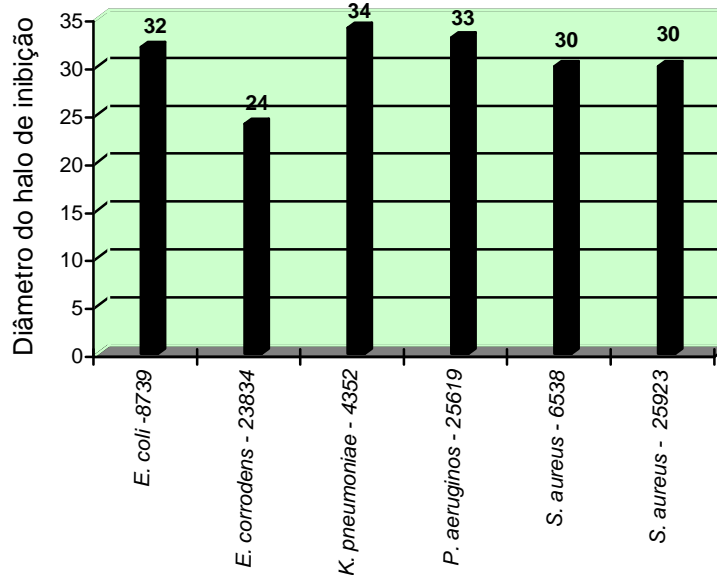


Figura 15: Diâmetro do halo de inibição (mm) de cepas bacterianas sob ação do óleo essencial de *O. vulgare*.

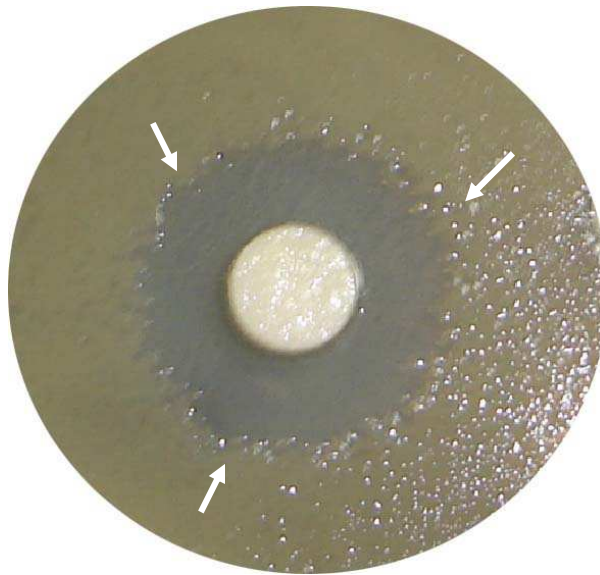


Figura 16: Imagem do halo de inibição do óleo essencial de *L. nobilis* sobre *P. aeruginosa* (ATCC 25619), difusão em meio sólido.

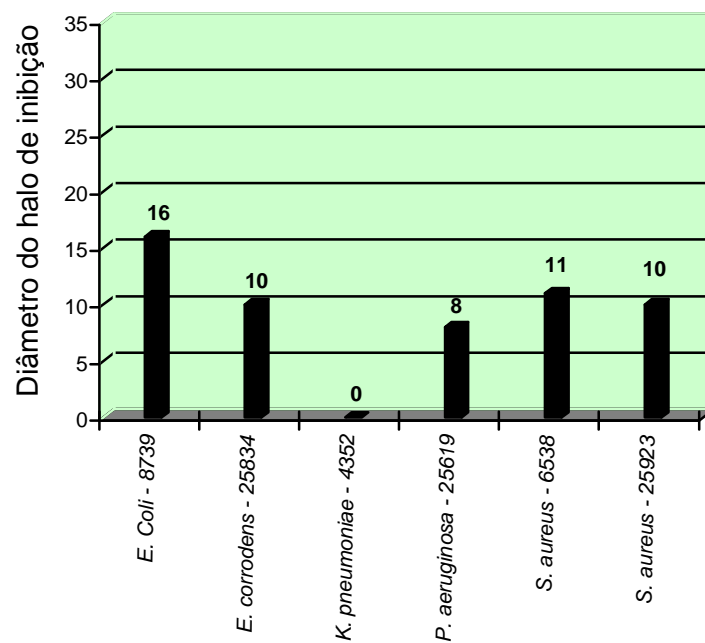


Figura 17: Diâmetro do halo de inibição (mm) de cepas bacterianas sob ação do óleo essencial de *C. aromaticus*.

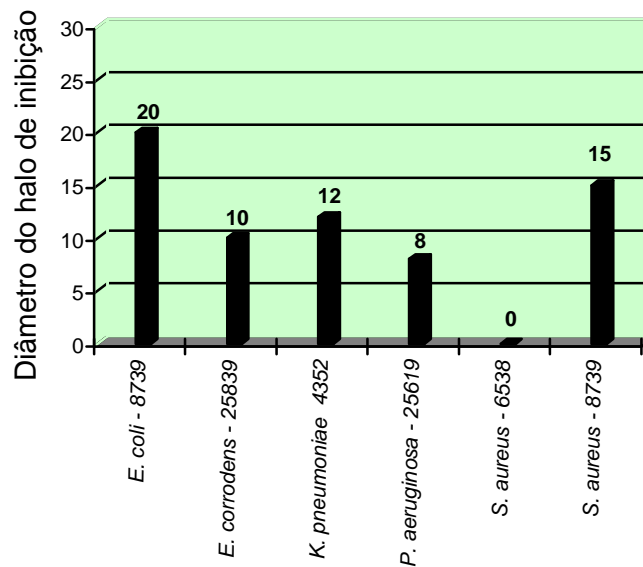


Figura 18: Diâmetro do halo de inibição (mm) de cepas bacterianas sob ação do óleo essencial de *M. piperita*.

Os resultados obtidos na triagem de atividade antibacteriana, corroboram os dados publicados por Lima e colaboradores, em 1993, onde o óleo essencial de *L. nobilis* inibiu o crescimento de 15 das 16 cepas de dermatófitos, incluindo *Trichophyton*, *Microsporium* e *Epidermophytus*, cujos halos de inibição foram entre 15 a 30 mm de diâmetro. Também deve ser considerado os resultados do produto frente às espécies de leveduras do gênero *Malassezia* e *Trichosporon*, os quais apresentaram-se sensíveis ao óleo essencial de *L. nobilis* (LIMA et al., 1993).

Em relação ao óleo essencial de *O. vulgare*, foi possível constatar que todas as espécies bacterianas apresentaram sensibilidade ao produto, dados que corroboram com os resultados encontrados por Souza et al.(2006). Estes autores fizeram uma avaliação do potencial da atividade antibiótica do óleo essencial sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, o qual produziu importante atividade inibitória com halos de inibição, em média, com 30 mm de diâmetro. Tais

resultados com os óleos essenciais de *O. vulgare* e *L. nobilis*, definiram a escolha dos mesmos para os demais ensaios de atividade antibacteriana, em especial a determinação da CIM, como também a curva de morte bacteriana e os ensaios toxicológicos.

A triagem da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e dos fitoconstituintes é utilizada como teste preliminar para avaliação do potencial antimicrobiano e, a partir da obtenção dos resultados iniciais é que se foi executado a seqüência de ensaios experimentais mais aprofundados com vistas à obtenção de maiores informações sobre propriedade bioativas (HSIEH et al., 2001; LIMA, 2002; PONTES, 2002; GAYOSO et al., 2004).

5.2 – Determinação da concentração inibitória mínima - CIM

A seleção dos óleos essenciais com propriedades antibacterianas foi feita pela técnica de difusão em meio sólido. Foram selecionados os produtos que produziram inibição sobre 90% das cepas bacterianas e cujos halos de inibição foram superiores a 10 mm de diâmetro (WONG-LEUNG, 1988) e, assim, foram escolhidos os óleos essenciais de *L. nobilis* e *O. vulgare*; e os fitoconstituintes alfa-pineno, beta-pineno, citral e eugenol, os quais, não foram submetidos à triagem microbiológica inicial. A seguir, estão listados os fitoconstituintes mais encontrados nesses (Quadro 3).

Quadro 3: Relação dos principais fitoconstituintes encontrados nos óleos essenciais de *L. nobilis* e *O. vulgare*.

Óleos essenciais	Fitoconstituintes	Referências
<i>L. nobilis</i> L.	Geraniol, linalol, timol, terpineol, cineol, trans-cariofileno, pineno e eugenol.	Sayyah et al., 2002. Burt; Reinders, 2003. Souza, 2006. Tanaka et al., 2006.
<i>O. vulgare</i> L.	Carvacrol, timol, citral, geraniol, γ -terpineno, α -pineno, β -pineno, limoneno, p -cimeno, o -cimeno, canfeno, borneol e trans-cariofileno.	Sivropoulou et al., 1996. Daferera et al., 2000. Demetzos e Perdetzoglou, 2001. Burt; Reinders, 2003. Souza, 2006.

O óleo essencial de *L. nobilis* produziu atividade inibitória sobre as bactérias, onde 16 (80%) das cepas foram sensíveis na concentração de 1,25 μ L/mL, sendo considerada a CIM (Tabela 3). A cepa *P. aeruginosa* ATCC 15442 apresentou sensibilidade do produto natural na concentração de 10 μ L/mL, destacando-se das demais espécies bacterianas quanto ao comportamento biológico frente ao óleo essencial de *L. nobilis* (Tabela 2).

Ao contrário do óleo essencial de *L. nobilis*, o de *O. vulgare* apresentou atividade antibacteriana mais moderada sobre as bactérias Gram-positivos e Gram-negativos. O óleo essencial de *O. vulgare* a 10 μ L/mL inibiu o crescimento de 11 (55%) das cepas bacterianas; mas, todas as 20 (100%) foram sensíveis ao produto natural na concentração de 20 μ L/mL (Tabela 3).

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *L. nobilis* sobre espécies bacterianas, pela técnica de microdiluição.

Bactérias (n=20)	Óleo essencial de <i>L. nobilis</i> (µL/mL)							Controle
	40	20	10	5	2,5	1,25	0,63	
<i>E. corrodens</i> 23834	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> 11105	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> 8739	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> 10536	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>H. influenzae</i> 51907	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 4352	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 4362	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 9027	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 15442	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 25619	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 27853	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. aureus</i> 13150	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. aureus</i> 6538	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. aureus</i> 25923	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. aureus</i> LFB 126	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> SSI 1	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. epidermidis</i> 12228	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. pneumoniae</i> 11773	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. pyogenes</i> 19615	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>S. pyogenes</i> 8668	-	-	-	-	-	-	+	+

(-): inibição do crescimento bacteriano; (+) não inibição do crescimento bacteriano.

