

Anáisa Fernandes Preto Pires Bartolomeu

# ÓLEOS ESSENCIAIS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMICROBIANA NA TERAPÊUTICA DE INFEÇÕES MULTIRRESISTENTES DA PELE E MUCOSAS

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Carlos Manuel Freire Cavaleiro e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Anaísa Fernandes Preto Pires Bartolomeu, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009027400, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 18 de julho de 2014.

---

(Anaísa Fernandes Preto Pires Bartolomeu)

Monografia no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**O Tutor da Monografia**

---

(Professor Doutor Carlos Cavaleiro)

**A Orientanda**

---

(Anaísa Fernandes Preto Pires Bartolomeu)

## Capa

Micrografia eletrónica de varrimento de *Staphylococcus aureus* (verde) a ser fagocitado por um neutrófilo (roxo). *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) [Acedido a 7 de Julho de 2014]. Disponível na Internet:

<https://www.flickr.com/photos/niaid/6830921049/in/set-72157627714255911>

A bactéria *Staphylococcus aureus* ganhou resistência aos antibióticos rapidamente, logo a seguir ao momento em que começaram a ser usados, na década de 1940. Contudo, um recurso ao saber ancestral do potencial antimicrobiano de extratos vegetais traz-nos o *background* para novas opções coadjuvantes ou inovadoras relativamente à terapêutica atual, cada vez mais posta em causa pela pressão seletiva dos antimicrobianos.

Os meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor Doutor Carlos Cavaleiro, pela consideração e  
pela oportunidade que me proporcionou;

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra,  
pelo que tem realizado em prol da formação completa dos alunos;

Aos meus pais, irmão e avós, incondicionalmente presentes,

A todos aqueles que contribuíram para que a aprendizagem,  
o curso e a monografia fossem bem-sucedidos.

## Índice

Lista de abreviaturas .....	1
Resumo .....	2
Abstract .....	2
1. Introdução.....	3
2. Infecções multirresistentes .....	7
2.1. Agentes infecciosos mais relevantes.....	7
2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
2.1.2. <i>Enterococcus spp.</i> .....	8
2.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	9
2.1.4. Candidoses.....	10
3. Plantas e seus compostos.....	13
3.1. <i>Thymus spp.</i> .....	13
3.2. <i>Eucalyptus spp.</i> .....	17
3.3. <i>Zataria multiflora</i> .....	18
3.4. <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	20
3.5. <i>Quercus suber</i> .....	22
3.6. Outros.....	23
4. Conclusão .....	29
5. Bibliografia.....	31
6. Anexos.....	34

## Índice de figuras

Figura 1 - Declínio de aprovações de antibióticos nos últimos 30 anos .....	5
Figura 2 - Estrutura química da linezolida .....	8
Figura 3 - Percentagem de formação de tubos germinativos de três estirpes de <i>C. albicans</i> incubadas com concentrações sub-inibitórias ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) do OE de <i>Thymus villosus</i> .....	16
Figura 4 – Curva isobolográfica, revelando o efeito sinérgico do óleo de <i>Z. multiflora</i> e vancomicina contra MRSA e MSSA, e cálculo do índice FIC .....	19

## Índice de tabelas

Tabela I - Concentrações Fracionais Inibitórias (FIC) e índices FIC (FICI) .....	20
--	----

## Lista de abreviaturas

- ATCC - American Type Culture Collection  
CaCo-2 – Linha celular de Adenocarcinoma Colorretal  
CECT – *Colección Española de Cultivos Tipo*  
CFU – Unidade Formadora de Colónias  
CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute  
CoNS – Estafilococos Coagulase-Negativos  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DNA – Ácido Desoxirribinucleico  
DP – Desvio Padrão  
ESBL – Beta-Lactamase de Largo Espectro  
FSDC – Linha celular de Células Dendríticas de Pele de Feto de Murganho  
FIC – Concentração Inibitória Fracional  
FICI – Índice FIC  
FID – Detetor de Ionização de Chama  
Hep-2 – Linha celular de Carcinoma Epidermoide  
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana  
IV – Intravenoso  
MBC – Concentração Bactericida Mínima  
MFC – Concentração Fungicida Mínima  
MIC – Concentração Inibitória Mínima  
MLC – Concentração letal mínima  
MR – multirresistente  
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina  
MSSA – *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina  
MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards  
OE – óleo essencial  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PBS – Tampão Fosfato  
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*  
TTO – Óleo Essencial de *Melaleuca* ssp.  
UCI – Unidade de Cuidados Intensivos  
VRE – *Enterococcus* resistente à vancomicina



## Resumo

O rápido desenvolvimento de agentes patogênicos resistentes aos antimicrobianos e a sua disseminação por todo o mundo estão entre as mais sérias ameaças para a saúde pública. Determinados óleos essenciais de plantas medicinais, como a árvore do chá, possuem propriedades antimicrobianas e têm sido selecionados como potenciais fontes de novos compostos antimicrobianos. Diversos estudos demonstraram as propriedades de inibição de crescimento microbiano dos óleos essenciais e antissépticos vulgarmente utilizados foram efetuados testes de *screening* de difusão em disco, ensaios de micro e macrodiluição em caldo. Componentes típicos de óleos essenciais, como os terpenóides, mostraram boas atividades terapêutica e sinérgica na modulação da resistência a antibióticos em várias espécies de organismos, segundo diferentes mecanismos de ação. Alguns destes óleos essenciais mostram atividade inibidora contra *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (MRSA), *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de *Extended Spectrum Beta-Lactamases* (ESBLs). Como provado *in vitro*, os produtos de origem natural constituem uma opção eficaz e mais acessível para debelar esta grande preocupação mundial.

**Palavras-chave:** Óleos essenciais, MRSA, VRE, Multirresistência, Alternativa terapêutica.

## Abstract

The quick development of antimicrobial-resistance spread worldwide is among the most serious threats to public health. Certain essential oils, like tea tree oil, have antimicrobial properties and have been selected as potential sources of new antimicrobial compounds. Several studies demonstrate such properties using *in-vitro* micro and macrodilution broth methods. Components of essential oils, such as terpenoids, showed good synergistic and therapeutic activities in the modulation of antibiotic resistance in many species of organisms, according to different mechanisms of action. Some of these essential oils showed inhibitory activity against *Methicillin-resistant S. aureus* (MRSA), *Vancomycin-resistant Enterococcus* (VRE), multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. As proven *in vitro*, the natural products are an efficient and cheap option to eradicate this phenomenon is a major global concern.