Pesquisadores relataram que, o óleo essencial de *O. vulgare* possui uma riqueza em compostos fenólicos, advindo daí a sua atividade antimicrobiana, a exemplo do carvacrol, um dos compostos fenólicos reconhecidamente majoritários

nesse óleo essencial e que pode, possivelmente, ser o principal responsável pela boa atividade antimicrobiana desse óleo (JULIANO et al., 2000; MARINO et al., 2001), todavia, outros autores têm sugerido que os componentes minoritários de óleos essenciais também podem exercer importante papel na atividade antibacteriana, tais como, *p*-cimeno, mirceno, *o*-cimeno, γ -terpineno, transcariofileno, limoneno, α -pineno, β -pineno, canfeno, 1,8-cineol, borneol, entre outros (MILOS et al., 2000; VALERO; SALMERÓN, 2003; MARÍN et al., 2004; BURT, 2004; CHUN et al., 2005; SOUZA, 2006).

Essas substâncias apresentam capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática microbiana provocando perda de ATP citoplasmático (LAMBERT et al., 2001) e, essa disfunção na permeabilidade está relacionada com sua capacidade de interagir com a membrana citoplasmática, podendo se dissolver na bicamada lipídica alinhando-se entre as cadeias de ácidos graxos (ULTEE et al., 2000), desestabilizando a membrana citoplasmática, aumentando sua fluidez e resultando no incremento danoso de sua permeabilidade passiva (ULTEE et al., 2002).

Os compostos fenólicos, portanto, possuem a capacidade de interagir com mecanismos essenciais para o metabolismo vital bacteriano (MARINO et al., 2001).

Compostos terpênicos são facilmente encontrados e obtidos nos óleos essenciais, pois, são suficientemente voláteis para serem destilados a vapor (MATOS et al., 1996; SOUZA, 2006).

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *O. vulgare* sobre espécies bacterianas, pela técnica de microdiluição.

Bactérias (n=20)	Óleo essencial de <i>O. vulgare</i> (µL/mL)							Controle
	40	20	10	5	2,5	1,25	0,63	
<i>E. corrodens</i> 23834	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 11105	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 8739	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 10536	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>H. influenzae</i> 51907	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 4352	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 4362	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 9027	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 15442	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 25619	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 27853	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 13150	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 6538	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 25923	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> LFB 126	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> SSI 1	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> 12228	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. pneumoniae</i> 11773	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. pyogenes</i> 19615	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>S. pyogenes</i> 8668	-	-	+	+	+	+	+	+

(-): inibição do crescimento bacteriano; (+) não inibição do crescimento bacteriano.

Das 20 cepas bacterianas ensaiadas, seis foram selecionadas para a determinação da curva de cinética bacteriana. Como critério a inclusão escolheu-se duas cepas Gram-positivas (*S. aureus*) reconhecidos agente etiológico prevalentes na EI do tipo hospitalar, pós-procedimentos invasivos ou portadores de próteses

valvares; e quatro cepas Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli*) sendo esta primeira mais presentes, notadamente, em pacientes internados, em uso de cateteres invasivos ou sob assistência ventilatória mecânica e que, em geral, são mais de evolução mais agressiva e comumente refratárias a terapêutica antimicrobiana convencional, e, dessas uma cepa do Grupo HACEK (*E. corrodens*) representando um agente etiológico oportunista e emergente (MURRAY et al., 2006).

Os resultados no presente estudo corroboram as afirmações de Ruberto et al. (2000), Pintore et al. (2002), Wilkinson et al. (2003) com relação a ação dos óleos essenciais sobre cepas de *P. aeruginosa*, todavia, mostrou valores de CIM do *O. vulgare* sobre as quatro cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 9027, ATCC 25629, ATCC 27853 e ATCC 15442), variando de 2,5 a 20 µL/mL.

Frente as quatro cepas de *S. aureus* (ATCC 13150, ATCC 6538, ATCC 25923 e LFB 126), todos os valores das CIM foram de 20 µL/mL. Já sobre cepas bacterianas de *E. coli* (ATCC 11105 e ATCC 18739) e *K. pneumoniae* (ATCC 4352 e ATCC 9027), os ensaios com o óleo essencial de *O. vulgare*, revelaram valores de CIM de 10 µL/mL para ambos os gêneros, aproximando-se dos dados de Baydar e colaboradores, em 2004, que encontraram valores de CIM entre 10 e 5 µL/mL para essas espécies de bactérias.

Nostro et al.(2004), trabalhando com óleos essencial de *O. vulgare* frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus* tipo MRSA, encontraram CIM de 1,25 µL/mL. Da mesma forma, destacados outros estudos também encontraram atividade de *O. vulgare* na inibição de bactérias patogênicas (AL-JEDAH et al., 2000; MARINO et al., 2001; SOUZA, 2007).

O fitoconstituente alfa-pineno na concentração de 40 µl/mL, inibiu o crescimento de 15 (75%) das bactérias utilizadas nos ensaios microbiológicos. Deve-se observar

que, as cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 25619 e 27853) foram resistentes até a concentração inicial de 40 µL/mL (Tabela 4).

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fitoconstituente alfa-pineno sobre espécies bacterianas pela técnica de microdiluição.

Bactérias (n=20)	Fitoconstituente alfa-pineno (µL/mL)							Controle
	40	20	10	5	2,5	1,25	0,63	
<i>E. corrodens</i> 23834	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 11105	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 8739	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. coli</i> 10536	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>H. influenzae</i> 51907	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 4352	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 4362	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 9027	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 15442	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 25619	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 27853	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 13150	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 6538	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 25923	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> LFB 126	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> SSI 1	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> 12228	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. pneumoniae</i> 11773	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. pyogenes</i> 19615	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. pyogenes</i> 8668	+	+	+	+	+	+	+	+

(-): inibição do crescimento bacteriano; (+) não inibição do crescimento bacteriano.

O fitoconstituente beta-pineno, até a concentração de 10 $\mu\text{L/mL}$, produziu inibição sobre o crescimento bacteriano, onde 13 (65%) das 20 cepas usadas nos ensaios foram sensíveis, mostrando-se mais ativo que o produto alfa-pineno. Contudo, nas duas concentrações mais superiores a 20 $\mu\text{L/mL}$ e a 40 $\mu\text{L/mL}$, o fitoconstituente beta-pineno inibiu o crescimento bacteriano numa proporção de 14 (70%) e 18 (90%) das espécies bacterianas, respectivamente, supondo-se que a sua CIM seja considerada entre essas duas concentrações (Tabela 5).

As avaliações científicas com óleos essenciais apresentam heterogeneidade no número do tamanho dos inóculos microbianos, na concentração e tipos de antimicrobianos, nos meios de cultura e emulsificantes, e nos métodos de estudo da potencialidade antimicrobiana, sendo destacado que a técnica de microdiluição tem sido muito utilizada por apresentar vantagens, tais como, facilidade de realização da técnica, economia, rápida obtenção de resultados e reprodutibilidade (BURT, 2004; SOUZA, 2006).

Na determinação da CIM do fitoconstituintes eugenol, esse produziu atividade antibacteriana, superando os resultados obtidos com o alfa-pineno e beta-pineno.

O eugenol, até a concentração de 0,63 $\mu\text{L/mL}$, produziu intensa atividade antibacteriana inibindo cerca de 16 (80%) das 20 cepas usadas nos ensaios microbiológicos. Logo na concentração superior de 1,25 $\mu\text{L/mL}$ inibiu o crescimento bacteriano das 20 cepas (100%), podendo-se determinar a CIM entre essas duas concentrações (Tabela 6).

Tabela 5 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fitoconstituente beta-pineno sobre espécies bacterianas, pela técnica de microdiluição.

Bactérias (n=20)	Fitoconstituente beta-pineno ($\mu\text{L/mL}$)							Controle
	40	20	10	5	2,5	1,25	0,63	
<i>E. corrodens</i> 23834	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 11105	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 8739	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 10536	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>H. influenzae</i> 51907	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 4352	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 4362	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 9027	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 15442	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 25619	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 27853	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 13150	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 6538	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 25923	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> LFB 126	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> SSI 1	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> 12228	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. pneumoniae</i> 11773	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. pyogenes</i> 19615	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. pyogenes</i> 8668	+	+	+	+	+	+	+	+

(-): inibição do crescimento bacteriano; (+) não inibição do crescimento bacteriano.

Vale ressaltar que a triagem feita com o fitoconstituente citral nas mesmas concentrações sobre cepas bacterianas selecionadas de interesse na pesquisa e grupo controle, mostrou que esse produto não foi capaz de inibir o crescimento em nenhuma cepa ensaiada, sendo por isso, desprezado o seu seguimento no estudo (Tabela 7).

Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fitoconstituente eugenol sobre espécies bacterianas, pela técnica de microdiluição.

Bactérias (n=20)	Fitoconstituente eugenol ($\mu\text{L/mL}$)							Controle
	40	20	10	5	2,5	1,25	0,63	
<i>E. corrodens</i> 23834	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> 11105	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i> 8739	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> 10536	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>H. influenzae</i> 51907	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>K. pneumoniae</i> 4352	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 4362	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. aeruginosa</i> 9027	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. aeruginosa</i> 15442	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. aeruginosa</i> 25619	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. aeruginosa</i> 27853	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. aureus</i> 13150	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. aureus</i> 6538	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>S. aureus</i> 25923	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. aureus</i> LFB 126	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. epidermidis</i> SSI 1	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. epidermidis</i> 12228	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. pneumoniae</i> 11773	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. pyogenes</i> 19615	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. pyogenes</i> 8668	-	-	-	-	-	-	-	+

(-): inibição do crescimento bacteriano; (+) não inibição do crescimento bacteriano.

Tabela 7: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fitoconstituente citral sobre espécies bacterianas, pela técnica de microdiluição.

Bactérias (n=20)	Fitoconstituente citral ($\mu\text{L/mL}$)							Controle
	40	20	10	5	2,5	1,25	0,63	
<i>E. corrodens</i> 23834	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 11105	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 8739	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 10536	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>H. influenzae</i> 51907	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 4352	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 4362	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 9027	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 15442	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 25619	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 27853	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 13150	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 6538	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 25923	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> LFB 126	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> SSI 1	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> 12228	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. pneumoniae</i> 11773	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. pyogenes</i> 19615	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. pyogenes</i> 8668	+	+	+	+	+	+	+	+

(-): inibição do crescimento bacteriano; (+) não inibição do crescimento bacteriano.

5.3 – Determinação da cinética de morte bacteriana

Para obtenção da curva de cinética bacteriana, foram selecionadas para o experimento as cepas bacterianas *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *S. pneumoniae* ATCC 11773, os óleos essenciais *O. vulgare* e *L. nobilis* e fitoconstituintes alfa-pineno, beta-pineno e eugenol, para avaliação do efeito da CIM na viabilidade das cepas bacterianas através da morte das mesmas.

Na determinação da curva de cinética da cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027, testada frente ao óleo essencial do *O. vulgare* (20 µL/mL) e, também, com meio isento do produto grupo-controle. No ensaio com *O. vulgare*, observou-se que, a partir da segunda hora de incubação, houve uma curva descendente na quantificação das UFC/mL de *P. aeruginosa* isolada. Esse descenso manteve-se progressivamente até as 24 horas do experimento ($p=0,0001$). O teste foi realizado com a cepa bacteriana isenta do produto, a curva de cinética teve comportamento ascendente, demonstrando, comparativamente, a ação bioativa antimicrobiana que o óleo essencial de *O. vulgare* apresentou frente à cepa de *P. aeruginosa* (Figura 19).

O resultado da curva de cinética bacteriana das cepas de *S. aureus* ATCC 6538 frente ao óleo essencial de *L. nobilis* (2,5 µL/mL), mostrou que esse produto mostrou estabilidade da curva (em forma de platô) até a 4ª hora de incubação. No entanto, a partir desse período, passou a apresentar redução parcial na viabilidade bacteriana, mantendo essa atividade até a 24ª hora, com redução no número de UFC/mL de *S. aureus* ($p=0,001$). O grupo controle apresentou comportamento estável, semelhante ao produto, em forma de platô, até a quarta hora, porém, a partir desse momento, houve ascensão progressiva na formação de UFC/mL (Figura 20).

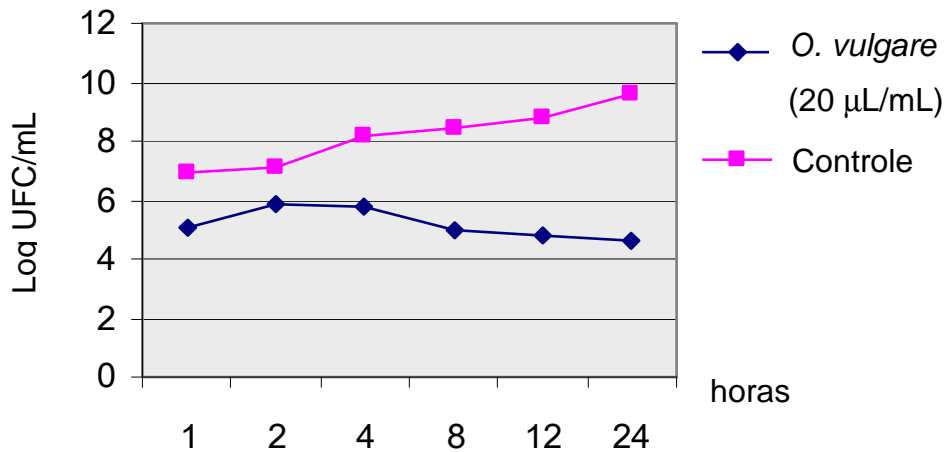


Figura 19: Viabilidade de *P. aeruginosa* ATCC 9027 sob a ação do óleo essencial de *O. vulgare* (20 µL/mL) em diferentes intervalos de tempo ($p=0,0001$).

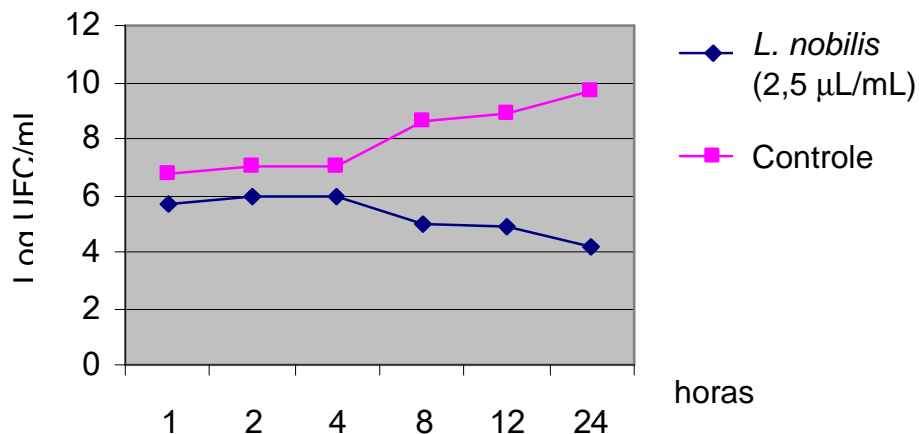


Figura 20: Viabilidade de *S. aureus* ATCC 6538 sob a ação do óleo essencial de *L. nobilis* (2,5 µL/mL) em diferentes intervalos de tempo ($p=0,001$).

Na determinação da viabilidade bacteriana da cepa da *S. pneumoniae* ATCC 11773, frente ao óleo essencial do *L. nobilis* (2,5 µL/mL), foi realizado ensaio com o mesmo, onde se verificou que, a partir da segunda hora de exposição da

cepa de *S. pneumoniae* ao produto, houve uma inibição parcial, lenta e progressiva na viabilidade bacteriana até as 24 horas de análise ($p=0,0001$). Com o grupo controle, houve um aumento progressivo no número de UFC/mL de *S. pneumoniae* (Figura 21).

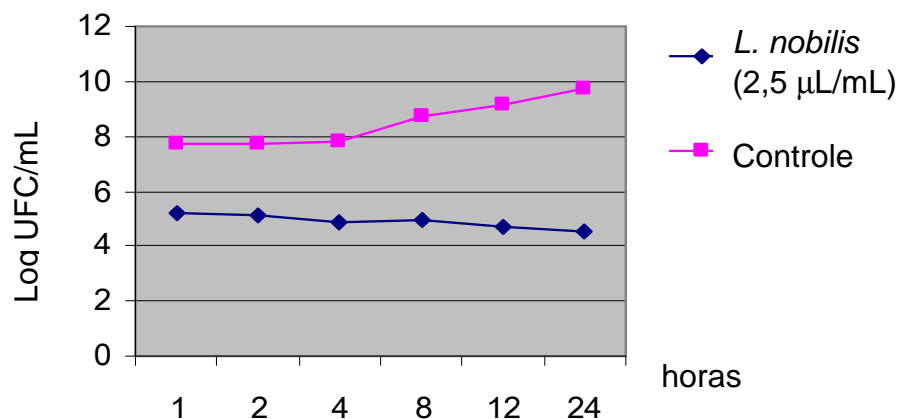


Figura 21: Viabilidade de *S. pneumoniae* ATCC 11773 sob a ação do óleo essencial de *L. nobilis* (2,5 µL/mL) em diferentes intervalos de tempo ($p=0,0001$).

Foram realizados testes com os fitoconstituintes alfa-pineno (20 µL/mL), beta-pineno (20 µL/mL) e eugenol (10 µL/mL) sobre cepas de *S. aureus* ATCC 6538 para determinar a curva de cinética de morte bacteriana e, portanto, analisar a viabilidade da cepa bacteriana em estudo.

Na análise da curva de cinética bacteriana com *S. aureus* ATCC 6538 frente o fitoconstituente alfa-pineno (20 µL/mL), verificou-se que, após a quarta hora de incubação, esse fitoconstituente passou a apresentar ação inibitória sobre a cepa, de forma progressiva e inibiu completamente a formação das colônias de *S. aureus* nas 24 horas do experimento ($p=0,008$) (Figura 22).

O fitoconstituente beta-pineno (20 μ L/mL) sobre a cepa do *S. aureus* ATCC 6538, mostrou ação bioativa antibacteriana após a segunda hora de incubação, continuando a inibir progressivamente a formação de colônias até a oitava hora. E, a partir desse momento, inibiu completamente a viabilidade da cepa de *S. aureus*, conforme está expresso na curva de cinética bacteriana ($p=0,001$) (Figura 23).

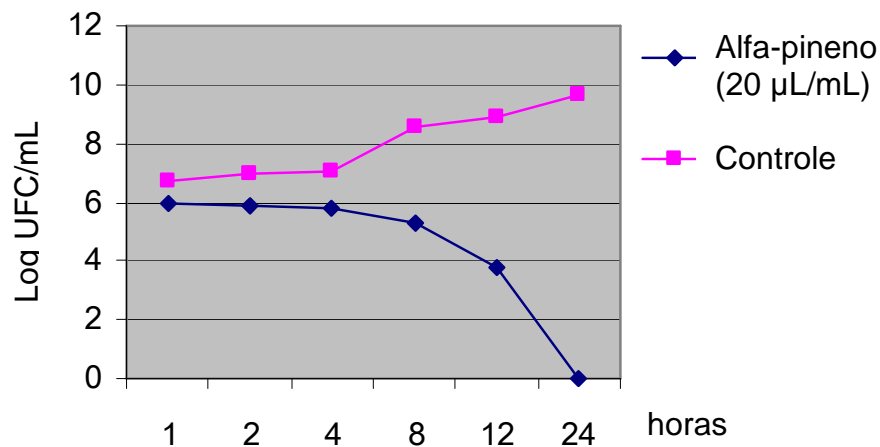


Figura 22: Viabilidade de *S. aureus* ATCC 6538 sob a ação do fitoconstituente alfa-pineno (20 μ L/mL) em diferentes intervalos de tempo ($p=0,008$).

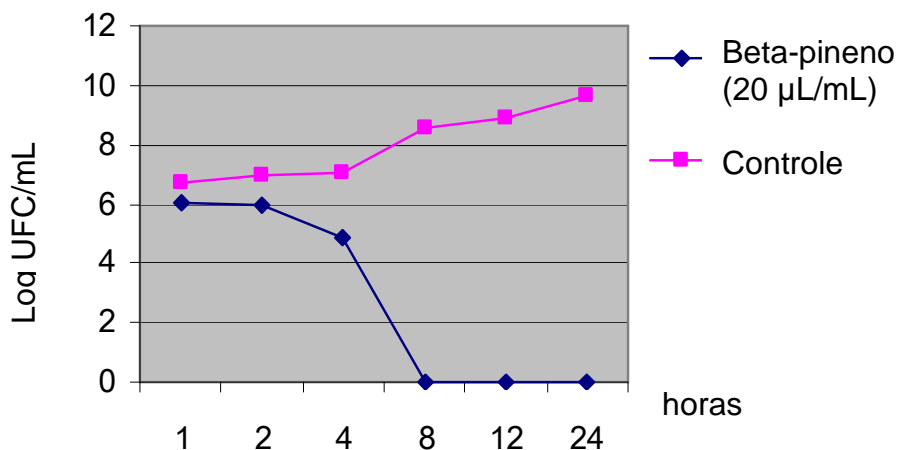


Figura 23: Viabilidade de *S. aureus* ATCC 6538 sob a ação do fitoconstituente beta-pineno (20 μ L/mL) em diferentes intervalos de tempo ($p=0,001$).