**Keywords:** Essential oils, MRSA, VRE, Multidrug resistance, Therapeutic alternative.

## I. Introdução

A luta contra infecções comuns e hospitalares envolvendo microrganismos resistentes a antibióticos tornou-se de interesse crucial para médicos, nomeadamente cirurgiões, em todo o mundo. Além do desenvolvimento de novas terapias eficazes, a exploração dos quase esquecidos agentes antibacterianos tópicos da era pré-antibiótico ganhou recentemente nova atenção.

Utilizados primeiramente nos tratamentos tradicionais indígenas e do Sudeste Asiático, os óleos essenciais (OEs) da árvore do chá e de eucalipto, entre outros, têm demonstrado eficácia promissora contra várias bactérias e têm sido utilizados clinicamente contra estirpes multirresistentes. Bactérias comuns e adquiridas em ambiente hospitalar, desde estirpes de *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (MRSA) a isolados de leveduras, incluindo *Candida krusei*, foram testadas quanto à sua suscetibilidade a estes OEs e verificaram-se zonas de inibição eficaz [1].

Assim sendo, a resistência aos antibióticos é um problema que exige novas estratégias para combater a infeção devido à tensão que a sua evolução tem suscitado. Até à data, as abordagens farmacológicas sistémicas têm tido sucesso variável. Embora ainda não amplamente reconhecido pelos clínicos, tem-se formado um suporte internacional de evidências da literatura apoiando o uso de óleos essenciais (OEs) contra microrganismos patogénicos. Começa a surgir evidência científica da eficácia promissora de óleos essenciais (OEs) antissépticos de origem vegetal na inibição *in vitro* de isolados clínicos de MRSA, *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (MR), *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de Beta-Lactamases de Largo Espectro (ESBLs) [31]. Para além disso, tanto estudos *in vitro* como casos clínicos têm demonstrado as potentes propriedades bactericida, antimicótica e antifúngica de alguns OEs. Podem atuar também como bioconservadores, reduzindo ou eliminando bactérias patogénicas e aumentando a qualidade global dos produtos alimentares animais e vegetais. Embora os estudos clínicos sejam escassos, o uso de OEs para administração tópica e como promotores da penetração de antissépticos é promissor [2].

Em Abril de 2014, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou o seu primeiro relatório global sobre as resistências aos antimicrobianos, pois considera-as uma grave ameaça à saúde pública mundial. O relatório, com dados de 114 países, discute a resistência a diversos agentes infecciosos, mas dá particular ênfase a sete bactérias responsáveis por doenças comuns e graves, como diarreia, pneumonia, sepsis, infeções do trato urinário e gonorreia.

Os principais pontos do relatório incluem:

- A bactéria *Klebsiella pneumoniae* desenvolveu resistência ao tratamento de último recurso para infecções hospitalares, tais como pneumonia, sepsis, infecções em recém-nascidos e doentes em Unidades de Cuidados Intensivos. Esta resistência é um problema no mundo inteiro.

- A resistência às fluoroquinolonas pela *E. coli* existe em todo o mundo. Não havia praticamente resistência quando estes medicamentos foram introduzidos pela primeira vez na década de 1980, mas são atualmente ineficazes em mais de metade dos doentes.

- Mais de 1 milhão de pessoas estão infetadas com gonorreia em todo o mundo e a falência de tratamento de último recurso com cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração foi confirmada na Áustria, Austrália, Canadá, França, Japão, Noruega, Eslovênia, África do Sul, Suécia e Reino Unido.

- A resistência aos antibióticos aumenta a duração das doenças e o risco de morte. Consequentemente, os custos dos cuidados de saúde também aumentam com internamentos mais prolongados e a necessidade de cuidados intensivos.

A OMS, que classifica os resultados como muito preocupantes, considera como uma das principais causas da resistência a incorreta utilização dos antibióticos, uma vez que nos países pobres as doses administradas são subterapêuticas e nos países ricos a utilização é excessiva. A organização critica também a falta de vigilância do uso dos antibióticos nos animais destinados ao consumo humano.

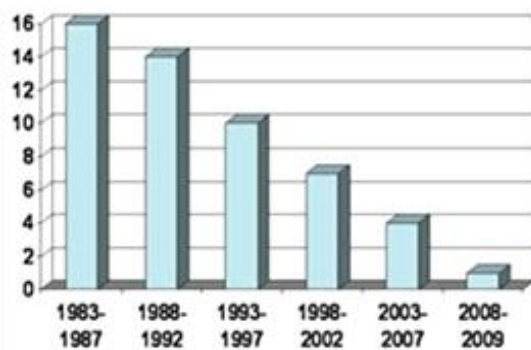
Várias estratégias são descritas para combater a resistência aos antibióticos. Os consumidores são incentivados a usar antibióticos apenas quando prescritos por um médico, a completar todas as doses de antibióticos prescritos e a não partilhar antibióticos com outras pessoas. Os profissionais de saúde e farmacêuticos são aconselhados a melhorar a prevenção das infecções e o seu controlo, a limitar a prescrição e prescrever antibióticos somente quando necessário, com o antibiótico correto para cada doente.

Deverá ser fortalecida a monitorização laboratorial das resistências, regulamentada e promovida a utilização dos antibióticos mais adequados, incentivar a inovação e pesquisa, e encorajar a cooperação e circulação de informação entre todos os profissionais [3][4].

Considerados pela OMS como um dos pilares da saúde, os antibióticos permitem-nos viver mais tempo e com melhor saúde, mas a sua utilização incorreta tornou-os praticamente ineficazes em algumas décadas. Segundo o subdiretor-geral da OMS para a segurança sanitária, FUKUDA [5] a não ser que os numerosos envolvidos ajam urgentemente, de modo coordenado, o mundo caminha para uma era pós-antibióticos, onde infecções comuns e feridas menores que têm sido tratadas há décadas podem voltar a matar.