Observando o comportamento da viabilidade bacteriana da cepa do *S. aureus* ATCC 6538 sobre o eugenol, na concentração de 10 μ L/mL, verificou-se que, após a segunda hora, houve diminuição progressiva na curva de cinética da formação de colônias bacterianas. E, a partir da quarta hora, ocorreu total inibição dessa viabilidade, permanecendo nula até as 24 horas de análise do experimento.

Ao passo que, com o grupo controle o resultado mostrou progressão lenta, porém, ascendente até a avaliação das primeiras quatro horas. Todavia, a partir dessa fase, a curva de cinética bacteriana apresentou comportamento ascendente e progressivo na multiplicação dessa cepa ($p=0,0001$) (Figura 24).

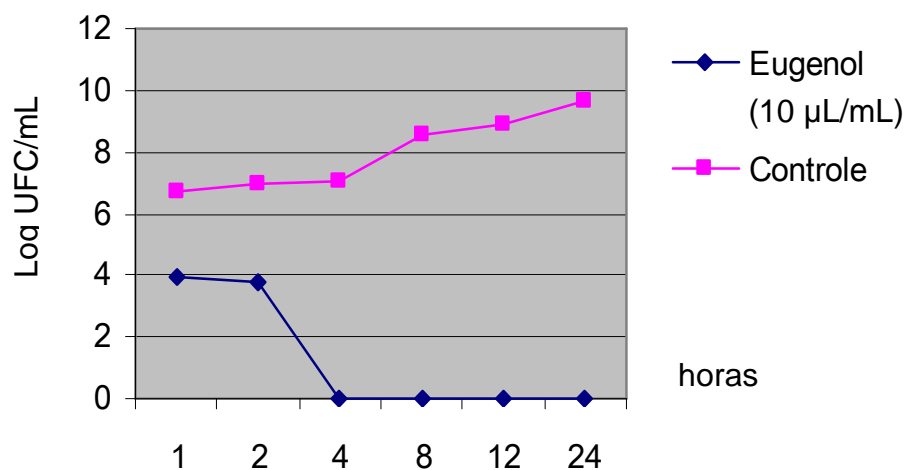


Figura 24: Viabilidade de *S. aureus* ATCC 6538 sob a ação do fitoconstituente eugenol (10 μ L/mL) em diferentes intervalos de tempo ($p=0,0001$).

Nos ensaios de determinação da cinética bacteriana realizados foram evidenciadas respostas satisfatórias por valores de UFC/mL sempre menores daqueles observados no experimento controle e escolhidos como significância estatística de 5% ($p<0,05$).

Todas as cepas bacterianas incluídas nos ensaios de atividade antimicrobiana não apresentaram sensibilidade ao Tween 80, e além do mais, foram capazes de crescer em ágar nutriente sem adição do óleo essencial, mas, ao contrário, as espécies bacterianas mostraram inviabilidade de crescimento, quando cultivadas no meio de cultura em presença de óleos essenciais e fitoconstituintes em suas concentrações mais elevadas, caracterizando a atividade desses óleos essenciais e fitoconstituintes testados.

Na análise da viabilidade bacteriana, os fitoconstituintes eugenol, beta-pineno e alfa-pineno apresentaram resultados de atividades antibacterianas mais efetivos, em comparação com os óleos essenciais de *L. nobilis* e *O. vulgare*.

Os resultados deste trabalho vem confirmar, aqueles já registrados na literatura científica, quanto as relevantes propriedades farmacológicas dos óleos essenciais, entre elas, a atividade antimicrobiana (CRAVEIRO et al., 1981; TORÓ SANTA MARIA et al., 1993; JULIANO et al., 2000, UCHIYAMA et al., 2002; LIMA, 2002; ISCAN et al., 2002; VILJOEN et al., 2003; BURT, 2004; WANNISSORN et al., 2005; SACCHETTI et al., 2005; KABOUCHE et al., 2005; SOUZA et al., 2005; LIMA et al., 2005; WALDSTEIN, 2006; VIDAL et al., 2007; DELAMARE et al., 2007; CELIKTAS et al., 2007; NEGAHBAN et al., 2007).

5.4 – Ensaio toxicológicos

5.4.1 – Toxicidade dos óleos essenciais e fitoconstituintes selecionados frente à *Artemia salina*.

A metodologia utilizada foi a descrita por McLaughlin e Rogers (1998), e considerou-se como produtos bioativos tóxicos todos àqueles apresentaram valores de CL_{50} menores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ e não-tóxicos aqueles com $CL_{50} \geq 1000 \mu\text{g/mL}$ (MEYER et al., 1982; MCLAUGHIN; ROGERS, 1998; LOPES et al., 2002). Para tal, foi utilizado o método estatístico de Probitos via software microcal Origin 6.0, com nível de significância 5% ($p < 0,05$) e índice de confiabilidade de 95%.

Todos os bioensaios de toxicidade realizados com os óleos essenciais de *L. nobilis* e *O. vulgare*, bem como, os fitoconstituintes alfa-pineno e eugenol frente à *A. salina* foram considerados altamente bioativos, já que apresentaram valores de CL_{50} abaixo de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Os óleos essenciais “in natura” de *L. nobilis* e *O. vulgare* testados na concentração de 2 mg/mL apresentaram CL_{50} de 89,88 $\mu\text{g/mL}$ e 14,91 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. E os fitoconstituintes alfa-pineno e eugenol, experimentados no mesmo modelo metodológico descrito, apresentaram CL_{50} de 9,59 $\mu\text{g/mL}$ e 47,16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8: Atividade moluscicida de óleos essenciais e fitoconstituintes utilizando o teste de letalidade para *A. salina* L. (resultados expressos com valor médio de CL_{50}).

Óleos essenciais	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>L. nobilis</i>	89,88
<i>O. vulgare</i>	14,91
Fitoconstituintes	
Alfa-pineno	9,59
Eugenol	47,16

Experimentos feitos com timol expressaram atividade toxicológica sobre *A. salina* com CL_{50} de 514 $\mu\text{g/mL}$ (MEYER et al., 1982), bem como o lapachol (CL_{50} de 68,09 $\mu\text{g/mL}$) (PIMENTA et al., 2003). Compostos triterpenóides isoladas de plantas do gênero *Euphorbia* não foram tão tóxicas para *A. salina*, ao passo que, os ensaios com diterpenóides apresentaram significativa toxicidade (SANTOS et al., 2007).

Extratos de folhas de *E. uniflora*, família Myrtaceae, não foram bioativos contra *A. salina* e *Biomphalaria glabrata* (ALVES et al., 2000), sendo corroborado por MONTANHER e colaboradores, em 2002 ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$). Já em espécies de carqueja, onde se isolou triterpenóides (ácido oleanólico) constatou-se expressiva citotoxicidade (CL_{50} de 72 $\mu\text{g/mL}$) (MONTANHER et al., 2002).

Pesquisa com plantas ricas em flavonóides (*Deschapsias antarctica*) foram consideradas com grande citotoxicidade sobre *A. salina* com $CL_{50} = 7,0 \mu\text{g/mL}$ (CUADRA et al., 2005) e, de forma similar com plantas ricas em alcalóides (CL_{50} 0,13-28,5 $\mu\text{g/mL}$) e lapachol (CL_{50} de 68,09 $\mu\text{g/mL}$) (PIMENTA et al., 2003). Plantas indianas contendo sesquiterpenóides, triterpenóides, esteróides, taninos e alcalóides mostrou toxicidades frente a *A. salina* (CL_{50} de 6,9 a 579 $\mu\text{g/mL}$) (PADMAJA et al., 2002).

Corroborando os nossos resultados de toxicidade com os fitoconstituintes, estudos clínicos randomizados com óleo essencial das folhas de *Lippia multiflora* (Verbenaceae), demonstraram atividades pediculocida e escabicida, ressaltando que o alfa-pineno e beta-pineno foram os principais fitoconstituintes isolados (OLADIMEJI et al., 2000). Além do mais, atividades antimalária e anti-sépticas foram encontradas na *L. multiflora*, a qual havia mostrado importante citotoxicidade frente a *A. salina* ($CL_{50} = 1,1 \mu\text{g/mL}$) (AJAIYEGBA et al., 2006).

O potencial tóxico de um produto natural com bioatividade deve ser um dos primeiros parâmetros a ser analisado, visando possibilidade de desenvolvimento e emprego com segurança de terapêutica alternativa antimicrobiana (RUIZ et al., 2005). Do ponto de vista prático, essa metodologia utilizada tem sido empregada, fundamentalmente, nos ensaios de triagem de toxicidade preliminar de extratos, frações ou fitoconstituintes (PELKA et al., 2000; LHULLIER et al., 2006).

5.4.2 – Embriotoxicidade dos óleos essenciais sobre as larvas de *Aedes aegypti*.

Os óleos essenciais de *C. aromaticus* e *O. vulgare* apresentaram uma taxa de mortalidade de 100% das larvas de *A. aegypti* em todas as concentrações ensaiadas. A mortalidade ocorreu em um curto período de 24 horas, tornando inviável a observação do desenvolvimento das larvas além desse período (Tabela 9). A rápida e elevada mortalidade ocorreu provavelmente pela interferência do óleo essencial na síntese e/ou na reabsorção da quitina, não sendo uma intoxicação direta das larvas (SILVA et al., 1998).

Nos ensaios com os óleos essenciais de *R. officinalis* e *M. piperita* foi observada uma inibição no desenvolvimento das larvas no período de 24 a 72 horas, onde as mesmas permaneceram na forma de estágio L1. O óleo essencial de *R. officinalis* quando ensaiado na concentração de 0,2 µg/mL apresentou 100% de inibição de formas viáveis, enquanto o óleo essencial de *M. piperita* na mesma concentração apresentou uma inibição de 40%. Na diluição de 0,4 µg/mL, *M.*

piperita e *R. officinalis* apresentaram, respectivamente, inibição de desenvolvimento de 70% e 80%. Ambos os óleos essenciais apresentam uma inibição de 100% da viabilidade das larvas de *A. aegypti* quando ensaiados na concentração de 0,8 µg/mL. O ensaio controle com DMSO apresentou desenvolvimento até a forma de larvas L2 no período de 24 horas, mostrando 60% de formas viáveis de desenvolvimento (Tabela 9).

Tabela 9: Atividade larvicida de óleos essenciais de plantas medicinais sobre larvas de *A. aegypti* (resultados expressos como percentual de formas viáveis das larvas).

Óleos essenciais	Concentrações (µg/mL)			Controle	
	0,2	0,4	0,8	DMSO*	Água
<i>C. aromaticus</i>	0	0	0	60	60
<i>M. piperita</i>	60	30	0	60	60
<i>O. vulgare</i>	0	0	0	60	60
<i>R. officinalis</i>	100	20	0	60	60

* DMSO: Dimetilsulfóxido

Nossos resultados estão em concordância com aqueles previamente determinados por Luna et al. (2005), com extratos de plantas brasileiras como *E. uniflora*, *Ziziphus joazeiro* (Juá), *Caesalpinia echinata* (Pau-Brasil) e *Operculina macrocarpa* (Batata-de-purga), os quais concluíram que houve correlação entre toxicidade moluscicida para *A. salina* e atividade larvicida para *A. aegypti*.

Erler et al. (2006), trabalhando com óleos essenciais de *M. piperita*, *E.globulus*, *P. anisum* e *Ocimum basilicum*, demonstraram efeitos repelentes contra

o *Culex pipens* (filariose) e reportaram que fitoconstituintes derivados de plantas podem ser úteis no controle de doenças causadas por vetores.

Luna et al. (2005), buscando bioatividade contra as larvas do *A. aegypti*, estudou 23 extratos de plantas medicinais e encontrou atividade larvicida do mosquito de modo significativo em oito ensaios ($\geq 40\%$ de mortalidade), a exemplo dos extratos das folhas de *Annona muricata* (cruaça ou jaca do Pará), do caule *Bauhinia cheilantha* (mororó), de *Operculina macrocarpa* (batata-de-purga), das sementes de *Spondias mombin* (cajá), folhas de *Caesalpinia echinata* (pau-Brasil) e de *Eugenia uniflora* (pitanga). Baixa toxicidade pode ser considerada uma característica importante para utilização de produtos naturais derivados de vegetais no controle de ambientes naturais (RUIZ et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

Os dados apresentados, com relação a bioatividade dos óleos essenciais e fitoconstituintes, reforçam a importância dos produtos naturais como fonte potencial para novos fármacos. Compostos bioativos são quase sempre tóxicos em altas doses, e por isso, testes de toxicidade em um organismo animal menos complexo deve ser usado, preliminarmente, no seu monitoramento (LHULLIER et al., 2006). Diante da confirmação da atividade embriotóxica “*in vitro*” dos óleos essenciais testados sobre *A. aegypti*, e considerando a importância da dengue como um problema de saúde pública, os resultados preliminares de toxicidade obtidos nestes experimentos são promissores.

A confirmação da efetiva atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *L. nobilis* e dos fitoconstituintes alfa-pineno, beta-pineno e eugenol como agentes antibacterianos, com potencial capacidade da sua utilização alternativa na terapêutica das doenças infecciosas, vem ao encontro do anseio da própria legislação específica, a qual regulamenta padrões no desenvolvimento de produtos

terapêuticos naturais com segurança. Esses resultados são promissores, no entanto, estudos mais específicos dessa natureza devem ser realizados antes da aplicação desses óleos essenciais ou de seus fitoconstituintes com fins medicinais.

Considerando a bioatividade dos produtos testados e com ênfase no estabelecimento da segurança, os resultados ora apresentados tornam-se úteis para direcionar futuros ensaios toxicológicos pré-clínicos e clínicos.

CONCLUSÃO

6 – CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de atividade biológica dos óleos essenciais “in natura” de *A. vera*, *C. aromaticus*, *E. globulus*, *E. uniflora*, *L. nobilis*, *M. officinalis*, *M. piperita*, *O. basilicum*, *O. vulgare*, *P. anisum*, *R. officinalis* e fitoconstituintes citral, eugenol, alfa-pineno e beta-pineno frente as cepas bacterianas de importância na etiologia da Endocardite Infecçiosa, pode-se concluir que :

1 – Na triagem para a avaliação da atividade biológica dos óleos essenciais, os de *L. nobilis* e *O. vulgare* se destacaram dos demais, por produzirem maior abrangência de inibição sobre o crescimento das espécies bacterianas testadas;

2 – O óleo essencial de *L. nobilis*, a 1,25 µL/mL, apresentou atividade antibacteriana, inibindo 80% das cepas bacterianas;

3 – O óleo essencial de *O. vulgare*, a 20 µL/mL, mostrou inibição sobre 100% das espécies bacterianas ensaiadas;

4 – A espécie bacteriana de *E. coli* ATCC 8739 foi sensível a todos os óleos essenciais experimentados, com exceção de *E. uniflora*;

5 – Os fitoconstituintes eugenol, alfa-pineno e beta pineno mostraram efetividade na curva de morte bacteriana frente a *S. aureus* (ATCC 6538);

6 – Todas as espécies bacterianas testadas apresentaram-se resistentes ao fitoconstituente citral;

7 – *P. aeruginosa* ATCC 25619 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 mostraram-se resistentes a Penicilina G Cristalina;

8 – Todas as cepas bacterianas selecionadas foram sensíveis a Gentamicina;

9 – Nos ensaios toxicológicos com *A. salina*, os óleos essenciais *L. nobilis* e *O. vulgare*, e os fitoconstituintes alfa-pineno e eugenol mostraram bioatividade;

10 – Os óleos essenciais *O. vulgare*, *C. aromaticus*, *R. officinalis* e *M. piperita* apresentaram atividades embriotóxicas frente as larvas de *A. aegypti*, com maior destaque para *O. vulgare* e *C. aromaticus*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADEBAJO, A.C.; OLOKE, K.J.; ALADAMNI, A.J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. **Fitoterapia**, v.60, n.5, p.451-455, 1989.

ABRAHAM, J., MANSOUR, C., VELEDAR, E., KHAN, B., LERAKIS, S. *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis: the Grady Memorial Hospital experience with methicillin-sensitive *S aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia. **American Heart Journal**, v.147, n.3, p.536-539, 2004.

AJAIYEGBA, E.O.; ABIODUN, O.O.; FALADE, M.O.; OGBOLE, N.O.; ASHIDI, J.S.; HAPPI, C.T.; AKINBOYE, D.O. In vitro cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. **Phytomedicine**, v.13, p.295–298, 2006.

AKO J., IKARI, Y., HATORI, M. Changing spectrum of infective endocarditis – Review of 194 episodes over 20 years – **Circulation Journal**, v. 67, n.1, p.3-7, 2003.

ALLEGRIANI, J.; BUOCHBERG, M.S.; MAILLOS, H. Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et application en microbiologie. **Travaux Societe de Pharmacie de Montpellier**, v.33, n.1, p.86-92, 1973.

ALIGIANS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.9, p.4168-4170, 2001.

AL-JEDAH, J.H.; ALI, M.Z; ROBINSON, R.K. The inhibitory action of spices against pathogens that might be capable of growth in a fish sauce (mehiawah) from the Middle East. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, n.1/2, p.129-133, 2000.

ALMEIDA, E.R. **Plantas Mediciniais Brasileiras – Conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus editora Ltda, p.59-117, 1993.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA-JUNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n3, p.367–373, 2000.

ANGUERA, I., MIRO, J.M., CABELL, C.H. Clinical Characteristics and Outcome of Aortic Endocarditis With Periannular Abscess in the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. **The American Journal of Cardiology**. v.96, n.7, p.976-981, 2005.

ARRAS, G.; GRELLA, G.E. Wild thyme, *Thymus capitatus*, essential oil seasonal changes and antimycotic activity. **Journal of Horticultural Science**, v.67, n.2, p.197-202, 1992.

BADDOUR, L.M.; WILSON, W.R.; BAYER, A.S.; FOWLER-JR, V.G.; BOLGER, A.F.; LEVISON, M.E.; FERRIERI, P.; GERBER, M.A.; TANI, L.Y.; GEWITZ, M.H. et al. Infective Endocarditis: Diagnosis, Antimicrobial Therapy and Management of Complications - A Statement for Healthcare Professionals From the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association. **Circulation**, v.111, p.394-434, 2005.

BARROS, M.A.V.; AMORIM, I.; OLIVEIRA, B.B.; MAIA, R.A.R.; CANDIDO, Z.P.; MEDEIROS, F.A.; ARRUDA-JR, E.R.; DANTAS, T.S. Estudo prospectivo de Endocardite Infecçiosa em Hospital Universitário. **Arquivos Brasileiros de Cardiol**, v.17, n.1, p.78, 2006.

BASHORE, T.M.; CABELL, C; FOWLER JR, V. Update on Infective Endocarditis. **Current Problems in Cardiology**. v.31, n.4, p.274-352, 2006.

BAUER, K., GARBE, D., SURBURG, H. Common Fragrance and Flavor materials: Preparation, Properties and Uses. **Wiley-VCH**, Weinheim, p.293, 2001.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; OZKAN, G.; KARADOGAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v.15, n.3, p.169-172, 2004.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.37, n.2, p.263-268, 2004.

BEOVIC, B. The issue of antimicrobial resistance in human medicine – Review. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, p.280–287, 2006.

BLEASEL, N.; TATE, B., Rademaker, M. Allergic contact dermatitis following exposure to essential oils. **Australasian Journal of Dermatology**, v.43, n.3, p.211–213, 2002.

BONOW, R.O. CARABELLO, B. LEON JR, A.C.; EDMUNDS JR, L.H.; FEDDERLY, B.J.; FREED, M.D.; GAASCH, W.H.; MCKAY, C.R.; NISHIMURA, R.A.; O'GARA, P.T.; O'ROURKE, R.A.; RAHIMTOOLA, S.H.; RITCHIE, J.L.; CHEITLIN, M.D. et al. Guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology / American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on management of patients with valvular heart disease). **Circulation**, v.98, n.18, p.1949-1984, 1998.

BONSIGNORE, L.; LOY, G.; LOGU, A.; PALMIERI, G.A. Preliminary microbiological screening of sauculinian plants. **Fitoterapia**, v.61, n.4, p.339-341, 1990.

BOYLE, W. Spices and essential oils as preservatives. **The American Perfumer and Essential Oil** - Review, v.66, p.25–28, 1955.

BRULL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, n.1-2, p.1-17, 1999.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, n.3, p.162-167, 2003.

CABELL C.H.; JOLLIS, J.G.; PETERSON, G.E.; COREY, G.R.; ANDERSON, D.J.; SEXTON, D.J.; WOODS, C.W.; RELLER, L.B.; RYAN, T.; FOWLER JR, V.G. Changing patient characteristics and the effect on mortality in endocarditis. **Archives of Internal Medicine**, v.162, p.90-94, 2002.

CACOUB, P.; LEPRINCE, P.; NATAF, P.; HAUSFATER, P.; DORENT, R.; WECHSLER, B.; BORS, V.; PAVIE, A.; PIETTE, J.C.; GANDJBAKHCH, I.