Se não tomarmos medidas significativas para evitar as infeções, mas também para alterar o modo como produzimos e utilizamos os antibióticos, vamos perder progressivamente esses benefícios para a saúde pública mundial e as consequências serão devastadoras [4].

Apesar desta necessidade crítica de novas opções, o *pipeline* atual de antibióticos não é bom. Muitas empresas estão a deixar esta área importante devido aos desafios na procura de novos antibióticos, ao ambiente regulamentar complicado e às oportunidades limitadas de retorno de investimento. Numa perspetiva de negócios, há também desafios financeiros para empresas de saúde. Os doentes geralmente só precisam de uma toma de duas semanas para tratar infeções bacterianas, o que torna os antibióticos financeiramente menos gratificantes do que os tratamentos de longo prazo, o que significa um retorno menor sobre o investimento em pesquisa e desenvolvimento. Como resultado, a pesquisa tem diminuído ao longo dos últimos 15 anos [6].



**Figura 1** - Declínio de aprovações de antibióticos nos últimos 30 anos. Adaptado de Spelberg, CID 2004 [27].

Posto isto, as infeções hospitalares e bactérias resistentes aos antibióticos continuam a ser as principais preocupações de saúde em todo o mundo.

A nível local, o Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infeção Associada aos Cuidados de Saúde (PNCI) foi criado com o objetivo de reduzir as infeções evitáveis associadas aos cuidados de saúde, através da implementação de práticas basadas na evidência [7]. O grupo coordenador do PNCI trabalha em estreita articulação com os grupos coordenadores regionais de controlo da infeção, sedeados nas Administrações Regionais de Saúde. Apesar dos esforços neste sentido, as infeções hospitalares permanecem elevadas. O resultado da campanha contra as infeções hospitalares é praticamente nulo, com a percentagem de contágios a permanecer elevada, na ordem dos 11%, isto apesar de cada vez mais instituições de saúde aderirem à iniciativa “Medidas Simples – Salvam Vidas”. Estes dados constam de um balanço de cinco anos da estratégia para a melhoria da higiene das mãos [8].

Apesar de tudo, 86% dos Portugueses acreditam que todos temos um papel a desempenhar na luta contra a resistência aos antibióticos, segundo o Eurobarómetro [9].

Portanto, como farmacêuticos podemos atuar na prevenção e evitar a criação de resistências, a partir de estratégias inovadoras derivadas do saber etnofarmacológico dos nossos antepassados.

Com este trabalho pretende-se contribuir para um melhor entendimento destas novas opções terapêuticas ao fazer uma revisão das abordagens preventivas, sinérgicas ou de tratamento *per si* que podem ter, mais acessíveis ao público em geral e com menor risco para a saúde pública em termos de ausência de eficácia.

## **2. Infecções multirresistentes**

Entre as muitas causas do cenário crescente de resistência aos antimicrobianos está a capacidade das bactérias para evoluírem e mutarem, desenvolvendo e partilhando com outros organismos as resistências por elas adquiridas [6]. As infeções adquiridas na comunidade e nos hospitais com expressão em tecidos expostos, pele e mucosas, são uma das maiores preocupações mundiais, principalmente devido às multirresistências adquiridas.

Para surgir infeção é necessário que os microrganismos tenham acesso a uma porta de entrada favorável, o número de microrganismos seja significativo, os microrganismos tenham afinidade para o tecido em causa e o hospedeiro seja suscetível. A resistência individual à infeção é muito variável e depende da idade do hospedeiro, estado imunitário, doenças subjacentes, intervenções medico-cirúrgicas, procedimentos invasivos e terapêuticas. As intervenções na prevenção e controlo da infeção, nomeadamente a nível hospitalar, são eficazes se todos os profissionais conhecerem os verdadeiros riscos e os meios mais eficazes e económicos para os minimizar. É responsabilidade de todos evitar que os agentes patogénicos tenham acesso, em número significativo, às portas de entrada do hospedeiro vulnerável [8]. São apresentados de seguida os microrganismos onde se verifica o fenómeno de multirresistência com mais intensidade.

### **2.1. Agentes infecciosos mais relevantes**

#### **2.1.1. *Staphylococcus aureus***

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria muito comum encontrada viva em indivíduos saudáveis, sem causar qualquer problema, mas quando consegue atingir o interior do corpo humano é responsável por infeções graves tais como infeções hospitalares. De facto, é reconhecido como uma das maiores causas de infeções na comunidade e nosocomiais. Algumas estirpes clínicas de *S. aureus* são agora resistentes a quase todos os agentes antimicrobianos utilizados na prática clínica.

É de realçar o *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA), que aumenta drasticamente a morbidade do doente e muitas vezes exige readmissão, expondo outros doentes vulneráveis. O MRSA é particularmente problemático, devido à sua capacidade para causar infeções graves dos tecidos moles, ossos ou implantes. Em muitas unidades cirúrgicas e enfermarias, isto criou um requisito para o isolamento e esterilização de equipamentos e instrumentos utilizados para esses doentes durante o internamento. Alguns hospitais podem recusar a admissão de doentes portadores de patógenos multirresistentes comprometendo

a capacidade do paciente afetado ter acesso a cuidados de saúde adequados. Para além disso, a infeção por MRSA demonstrou diminuir significativamente a qualidade de vida e a auto-estima dos doentes [10].

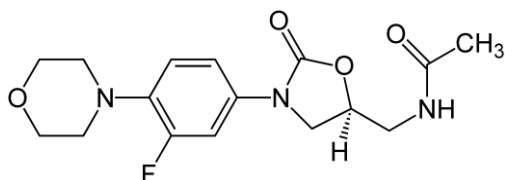
O MRSA é muito comum em várias áreas do mundo e tem continuado a aumentar. A vancomicina é considerada a última linha de tratamento contra uma variedade de infeções graves causadas por MRSA. O *S. aureus* com suscetibilidade intermédia à vancomicina foi relatado pela primeira vez no Japão em 1996 e desde então estes isolados têm sido encontrado mundialmente.

Este desenvolvimento de *S. aureus* vancomicina resistente, juntamente com os efeitos colaterais indesejáveis e má absorção sistémica da vancomicina, tem levado à pesquisa de novos agentes antimicrobianos de plantas medicinais [11].