Pacemaker infective endocarditis. **American Journal of Cardiology**, v.15, n.82(4), p.480-484, 1998.

CALDWELL, G.S.; BENTLEY, M.G.; OLIVE, P.J.W. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. **Toxicon**, v.42, p.301-306, 2003.

CAMPBELL, W. N.; TSAI, W.; MISPIRETA, L. A. Evaluation of the practice of routine culturing of native valves during valve replacement surgery. **The Annals of Thoracic Surgery**. v.69, n.2, p.548-550, 2000.

CANILLAC, N.; MOUREY, A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**, v.8, p.261-268, 2001.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. Broth microdilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Microbios**, v.82, p.181-185, 1995.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. 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, n.6, p.1914-1920, 2002.

CELIK TAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus o.cinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v.100, p.553-559, 2007.

CERVATO, C.; CARABELLI, M.; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CESTARO, B. Antioxidant properties of Oregano (*Origanum vulgare*) leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**, v.24, n.6, p.453-465, 2000.

CHALCHAT, J.C.; GARRRY, R.P.; BASTIDE, P. et al. Correlations composition chimique. Activé antimicrobienne: V-Contribution à la comparaison de 2 méthodes de détermination des CMI. **Plantes médicinales et phytothérapie**, v.25, n.4, p.184-193, 1999.

CHAMBERS HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Disease**. v.7, n.2, p.178-182, 2001.

CHAMPS, N.S.; FAGUNDES, T.C.; MELO, L.J.; RODRIGUES, H.L.; ACÚRCIO, F.A.; COSTA, P.R.; BRANDÃO, M.G.L. Plants used to treat wounds by patients of the public hospital of Betim (MG). **Revista Médica de Minas gerais**, v.13, n.3, p.173-178, 2003.

CHANG, S.; SIEVERT, D.M.; HAGEMAN, J.C.; BOULTON, M.L.; TENOVER, F.C.; DOWNES, F.P.; SHAH, S.; RUDRIK, J.T.; PUPP, G.R.; BROWN, W.J.; CARDO, D.; FRIDKIN, S.K. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. **New England Journal of Medicine**, v.348, p.1342–1347, 2003.

CHAURASIA, S.C.; VYAS, K.K. *In vitro* effect of some volatile oil against *Phytophthora parasitica* var. *piperina*. **Journal of Research in Indian Medicine Yoga and Homeopath**, p.24-26, 1977.

CHUN, S.S.; VATTEM, A.V.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Procces Biochemistry**, v.40, n.2, p. 809-816, 2005.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3 ed. Baltimore: Willians & Wilkins, p.739-788, 1991.

CONFORTI, F.; STATTI, G.; UZUNOV, D.; MENICHINI, F. Comparative Chemical Composition and Antioxidant Activities of Wild and Cultivated *Laurus nobilis* L. Leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.10, p.2056-2064, 2006.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C.I.G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.130-135, 1999.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTON, J.R.; WYLLIE, S.G. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.170-175, 2000.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S. ; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. **Óleos essenciais de Plantas do Nordeste**. Fortaleza, ed. UFC, p.209-210, 1981.

CROSTHWAITE, D. UK trade within the flavour and fragrance industry. International Federation of Essential Oils and Aroma Trades — **21st International Conference on Essential Oils and Aroma's**. IFEAT, London, 1998, p.6 –12.

CUADRA, P.; FURRIANCA, M.; OYARZÚN, A.; YÁÑEZ, E.; GALLARDO, A.; FAJARDO, V. Biological activity of some Patagonian plants. **Fitoterapia**, v.76, p.718-721, 2005.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2576-2581, 2000.

_____. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. **Crop Protection**, v.2, n.1, p.39-44, 2003.

DAVIDSON, P.M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. (Eds.), **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. ASM, Washington, p.520–556, 1997.

DE CASTRO, A.F.P. Haemophilus e bactérias relacionadas. In: MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**, Rio de Janeiro, 5^a.edição, editora Elsevier, cap.35, 2006.

DEANS, S.G.; RITCHIE, G.. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v.5, p.165-180, 1987.

DELLAQUIS, P.J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of *dill*, *cilantro*, *coriander* and *eucalyptus* essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, p.101-109, 2002.

DELAMARE, A.P.L.; MOSCHEN-PISTORELLO, I.T.; ARTICO, L.; ATTI-SERANI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia o.cinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v.100, p.603-608, 2007.

DEMETZOS, C.; PERDETZOGLU, D.K. Composition and antimicrobial studies of the oils of *Origanum calcaratum* Juss. and *O. scabrum* Boiss. et Heldr. from Greece. **Journal of Essential Oil Research**, v.13, p.460-462, 2001.

DENYER, S.P., HUGO, W.B. Mechanisms of antibacterial action - A summary. In: _____ (Eds.) **Mechanisms of Action of Chemical Biocides**, Blackwell, Oxford, p.331-334, 1991.

DIEKEMA, D.J.; BEACH, M.L.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N. SENTRY Participants Group. Antimicrobial resistance in *viridans* group *streptococci* among patients with and without the diagnosis of cancer in the USA, Canada, and Latin America. **Clinical Microbiology and Infection**, v.7, n.3, p.152-157, 2001.

DIP, E.C.; PEREIRA, N.A.; FERNANDES, P.D. Ability of eugenol to reduce tongue edema induced by *Dieffenbachia picta* Schott in mice. **Toxicon**, v.43, p.729-735, 2004.

DURACK, D.T.; LUKES, A.S.; BRIGHT, D.K. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service. **American Journal of Medicine**, v.96, n.3, p.:200-209, 1994.

ERLER, F.; ULUG, I.; YALCINKAYA, B. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipens*. **Fitoterapia**, v.77, p.491-494, 2006.

FABRI JR, J.; ISSA, V.S.; POMERANTZEFF, P.M.A.; GRINBERG, M.; PEREIRA-BARRETO, A.C.; MANSUR, A.J. Time-related distribution, risk factors and prognostic influence of embolism in patients with left-sided infective endocarditis. **International Journal of Cardiology**, v.110, n.3, p.334-339, 2006.

FALEIRO, M.L.; MIGUEL, M.G.; LADEIRO, F.; VENANCIO, F.; TAVARES, R.; BRITO, J.C.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, n.1, p.35-40, 2003.

FARAG, R.S.; DAW, Z.Y.; HEWEDI, F.M.; EI-BAROTY, G.S.A. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. **Journal of Food Protection**, v.52, n.9, p.665-667, 1989.

FEBRER, F.J.L.; ROSELLÓ, G.B.; DOBÓN, M.G.; ESTRADA, F.G.; ARIZO, G.C.; LÓPEZ-BUENO, J.A.; PI, A.S. Inventario de las plantas medicinales de uso popular en la ciudad de Valencia. **Medicina y Ciencias Sociales**, n.13, 2001.

FERNICOLA, D.J.; ROBERTS, W.C. Clinicopathologic features of active infective endocarditis isolated to the native mitral valve. **The American Journal of Cardiology**. v.71, n.13, p.1186-1197, 1993.

FERREIROS, E.; NACINOVICH, F.; CASABÉ, J.H.; MODENESI, J.; SWIESZKOWSKI, S.; CORTES, C.; HERNAN, C.; KAZELIAN, L.; VARINI, S. Epidemiologic, clinical and microbiologic profile of infective endocarditis in Argentina: A national survey. The Endocarditis Infecciosa en la República Argentina-2 (EIRA-2) Study. **American Heart Journal**, v.151, n.2, p.545-552, 2006.

FOREY, P.; LINDSAY, R. **Plantas medicinais**. Guia prático para identificar facilmente 150 plantas medicinais. Plátano Edições Técnicas, Lisboa, 126p, 1996.

FUNASA 2003. **Fundação Nacional de Saude - Ministério da Saúde**. www.funasa.gov.br/dengue/29/10/2003.

FUNDAÇÃO DALMO GIACONETTI. **Ervas, condimentarias e especiarias**. Nobel, São Paulo, Brasil, p.158, 1989.

GAYOSO, C.W. **Onicomiose: estudo clínico-laboratorial e susceptibilidade de seus agentes etiológicos a produtos naturais e sintéticos**. Tese de doutorado, LTF/CCS, Universidade Federal da Paraíba LTF, João Pessoa - PB, 2004, 167p.

GIAMARELLOU, H. Nosocomial cardiac infections. **Journal of Hospital Infection**, v.50, n.2, p.91-105, 2002.

GORDON, K.A.; BEACH, M.L.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N.; RHOMBERG, P.R.; MUTNICK, A.H. Antimicrobial susceptibility patterns of *_*-hemolytic and *viridans* group streptococci: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.43, n.2, p.157-162, 2002.

GUENTHER, E. The Essential Oils. **D. Van Nostrand**, New York, 427.p, 1948.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: SIMÕES, C.M.A.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª edição, Editoras UFGRS/UFSC, cap.13, 13-28.p, 2003.

GUSTAFSON, J.E.; LIEW, Y.C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; WYLLIE, S.G.; WARMINGTON, J.R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.194-198, 1998.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v.11, n.3, p.137-147, 2000.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.985-990, 1999.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; WRIGHT, A.V. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3590–3595, 1998

HELLINGER, W. Confronting the problem of increasing antibiotic resistance. **Mayo Clinical Medicine**, v.93, n.9, p.842-848, 2000.

HERNANDEZ, T.; CANALES, M.; AVILA, J.G.; DURAN, A.; CABALLERO, A.; ROMO DE VIVAR, A.; LIRA, R. Ethnobotany and antibacterial activity of some medicinal plants used in traditional medicine of Zapolitán de las Salinas, Puebla (México). **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.2-3, p.181-188, 2003.

HERRERA, T.I.; ONO, E.O.; LEAL, F.P. Efeitos de auxina e boro no enraizamento adventício de estacas caulinares de louro (*Laurus nobilis* L.) **Biotemas**, v.17, n.1, p.65 – 77, 2004.

HIRAMATSU, K. ; HANAKI, H. ; INO, T. ; YABUTA, K. ; OGURI, T. ; TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.40, p.135–136, 1997.

HSIEH, P.C.; MAU, J.L.; HUANG, S.H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**, v.18, n.1, p.35-43, 2001.

IOANNIDOU, S.; TASSIOS, P.T.; KOTSOUILI-TSELENI, A.; FOUSTOUKOU, M.; LEGAKIS, N.J.; VATOPOULUS, A. Antibiotic resistance rates and macrolide resistance phenotypes of *viridans* group *streptococci* from the oropharynx of healthy Greek children. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, n.3, p.195–201, 2001.

ISCAN, G.; KIRIMER, N.; KURKCUOGLU, M.; BASER, K.H.C.; DEMIRCI, F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3943-3946, 2002.

ISHIWADA, N., NIWA, K., TATENO, S., YOSHINAGA, M.; TERAI, M.; NAKAZAWA, M. Causative organism influences clinical profile and outcome of infective endocarditis in pediatric patients and adults with congenital heart disease. **Circulation Journal**, v.69, p.1266-1270, 2005.

ISSA, V.S.; FABRI Jr, J.; POMERANTZEFF, P.M.A., GRINBERG, M.; PEREIRA-BARRETO, A.C.; MANSUR, A.J. Duration of symptoms in patients with infective endocarditis. **International Journal of Cardiology**, v.89, n.1, p.63-70, 2003.

JERKOVIC, I.; MASTELIC, J.; MILOS, M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. **International Journal of Food Science & Technology**, v.36, p.649–654, 2001.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spices oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection**, v.65, n.4, p.638-687, 2002.

JULIANO, C.; MATTANA, A.; USAI, M. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. **Journal of Essential Oil Research**, v.12, p.516–522, 2000

KABOUCHE, Z.; BOUTAGHANE, N.; LAGGOUNE, S.; KABOUCHE, A.; AIT-KAKI, Z.; BENLABED, K. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. **The International Journal of Aromatherapy**, v.15, p.129–133, 2005.

KARCHMER, A.W. Infective endocarditis. In: ZIPES, D.P.; LIBBY, P.; BONOW, R.O.; BRAUNWALD, E. **Braunwald's Heart Disease: a Textbook of Cardiovascular Medicine**, 7th edition, chapter.58, 1633-1658.p, 2006.

KNOBLOCH, K.; WEIGAND, H.; WEIS, N.; SCHWARM, H.M.; VIGENSCHOW, H. Action of terpenoids on energy metabolism. In: Brunke, E.J. (Ed.), **Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils**. De Gruyter, Berlin, p.429-445, 1986.

KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; DARDIOTI, A.; KRIGAS, N.; LANARAS, T. Autumn essential oils of Greek oregano. **Phytochemistry**, v.44, n.5, p.883–886, 1997.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.453–462, 2001.

LANCIOTTI, R.; GIANOTTI, A.; PATRIGNANI, N.; BELLETI, N.; GUERZONI, M.E.; GARDINI, F. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life of minimally processed fruits. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, n.3-4, p.201-208, 2004.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. Rio de Janeiro: Editora Record, 1992.

LAWRENCE, B.M. The botanical and chemical aspects of oregano. **Perfumer & Flavorist**, v.9, p.41-51, 1984.

LEFORT, A.; MAINARDI, J.L.; CHRISTINE, S.S.; CASASSUS, P.; GIULLEVIN, L.; LORTHOLARY, O.; The pneumococcal endocarditis study group. *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in adults. A multicenter study in France in the era of penicillin resistance 1991 – 1998. **Medicine (Baltimore)**, v.79, n.5, p.327-337, 2000.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.158-163, 2006.

LI, J.S.; SEXTON, D.J.; MICK, N.; NETTLES, R.; FOWLER, V.G.; RYAN, T.; BASHORE, T.; COREY, R. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. **Clinical Infectious Disease**, v.30, n.4, p.633-638, 2000.

LIMA, E.O.; GOMPERTZ, O.F.; GIESBRECHT, A.M.; PAULO, M.Q. In vitro antifungal activity of essential oil obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v.36, n.9, p.333-336, 1993.

LIMA, E.O. **Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica**. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Agros, p.482-501, 2002.

LIMA, E.O.; SÁ, L.D.; OLIVEIRA, R.A.G.; BARRETO, A.J.R. **Plantas Medicinais na Paraíba: Retratos da Memória**. Editora Utopia: João Pessoa, 93p, 2005.

LIMA, N.M.F.; SANTOS, A.F.; PORFÝRIO, Z.; GOULART, M.O.F.; SANT'ANA, A.E.G. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. **Acta Tropica**, v.83, n.1, p.43–47, 2002.

LOPES, W.B.; MORONI, F.T.; BRANDENBURGO, M.I.H.; HAMAGUCHI, A. 02. **Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais**, 2002. Acessado em 10/08/2007. Site: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronical/b/desenvolvimento.pdf>.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil**. 2ª ed. São Paulo: Plantarum, 1991.

LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C., BIEBER, L.W., SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.199-206, 2005.

MADEIRA, S.V.F.; MATOS, F.J.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; CRIDDLE, D.N. Relaxant effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* on isolated ileum of the guinea pig. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.1–4, 2002.

MAHMOUD, S.S., CROTEAU, R.B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v.7, n.8, p.366-373, 2002.

MANABE, A.; NAKAYAMA, S.; SAKAMOTO, K. Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalitoyl phosphatidylcholine-liposomes. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.44, p.77–84, 1987.

MANN, C.M., MARKHAM, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.538–544, 1998.

MANSUR, A.J. Endocardite Infecçiosa: Conceito, Etiopatogenia, Fisiopatologia e Diagnóstico. In: TIMERMAN, A.; MACHADO CÉSAR, L.A. **Manual de Cardiologia – SOCESP**, São Paulo, Atheneu, v.2, cap.59, 257-259.p, 2000.

MARÍN, S.; VELLUTI, A.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Effect of essential oils on zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterilized maize grain. **Food Microbiology**, v.21, n.4, p.313-318, 2004.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. **Journal of Food Protection**, v.62, n.9, p.1017-1023, 1999.

_____. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lammiaceae* and *Compositae*. **International Journal Food Microbiology**, v.67, p.187-195, 2001.

MARTIN, R. P. The recognition and treatment of infective endocarditis. **Current Paediatrics**, v.12, n.3, p.212-219, 2002.

MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Fortaleza, ed. UFC, 128p, 1988.

_____. **Farmácias vivas**. UFC Edições, 3ª ed, Fortaleza, 1998.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.E. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, n.3, p.695-698, 1996.

McCASKILL, D.; CROTEAU, R. Strategies for bioengineering the development and metabolism of glandular tissues in plants. **Nature Biotechnology**, v.17, p.31–36, 1999.

MCLAUGHIN, J.L.; ROGERS, L.L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v.32, p.513-524, 1998.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, p.31–34, 1982.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; LERKIVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chemistry**, v.71, n.1, p.79-83, 2000.

MONTANHER, A.B.P.; PIZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. An application of the brine shrimp bioassay for general screening of brazilian medicinal plants. **Acta Farmacológica Bonaerense**, v.21, n.3, p.175-178, 2002.

MORAIS , S.M.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. et al. Análise comparativa de óleos essenciais das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira) procedentes de regiões diversas. In: **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Fortaleza, v.13, Resumos 202, 1994.

MOYLER, D. CO₂ extraction and other new technologies: an update on commercial adoption. International Federation of Essential Oils and Aroma Trades — **21st International Conference on Essential Oils and Aroma's**. IFEAT, London, p.33–39, 1998.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S; PFALLER, M.A. Outros bastonetes Gram-negativos. In._____. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro, 5^a.edição, editora Elsevier. Cap.39, p.312-313, 2006.

NAKATANI, S.; MITSUTAKE, K.; HOZUMI, T.; YOSHIKAWA, J.; AKIYAWA, M.; YOSHIDA, K.; ISHIZUKA, N.; NAKAMURA, K.; TANIGUCHI, Y.; YOSHIOKA, K. Current characteristics of infective endocarditis in japan – An analysis of 848 cases in 2000 and 2001 – **Circulation Journal**, v.67, p.901-905, 2003.

NAQUI, S.A.H.; KHAN, M.S.Y.; VOHORA, S.B. Antibacterial, antifungal and antihelmintic investigations on Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, v.LXII, n.3, p.221-228, 1991.

NARVÁEZ, J.; NOLLA, J.M.; NARVÁEZ, J.A.; MARTINEZ-CARCINERO, L.; DE LAMA, E.; GÓMEZ-VAQUERO, C.; MURILLO, O.; VALVERDE, J.; ARIZA, J. Spontaneous Pyogenic Facet Joint Infection. **Seminars in Arthritis and Rheumatism.**, v.35, n.5, p.272-283, 2006.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. Performance for antimicrobial disc susceptibility tests. 7 ed. Villanove, PA: **NCCLS**, Aproved Standard M2-A7, v.20, n.1, 2000a.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5 ed. Villanova, PA: **NCCLS**, Aproved Standard document M7-A5, v.20, n.2, 2000b.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2 ed. Tentative standard. **NCCLS** Document M7-T2, V.B.n.B. Villa Nova PA, 2004.

NEGAHBAN, M.; MOHARRAMIPOUR, S.; SE.DKONNE, F. Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, v.43, p.123–128, 2007.

NIWA, K., NAKAZAWA, M., MIYATAKE, K., et al. Survey of prophylaxis and management of infective endocarditis in patients with congenital heart disease - Japanese Nationwide survey – **Circulation**, v.67, p.585–591, 2003.

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.

OLADIMEJI, R.A.; ORAFIDIYA, O.O.; OGUNNIYI, T.A.; ADEWUNMI, T.A. Pediculocidal and scabicial properties of *Lippia multiflora* oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p.305-311, 2000.

OLIVEIRA, J.V.; VENDRAMIN, J.D. Repelência de Óleos Essenciais e Pós Vegetais sobre Adultos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) em Sementes de Feijoeiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, n.3, p.549, 1999.

OLIVEIRA, M.J.R.; SIMOES, M.J.S.; SASSI, C.R.R. Phytotherapy in the Public Health System (SUS) in the São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, v.8, n.2, 2006

OYEDEJI, A.O.; EKUNDAYO, O.; OLAWORE, O.N.; ADENIYI, B.A.; KOENIG, W.A. Antimicrobial activity of the essential oils of five Eucalyptus species growing in Nigeria. **Fitoterapia**, v.70, p.526-528, 1999.

PADMAJA, R.; ARUN, P.C.; PRASHANTH, D.; DEEPAK, M.; AMIT, A.; ANJANA, M. Brine Shrimp lethality bioassay of selected Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, v.73, p.508-510, 2002.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v.46, n.8, p.2720-2722, 2002.

PANIZZA, S. **Plantas que curam: cheiro de mato**. São Paulo: IBRASA, 1997.

PELKA, M.; DANZL, C.; DISTLER, W.; PETSCHERT, A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. **Journal of Dentistry**, v.28, n.5, p.341-345, 2000.

PELLETIER-JR, L.L; PETERDORF, R.G. Infective endocarditis: a review of 125 cases from the University of Washington Hospitals, 1963-72. **Medicine**, v.56, p.287-313, 1977.

PEREIRA, M.C.; CHALFOUN, S.M; PIMENTA, C.J.; ANGÉLICO, C.L.; MACIEL, W.P. Spices, fungi mycelial development and ochratoxin A production. **Scientific Research and Essay**, v.1, n.2, p.38-42, 2006.