### 2.1.2. *Enterococcus spp.*

Desde o seu aparecimento em 1988, a incidência da infeção nosocomial por *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) tem aumentado consideravelmente nos países desenvolvidos e tem afetado os resultados do tratamento cirúrgico. O *Enterococcus*, que já foi considerado um agente patogénico de mínima relevância clínica nos centros cirúrgicos, surgiu agora como uma causa crescente de morbilidade nos doentes imunodeprimidos, causando infeção do trato urinário, endocardite, bacteriémia e sepsis. A resistência à vancomicina está a crescer e o VRE a tornar-se endémico num número crescente de Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) em todo o mundo. Esta rápida disseminação, combinada com as limitadas opções terapêuticas disponíveis no tratamento de VRE, está a tornar-se rapidamente um motivo de grande preocupação.

Como resposta têm sido experimentadas novas abordagens farmacológicas, com e sem sucesso. Muitos cirurgiões e médicos têm encorajado a retenção de antibióticos poderosos de largo espectro como tratamento de primeira linha tanto tempo quanto possível, de modo a atrasar o desenvolvimento de multirresistências. Esperava-se que o novo antibiótico linezolida, introduzido em 2000, agisse como uma defesa firme contra a propagação constante de VRE. No entanto, apesar da sua promessa inicial, já foram descobertos em 2002 isolados clínicos resistentes e a incidência de infeção devido a estirpes resistentes tem vindo a aumentar em toda a Europa ocidental [2].



**Figura 2** - Estrutura química da linezolida. Adaptado de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010000300035](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000300035)

### 2.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo não fermentador ubíquo na natureza que pode ser encontrado em águas, solos, plantas e, também, em amostras clínicas. Pode ser isolado a partir de fontes ambientais, particularmente em água doce, e é um comensal cutâneo raro presente em alguns indivíduos. Este bacilo merece uma atenção especial devido à sua emergência em ambiente hospitalar como agente patogénico oportunista, associado a infeções nosocomiais e à elevada resistência aos antibióticos. Raramente faz parte da flora normal, porém é a espécie mais comum em infeções clínicas, sendo responsável por casos como fibrose cística, feridas cirúrgicas, infeção de queimaduras, endocardites, doença pulmonar e do trato urinário [12] [13].

Um dos seus habitats preferenciais é o trato respiratório dos doentes com comorbilidades graves das UCI a receber tratamentos com antibióticos, especialmente em doentes com baixas defesas imunitárias. Esta bactéria é uma combinação problemática única da resistência inerente às muitas classes de antibióticos, com a capacidade de adquirir resistência a todos os tratamentos relevantes, pelo que é premente a descoberta de novas opções terapêuticas.

Entre os agentes patogénicos gram-negativos, as estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (MR), *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de Beta-Lactamases de Largo Espectro (ESBLs) têm-se tornado um problema sério em todo o mundo no ambiente hospitalar, limitando dramaticamente as opções terapêuticas e o tratamento cirúrgico. As infeções orais invasivas MRs são raras, mas caso ocorram são de particular consequência, exigindo diagnóstico rápido, amplo e muitas vezes desbridamento cirúrgico agressivo e antibioticoterapia de longo prazo.

Existe uma variedade de mecanismos de resistência a antibióticos em *P. aeruginosa*, que incluem os seguintes:

- Baixa permeabilidade da parede celular, conferindo resistência intrínseca;
- A produção de  $\beta$ -lactamases, aminoglicosidasas e cefalosporinasas mediadas por cromossomas externos ou plasmídeos;
- Uma alteração das proteínas de ligação dos antibióticos;
- Um mecanismo ativo de efluxo que transporta o antibiótico para fora da célula [14].



#### 2.1.4. Candidoses

A resistência aos antibióticos não é do domínio exclusivo das bactérias. Muitas estirpes de fungos e leveduras são resistentes ou desenvolvem resistência a antimicóticos no decurso da terapia. As espécies de *Candida* são particularmente problemáticas, como se pode verificar no exemplo de *Candida krusei* que se tem constatado com frequência ser responsável por múltiplas infeções fúngicas oportunistas resistentes aos fármacos. *C. krusei* é um agente patogénico extremamente importante, particularmente em doentes imunocomprometidos, tais como transplantados e com a síndrome da imunodeficiência adquirida humana (HIV) [1].

As infeções fúngicas provocadas por leveduras são as mais frequentes nos humanos. A candidose é a conotação genérica para denominar as doenças provocadas por espécies de *Candida*, nomeadamente *C. albicans* e *C. glabrata*. Estas podem provocar candidoses cutâneas (mais frequentes), sistémicas e alérgicas. Este trabalho vai focar essencialmente o estudo das primeiras, embora em doentes com o sistema imunológico comprometido algumas espécies como *C. krusei* possam conduzir a uma doença sistémica. Apesar deste tipo de leveduras ser comensal do tubo digestivo dos humanos, as candidoses têm vindo a aumentar significativamente, devido ao aumento do número de imunodeprimidos ao longo dos tempos.

As candidoses mucocutâneas podem ser agudas ou crónicas. Dentro das agudas as mais frequentes são as bucais e peribucais, caracterizadas pelo aparecimento de pequenas pápulas brancas, confluentes, muito aderentes e formando uma camada cremosa que pode cobrir a língua, o palato e a faringe. Para além dos locais referidos podem ser atingidos os cantos da boca, originando assim a tradicionalmente chamada boqueira [15].

A demonstração das propriedades antifúngicas de OEs tem um amplo potencial significativo para terapia tópica ou intraoral de *Candida* e possivelmente outros fungos ou leveduras. A candidíase orofaríngea é a infeção oportunista mais comum entre doentes infetados com o HIV. O uso de muitos fármacos convencionais é dificultado pela falta de eficácia, surgimento de resistências, eventos adversos, custos elevados e necessidade de administração intravenosa. Os óleos essenciais podem ter um elevado valor terapêutico tanto para a infeção dermatofítica, oral ou da mucosa como em doentes imunocompetentes e imunocomprometidos. Como *C. krusei* é um patógeno oportunista multirresistente, especialmente nestes doentes com baixas defesas imunitárias, a sua suscetibilidade aos óleos essenciais é importante para a consideração de estratégias terapêuticas futuras. O óleo de *Melaleuca alternifolia* é o mais investigado de todos os OEs na literatura para esse fim [1].

As candidoses genitais são mais frequentes em mulheres, mas também podem afetar os homens e na sua grande maioria são provocadas por *C. albicans*. As candidoses têm-se tornado muito frequentes, como consequência do uso excessivo de antibióticos, mas também contraceptivos orais e outros medicamentos responsáveis por alterações da flora vaginal normal, muitas vezes por diminuição do pH ou das condições fisiológicas normais, o que leva a uma maior proliferação dos fungos.

No caso de infeções das unhas podemos ter perioníquia, com uma inflamação da pele periférica da unha que se encontra vermelha e brilhante, e oníquia. O aparecimento deste tipo de lesões tem alguns fatores predisponentes, que são essencialmente alterações hormonais e traumatismos diversos, nomeadamente no que diz respeito à manicure onde se pode intervir também com estes compostos derivados de OEs de plantas medicinais. É devido a este último facto que se observa frequentemente este tipo de lesões em determinadas profissões, tais como pasteleiros, cozinheiros e trabalhadores de fábricas de conserva. Os casos de oníquia caracterizam-se pela estriação progressiva, dicromia e opacidade da lâmina da unha que por vezes se torna quebradiça. A onicólise aparece brusca e dolorosamente, provocando muitas vezes o deslocamento da unha.

O intertrigo é outra forma de afeção cutânea provocada por *Candida spp.* e pode ocorrer em várias zonas do corpo, nomeadamente mãos, pés, pregas submamárias (sobretudo em mulheres obesas), prega suprapúbica, virilhas e sulco interglúteo. Nas mãos e nos pés aparece como uma lesão eritemo-escamosa, exsudativa e pruriginosa, tratando-se de uma lesão bem delimitada periféricamente e onde normalmente a pele se encontra descolada. Nas outras zonas caracteriza-se pelo aparecimento de vesículas e pústulas, que por rotura originam pontos vermelhos exsudativos [15].

Atualmente há apenas três classes de antifúngicos disponíveis para tratar infeções graves por *Candida*: os azóis, as equinocandinas e os polienos, como por exemplo a anfotericina B. Os azóis são usados mais frequentemente para tratar as infeções por *Candida*, mas algumas espécies são inerentemente menos suscetíveis aos azóis ou desenvolvem resistência durante o tratamento prolongado. As equinocandinas, quando disponíveis, são o tratamento empírico de escolha. Formulações de anfotericina B estão disponíveis em muitos países, mas este agente tem maior toxicidade do que os azóis e as equinocandinas. Algumas espécies de *Candida*, tais como *C. lusitanae*, podem desenvolver resistência durante o tratamento com anfotericina B. Embora muitas candidíases resistentes aos azóis possam ser tratadas com fármacos de uma classe diferente, o custo significativo, a toxicidade e a ausência de uma formulação oral pode apresentar obstáculos à sua utilização.

Em alguns países em desenvolvimento, apenas uma única classe de antifúngicos está disponível e, se a resistência se desenvolve, não existem outras opções de tratamento. Considerando as limitações de fármacos antifúngicos disponíveis, os seguintes perfis de resistência são particularmente preocupantes:

- resistência aos azólicos, especialmente o fluconazol, porque este é o padrão (ou apenas disponível) na terapia antifúngica em muitos países;
- resistência à nova classe de antifúngicos, as equinocandinas, que substituíram o fluconazol como terapia empírica em países desenvolvidos;
- infecções da corrente sanguínea multirresistentes para as quais pode não haver quaisquer opções de tratamento disponíveis [16] [17].

### 3. Plantas e seus compostos

#### 3.1. *Thymus spp.*

Várias espécies de *Thymus* são usadas desde os tempos antigos na medicina tradicional, devido às reconhecidas propriedades terapêuticas, ou seja, a atividade antimicrobiana dos seus óleos essenciais. No estudo de GONÇALVES et al. [18] avaliou-se a composição e a atividade antifúngica de quatro tipos de óleos obtidos a partir de *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, uma Lamiaceae endêmica ibérica. Além disso, também se determinou a sua citotoxicidade nas células dendríticas da pele em concentrações que mostraram significativa atividade antifúngica.

A avaliação da viabilidade das células foi efetuada pelo teste de MTT e os resultados demonstraram que o óleo com quantidades elevadas de carvacrol, que têm forte atividade antifúngica contra as estirpes de dermatófitos, não mostrou nenhum efeito citotóxico, em concentrações que variam de 0,08-0,16 µL/ mL, em 24 h.

O *T. zygis* com alto teor de carvacrol, pode-se tornar uma fonte de compostos biologicamente ativos para a indústria farmacêutica.

O género *Thymus* L. (Lamiaceae), largamente distribuído na Península Ibérica, é um grupo taxonomicamente complexo de plantas aromáticas que têm sido usadas desde há muito tempo como tempero ou medicamento. Algumas espécies, como *Thymus vulgaris* e *Thymus zygis*, têm uma grande importância económica, sendo abordadas num grande número de monografias: das farmacopeias (europeia, britânica, francesa, alemã, suíça e americana, entre outras), da Cooperativa Científica Europeia para a Fitoterapia (ESCOP), da Comissão E do Ministério da Saúde Alemão e da Organização Mundial de Saúde (OMS). No que concerne ao *T. zygis*, as subespécies *zygis* e *gracillis* são as mais estudadas.

O fenómeno da variabilidade intraspecifica sobre a composição do óleo essencial de *Thymus*, ou seja, as diferenças químicas que existem em espécies morfológicamente idênticas, foi examinado por vários autores. Alguns quimiotipos de vários *Thymus sp.* portugueses foram identificados.