PIGRAU, C.; ALMIRANTE, B.; FLORES, X.; FALCO, V.; RODRIGUEZ, I.; GASSER, C.; VILLANUEVA, A.; PAHISSA, A. Spontaneous pyogenic vertebral osteomyelitis and endocarditis: Incidence, risk factors, and outcome. **The American Journal of Medicine**, v.118, n.11, p.1287, 2005.

PIMENTA, L.P.S.; PINTO, G.B.; TAKAHASHI, J.A.; SILVA, L.G.F.; BOAVENTURA, M.A.D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**, v.10, p.209–212; 2003.

PINTORE, G.; USAI, M.; BRADESI, P.; JULIANO, C.; BOATTO, G.; TOMI, F.; CHESSA, M.; CERRI, R.; CASANOVA, J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**, v.17, p.15–19, 2002.

PONTES, Z.B.V.S. **Atividade antifúngica de produtos naturais e sintéticos sobre espécies de *Trichosporun behrend***. Tese de Doutorado: Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB, 178.p, 2002.

PRUDENT, D.; PERINEAU, F.; BESSIERE, J.M.; MICHEL, G.M.; BACCOU, J.C. Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique (*Coleus aromaticus Benth.*)—evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. **Journal of Essential Oil Research**, v.7, p.165–173, 1995.

REMADI, J.P.; NADJI, G.; BRAHIM, A.; COVIAUX, F.; MAJHOUB, Y.; TRIBOUILLOY, C. Superiority of surgical versus medical treatment in patients with *Staphylococcus aureus* infective endocarditis. **International Journal of cardiology**, v.99, n.2, p.195-199, 2005.

RODRIGUES, E.A.C.; MENDONÇA, J.S.; AMARANTE, J.M.B.; ALVES-FILHO, M.B.; GRINBAUM, R.S.; RICHTMANN, R. **Infecções hospitalares: Prevenção e Controle**. São Paulo: Sarvier, v.3, n.27, p.639-647, 1997.

ROODER, B.; WANDALL, D.A.; ESPERSEN, F. et al. Sci^a and Neurologic Manifestations in *Staphylococcus aureus* Endocarditis: A Review of 260 Bacteremic cases in Nondrug Addicts Vibeke T. Rosdahl, **The American Journal of Medicine**, v.102, n.4, p.379-386, 1997.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T.; DEANS, S.G.; DORMAN, H.J.D. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. **Planta Medica**, v.66, n.4, p.687-693, 2000.

RUIZ A.L.T.G.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, A.F.; FARIA, A.D.; AMARAL, M.C.E.; SERRANO, D.R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.98-102, 2005

RUSSO, M.; GALLETTI, G.C.; BOCCHINI, P.; CARNACINI, A. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letsweet): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3741–3746, 1998.

SÁ, L.D.; PAULO, M.Q.; LIMA, E.O.; XAVIER FILHO, L. Activité antimicrobienne d'huiles essentielles sur les bactéries qui causent la conjunctivite. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v.67, p.99-103, 1995.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v.91, n.4, p.621–632, 2005.

SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to *Turkish thyme* and *Oregano hydrossols*. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.36, n.5, p.467-473, 2003.

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, n.5, p.293-297, 2001.

SALZER, U.J. The analysis of essential oils and extracts (*oleoresins*) from seasonings – a critical review. **CRC Critical reviews in food science and nutrition**, v.9, n.4, p.345-373, 1977.

SAMPAIO, R.O.; GRINBERG, M. Endocardite Infecçiosa. **Programa de Educação Continuada da Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v.2, n.1, 2002.

SANT'ANA, J.; MANCINI-FILHO, J. Ação antioxidante de extratos de alecrim (*Rosemary officinalis* L) em filés de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.2, n.1, p.27-31, 1999.

SANTOS, A.F.; AZEVEDO, D.P.L.; MATA, R.C.S.; MENDONÇA, D.I.M.D.; SANT'ANA A.E.G. The lethality of *Euphorbia conspícua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvea of *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v.98, p.135-139, 2007.

SAYYAH, M.; VALIZADEH, J; KAMALINEJAD, M. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole and maximal electroshock induces seizures. **Phytomedicine**, v.9, n.3, p.212-216, 2002.

SELLAR, W. **Óleos que curam**. O poder da aromaterapia. Rio de Janeiro, Record: Nova Era, 230p, 2002.

SENATORE, F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.1327–1332, 1996.

SENATORE, F.; NAPOLITANO, F.; OZCAN, M. Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. **Flavour and Fragrance Journal**, v.15, p.186–189, 2000.

SHARON, C. A.; CHEN, M.B.B.S.; DOMINIC, E.D.; SORRELL, T.C. Comparison of hospital and community-acquired infective endocarditis. **The American Journal of Cardiology**, v.70, n.18, p.1449-1452, 1992.

SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.; LIRA, K.S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em Laboratório. **Revista de Patologia Tropical**, v.27, p.51-63, 1998.

SILVA, N.A.; OLIVEIRA, F.F.; COSTA, L.C.B.; BIZZO, H.R.; OLIVEIRA, R.A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira cultivada em Ilhéus – Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.3, p.52-55, 2006.

SIKKEMA, J.; De BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.11, p.8022–8028, 1994.

_____. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v.59, n.2, p.201–222, 1995.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In.: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª edição da UFSC, cap.18, p.467-495, 2003.

SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial activity of mint essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.2384–2388, 1995.

SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAU, E.; NICOLAU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and citotoxic activities of *Origanum vulgare* essential oil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.44, n.11, p.1202-1205, 1996.

SMITH, T.L.; PEARSON, M.L.; WILCOX, K.R.; CRUZ, C.; LANCASTER, M.V.; ROBINSON-DUNN, B.; TENOVER, F.C.; ZERVOS, M.J.; BAND, J.D.; WHITE, E.; JARVIS, W. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. **New England Journal of Medicine**, v.340, p.493–501, 1999.

SOEJIMA, H.; OGAWA, H.; HIRAI, N, KAMANO, H., SAKAMOTO, T. Infective endocarditis with perivalvular pseudoaneurysm. **Circulation Journal**, v.66, n.2, p.211-212, 2002.

SOUZA, E.L. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): uma abordagem para uso em sistema de conservação de alimentos**. Tese de Doutorado - Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006, 140p.

SOUZA, E.L.; LIMA, E.O.; FREIRE, K.R.L.; SOUSA, C.P. Inhibition action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v.2, n.2, p.245-250, 2005.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.527-532, 2006.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food control**, v.18, n.5, p.409-413, 2007.

SVENSSON, B.M.; MATHIASSEN, L.; ARTENSSON, M. BERGSTROM, S. *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.102, p.309–321, 2005.

TANAKA, R.; SAKANO, Y.; SHIMIZU, K.; SHIBUYA, M.; EBIZUKA, Y.; GODA, Y. Constituents of *Laurus nobilis* L. inhibit recombinant human lanosterol synthase. **Journal of Natural Medicines**, v.60, n.1, p.1340-3443, 2006.

TASSOU, C.C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G.J.E. Inhibition of *Salmonella enteridis* and *Staphylococcus aureus* on nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International**, v.33, n.1-4, p. 273-280, 2000.

TELLES, M.A.S.; MOSCA, A. Avaliação da Técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.59, n.1/2, p.15-19, 2000.

THOROSKI, J.; BLANK, G.; BILIADERIS, C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v.52, n.6, p.399– 403, 1989.

TORO SANTA MARIA, M.A.; DÍAZ, S.R.; PIAZZE, M.P.F. Microhongos filamentosos y levaduriformes asociados a pimienta negra (*Piper nigrum*). **Boletín de Micología**, v.8, n.1-2, p.77-83, 1993.

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G.-J.E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.901–909, 2000.

UCHIYAMA, N.; MATSUNAGA, K.; KIUCHI, F.; HONDA, G.; TSUBOUCHI, A.; NAKAJIMA-SHIMADA, J.; AOKI, T. Trypanocidal Terpenoids from *Laurus nobilis* L. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.50, n.11, p.1514-1516, 2002.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.10, p.4606–4610, 1999.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F.A.; SMID, E.J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, v.174, n.4, p.233–238, 2000.

ULTEE, A.; BENNINK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p.1561–1568, 2002.

VALERO, M.; SALMERÓN, M.C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, n.1-2, p.73-81, 2003.

VIDAL, F.; VIDAL, J.C.; GADELHA, A.P.R.; LOPES, C.S.; COELHO, M.G.P.; MONTEIRO-LEAL, L.H. *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (*Lamiaceae*) on trophozoites. **Experimental Parasitology**, v.115, p.25–31; 2007.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia: Manual de plantas medicinais**. 2.ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p.78-93, 1992.

VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S.; ERNST, E.; KLEPSE, M.; DEMIRCI, B.; BASER, H.; VAN WYK, B. E. *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae) - the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.2-3, p.137-143, 2003.

WAGNER, H; BLADT, S. Plant drug analysis. **A thin layer chromatography atlas**. 2.ed. Berlin: Springer, 1995.

WALDSTEIN, A. Mexican migrant ethnopharmacology: Pharmacopoeia, classification of medicines and explanations of efficacy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, p.299–310, 2006.

WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M.J. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.152–158, 1998.

WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SIRIWANGCHAI, T.; THUBTHIMTHED, S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia**, v.76, p.233– 236, 2005.

WATANABE, Y.; TAKETANI, Y.; TAKEI, Y.; TANAKA, K; WATANABE, Y. Complete heart block resulting from quadricuspid aortic valve penicillin-resistant pneumococcal endocarditis - a case report -**Circulation Journal**, v.67, p.275-276, 2003.

WHO. Reducing risks, promoting healthy life. Geneva, **World Health Organization**, report, p.248, 2002.

WILKINSON, J.M.; HIPWELL, M.; RYAN, T.; CAVANAGH, H.M.A. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.76–81, 2003.

WILSON, W.R.; KARCHMER, A.W.; DAJANI, A.S.; TAUBERT, K.A.; BAYER, A. et al. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to *streptococci*, *enterococci*, *staphylococci*, and HACEK microorganisms. American Heart Association. **The Journal of the American Medical Association - JAMA**, v.274, p.1706–171, 1995.

WILSON, W.; TAUBERT, K.A.; GEWITZ, M.; LOCKHART, P.B.; BADDOUR, L.M.; LEVISON, M. et al. Prevention of Infective Endocarditis : Guidelines From the American Heart Association: A Guideline From the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. **Circulation**, v.116, p.1736-1754, 2007.

WONG-LEUNG, Y.L. Antibacterial activities of some Hong-Kong plants used in Chinese medicine. **Fitoterapia**, v.69, n.1, p.11-16, 1988.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)