Em Portugal, o *T. zygis* Loeft. Ex L. subsp. *sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Brot. Ex Coutinho encontra-se generalizado na região centro de Portugal e é utilizado localmente como anti-séptico. Resultados anteriores demonstraram que este taxon é polimórfico. Foi avaliada, pela primeira vez, a actividade antifúngica de quimiotipos quimicamente bem definidos. Além disso foram avaliados os efeitos citotóxicos dos OEs de *T. zygis* subsp. *sylvestris* em células dendríticas de pele de rato, no intuito de determinar se podem ser seguramente aplicados na pele de mamíferos. É importante avaliar esses compostos também

pelas propriedades tóxicas, uma vez que a sua origem vegetal não garante a segurança para os seres vivos, incluindo mamíferos.

A atividade antifúngica de quatro óleos quimicamente distintos foi avaliada contra leveduras, *Aspergillus* e dermatófitos: duas estirpes clínicas de *Candida* isoladas de casos recorrentes de candidíase vulvovaginal (*C. krusei* H9, *C. guilliermondii* MAT23), três estirpes da American Type Culture Collection (*C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. parapsilosis* ATCC 90018) e uma estirpe da Coleção Espanhola de Cultivos Tipo (*Cryptococcus neoformans* CECT 1078); duas estirpes clínicas de dermatófitos isolados de unhas e pele (*Trichophyton mentagrophytes* FF7, *Microsporum canis* FF1) e duas estirpes da CECT (*Trichophyton rubrum* CECT 2794, *Microsporum gypseum* CECT 2908) e cinco estirpes clínicas isoladas de *Aspergillus* de secreções brônquicas (*Aspergillus niger* F01, *Aspergillus fumigatus* F05, *A. fumigatus* F07, *A. fumigatus* F17, *Aspergillus flavus* F44) e duas estirpes da ATCC (*A. niger* ATCC 16404, *A. fumigatus* ATCC 46645). *C. parapsilosis* ATCC 90018 foi utilizada como controlo. Os isolados fúngicos foram identificados através de métodos convencionais de microbiologia e armazenados em meio *Sabouraud* com glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$  (NCCLS, 2002a, b). Antes dos testes de suscetibilidade antifúngica, cada isolado foi inoculado em ágar de *Sabouraud* para garantir as características ótimas de crescimento e pureza. Foi utilizado um método de macrodiluição para determinar as concentrações mínimas inibitórias (MIC) e concentrações mínimas letais (MLC), de acordo com as referências da NCCLS M27-A2 (NCCLS, 2002a) e M38A (NCCLS, 2002b) para leveduras e fungos filamentosos, respetivamente.

O ensaio MTT foi realizado apenas com a amostra que demonstrou a atividade antimicrobiana mais forte. Avaliação da viabilidade das células foi feita através deste ensaio colorimétrico, utilizando o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Neste método, a densidade ótica da solução de contendo o formazano produzido por células metabolicamente ativas é medida espectrofotometricamente. Quatro quimiotipos foram caracterizados: carvacrol (25,0%), timol (23,8%), acetato de geranilo/ geraniol (20,8% e 19,8%) e linalol (30,0%). O *p*-cimeno é também um composto importante em todas as amostras, particularmente nos quimiotipos fenólicos, enquanto o 1,8-cineol é um constituinte relevante apenas no quimiotipo linalol.

Como demonstrado no anexo I, apenas a concentração mais elevada do essencial óleo (0,32  $\mu\text{L/mL}$ ) provocou a redução do MTT, após 3 h de exposição das células. Após 24 h de incubação de células com 0,32  $\mu\text{L/mL}$  do óleo, observou-se uma forte redução do MTT nas FSDC e, em comparação com os valores de controlo, a quantidade de azul de formazano formado diminuiu para  $5,35 \pm 1,26$  ( $p < 0,01$ ). Por outro lado, a incubação de FSDC de

murganho com o óleo essencial a 0,08 e 0,16  $\mu\text{L/mL}$ , durante 24 h não mostrou qualquer efeito citotóxico.

Os óleos de *T. zygis* subsp. *sylvestris* apresentaram grandes variações nas composições químicas, particularmente nas quantidades de carvacrol (1,3 - 25,0%), timol (5,2 - 23,8%), geraniol (0,1 - 19,8%), acetato de geraniol (0,5 - 20,8%) e linalol (3,5 - 30,0%). Os resultados mostraram diferenças importantes entre as populações, indicando a existência de polimorfismo químico, tal como aconteceu com outras espécies portuguesas (Salgueiro et al., 2006). A razão para esse polimorfismo químico pode refletir uma diversidade genética, provavelmente relacionada com a heterogeneidade das condições ambientais portuguesas, tais como o grau de humidade, amplitude térmica e tipo de solo.

A ocorrência limitada de timol ou carvacrol é uma das razões pelas quais os OEs de *Thymus* contendo estes fenóis têm sido de grande interesse. (Figueiredo et al., 2008). Os resultados demonstraram que o OE de *T. zygis* subsp. *sylvestris* teve atividade antifúngica eficaz contra as estirpes de dermatófitos, sendo o óleo rico em carvacrol o mais ativo, com valores de MIC de 0,16  $\mu\text{L/mL}$ .

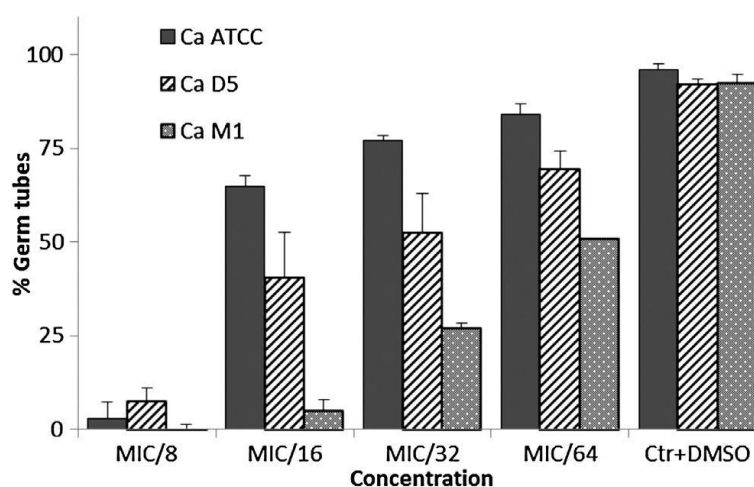
Foram realizadas algumas investigações para estudar os efeitos de OEs e dos seus componentes em células de mamíferos em culturas *in vitro*. Por exemplo, o óleo de lavanda é citotóxico para as células de pele humana *in vitro* (células endoteliais e fibroblastos) a uma concentração de 0,25% (V/V). Além disso, o carvacrol é conhecido por ser tóxico para as células de mamíferos em concentrações elevadas. Pode induzir a morte celular de células CaCo-2 e reduzir a proliferação e viabilidade de células Hep-2. O tratamento de células epiteliais do intestino de suíno com  $>5$  mM de carvacrol quebrou a função da sua barreira epitelial e inibiu a proliferação *in vitro* de linfócitos e células epiteliais intestinais suínas.

Por outro lado, foram observados efeitos protetores do DNA com carvacrol em células de mamíferos cultivadas *in vitro* e o linalol foi recentemente relatado como seguro e sem toxicidade. De facto, o efeito de OEs sobre a viabilidade de células eucarióticas é um importante pré-requisito para a aplicação em cosméticos e produtos de saúde. Os resultados demonstram a ausência de citotoxicidade dos OEs de *T. zygis* subsp. *sylvestris* nas células dendríticas de pele de rato, em concentrações que mostram atividade antifúngica significativa [18].

Noutro estudo de PINTO et al. [19] foram estudadas a composição e a atividade antifúngica do OE de *Thymus villosus* subsp. *lusitanicus* e os seus componentes principais contra leveduras clinicamente relevantes. O OE das partes aéreas da planta, obtido por hidrodestilação, apresentou teores elevados de acetato de geraniol e terpineno-4-ol e, em menor percentagem, de linalol e geraniol. As concentrações mínimas inibitórias (MICs)

foram medidas de acordo com os protocolos de referência de macrodiluição do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). As concentrações mínimas fungicidas (MFCs) foram determinadas por subcultura posterior das mesmas suspensões celulares em meio sólido. A inibição da formação de tubos germinativos e a influência do OE na integridade da membrana citoplasmática, analisados por citometria de fluxo, também foram investigados em *Candida albicans*. Para além disso foi estudado o efeito do OE sobre a função mitocondrial. O acetato de geraniol e o geraniol exibiram baixo MIC e valores semelhantes de MFC contra dermatófitos e *Cryptococcus neoformans* (0,04 - 0,64  $\mu\text{L/mL}$ ), enquanto o terpinen-4-ol mostrou uma atividade mais fraca (1,25 - 2,5  $\mu\text{L/mL}$ ).

As espécies de *Aspergillus* são provavelmente mais resistentes que os outros fungos estudados e a atividade fungicida do OE contra estes bolores pode ser devida ao terpinen-4-ol, em vez do geraniol e do acetato de geraniol. O linalol apresentou atividade fraca contra todas as estirpes testadas. Em relação às espécies de *Candida*, os perfis de suscetibilidade ao OE foram diversificados e não se apresentaram diretamente correlacionados com padrões de suscetibilidade ao fluconazol. Além disso, a inibição da forma de transição micela-levedura foi demonstrada em concentrações sub-inibitórias do OE em *C. albicans* ATCC 10231.



**Figura 3** - Percentagem de formação de tubos germinativos de três estirpes de *C. albicans* (ATCC 10231, D5 e M1) incubadas com concentrações sub-inibitórias ( $\mu\text{L/mL}$ ) do OE de *Thymus villosus*. Os resultados estão apresentados em valores de média ( $\pm$  DP) de três ensaios independentes. As amostras não tratadas incluíram 1% de DMSO [19].

Os resultados revelaram que a atividade fungicida do OE é provavelmente devida, pelo menos em parte, à sua capacidade para causar paragem metabólica rápida e rutura da membrana plasmática. A produção e o rendimento do OE de *T. villosus* e a sua ampla

atividade fungicida são compatíveis com uma utilização industrial, particularmente para fins farmacêuticos, terapêuticos e de conservação de alimentos [19].

Tendo em conta a importância das infeções fúngicas e as dificuldades encontradas no seu longo tratamento, muitos cientistas têm prestado atenção a extratos isolados de espécies vegetais utilizadas em medicamentos à base de plantas. Uma ampla variedade de óleos essenciais é conhecida por possuir atividade antifúngica. O carácter lipofílico do esqueleto do hidrocarboneto dos constituintes dos OEs é de principal importância na sua ação antimicrobiana.

### **3.2. *Eucalyptus spp.***

O *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, é um género nativo da Austrália que compreende cerca de 900 espécies e subespécies. Tem sido utilizado na medicina popular em todo o mundo, pelo que as propriedades medicinais destas plantas têm sido investigadas. Esta família é uma importante fonte de OEs com uma ampla gama de atividades biológicas, tais como antibacteriana, antifúngica, antisséptica, analgésica, antipirética e anti-inflamatória, e uma longa história de uso contra os efeitos de constipações, gripe e outras infeções respiratórias, rinite e sinusite. Estes óleos podem ser encontrados nas folhas de mais de 300 espécies deste género e menos do que 20 destas já estão a ser exploradas comercialmente para a produção de óleos essenciais ricos em 1,8-cineol pelas indústrias farmacêuticas e cosméticas. Os óleos essenciais são os produtos odoríferos e voláteis do metabolismo secundário de uma planta aromática, que estão muitas vezes concentrados num determinado órgão da planta, como folhas, caules, cascas ou frutas e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, 300 das quais são comercialmente importantes especialmente para as indústrias farmacêutica, agronómica, alimentar, sanitária, cosmética e perfumaria [20]

O *E. globulus* é admirado por estas propriedades, sendo por isso cultivado em regiões subtropicais e do Mediterrâneo mais do que outras espécies [21].

Com efeito, os estudos são focados em algumas espécies de eucalipto, especialmente no *Eucalyptus globulus*, cujo OE tem mostrado ter um amplo espectro de actividade antimicrobiana. Efetuou-se o primeiro estudo com o objetivo de investigar as propriedades antimicrobianas e os efeitos sinérgicos de OEs e extratos de *E. globulus* incorporados a um antibiótico comercial contra isolados de infeções do trato respiratório por *P. aeruginosa* [6].

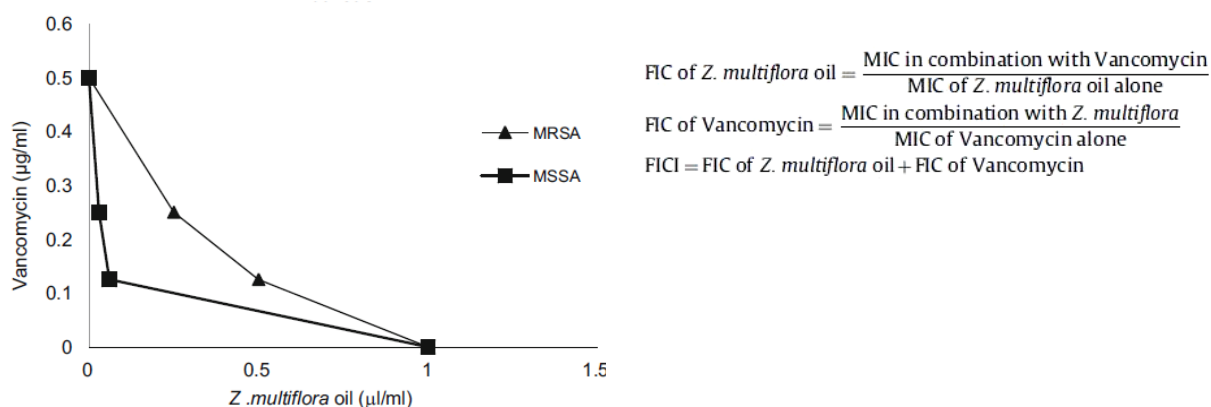


O óleo essencial de eucalipto, referenciado na Farmacopeia Portuguesa, obtém-se por destilação das folhas, ou ramos terminais, jovens, de várias espécies de eucalipto ricas em 1,8-cineol, nomeadamente *Eucalyptus globulus* Labill. (= *E. polybractea* R. T. Baker) e *E. smithii* R. T. Baker. A norma nacional, à semelhança das internacionais, determina um teor mínimo de 1,8-cineol (também designado eucaliptol) de cerca de 70% no óleo essencial. Este óleo essencial, de tipo medicinal pode ser comercializado puro, ou, sob a forma de rebuçados, em elixires para saúde oral, em pomadas ou em formulações com outros óleos essenciais ou ainda em vaporizadores. Nestas diversas formas, o óleo essencial é utilizado interna e externamente no alívio das afeções das vias respiratórias e, externamente, para rejuvenescimento da pele, no combate à acne e no atenuar das dores reumáticas, devido às propriedades anti-inflamatórias. Quando utilizado para fins medicinais, é importante ter em atenção as doses terapêuticas recomendadas, no sentido de evitar efeitos secundários indesejados, designadamente alterações do ritmo cardíaco e/ou dermatites de contacto.

### **3.3. *Zataria multiflora***

*Z. multiflora* Boiss pertence à família Lamiaceae e só cresce no Irão, Paquistão e Afeganistão. Esta planta tem sido usada tradicionalmente como um condimento, antisséptico, carminativo, diurético e anti-espasmódico e tem-se encontrado utilidade para o tratamento de dor pré-menstrual, asma, icterícia, dor de garganta e edema. A *Z. multiflora* tem sido creditada com atividades medicinais significativas, incluindo imunoestimulante, analgésica, antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, anticandida e antifúngica. Os principais componentes do óleo de *Z. multiflora* são compostos fenólicos como o timol e o carvacrol. Uma vez que a quantidade de cada um dos componentes do óleo influencia a atividade antimicrobiana, foi analisada primeiro a composição química do OE e, em seguida, avaliada a sua atividade antimicrobiana em isolados clínicos de *S. aureus*. A atividade sinérgica do óleo em combinação com a vancomicina foi também testada em dois isolados clínicos de *S. aureus*.

Os valores de MIC e MBC do óleo foram determinados pelo ensaio de microdiluição. No teste de título de placa para *S. aureus* foram preparadas oito séries e duas diluições do óleo de *Z. multiflora* e vancomicina e utilizadas nos testes de MIC e foram calculadas as concentrações inibitórias fracionais (FICs). O indicador FIC foi o FIC do óleo e da vancomicina, sendo interpretado como mostrando efeito sinérgico quando  $\leq 0.5$ , indiferente entre 0,5 e 2 e antagonista quando  $> 2.0$ . O efeito sinérgico é representado graficamente pela aplicação de análise isobográfica.



**Figura 4** – Curva isoblográfica, revelando o efeito sinérgico do óleo de *Z. multiflora* e vancomicina contra MRSA e MSSA, e cálculo do índice FIC (FICI) [11].

Os maiores componentes do óleo foram o timol (38,7%), carvacrol (15,3%) e  $\rho$ -cimeno (10,2%) seguido pelo  $\gamma$ -terpineno (9,8%),  $\alpha$ -pineno (4,6%) e trans-cariofileno (3,1%). A composição química do óleo de *Z. multiflora* inclui timol (48,4%),  $\rho$ -cimeno (13,5%), carvacrol (12,5%), linalol (5,2%) e  $\gamma$ -terpineno (3,9%), enquanto o óleo volátil da planta contém carvacrol (37%),  $\rho$ -cimeno (15%) e timol (3,3%). O timol é o composto de destaque no OE de *Z. multiflora*, seguido pelo carvacrol e  $\rho$ -cimeno.

Treze estirpes diferentes de *S. aureus*, incluindo MRSA e MSSA foram utilizadas para avaliar a possível atividade antiestafilocócica do óleo de *Z. multiflora*. O óleo exibiu atividade anti-estafilocócica contra todas as estirpes de *S. aureus* com valores de MIC e de MBC na faixa de 0,25 - 1 a 0,5 - 2  $\mu\text{l/ml}$ , respetivamente. Os valores de MIC e MBC de vancomicina contra estirpes de *S. aureus* foram de 0,5 - 1 e 0,5 - 2  $\mu\text{g/ml}$ .

O timol e carvacrol, como principais componentes fenólicos de OE de *Z. multiflora*, parecem ser responsáveis pelos efeitos anti-estafilocócicos do óleo, como mostrado com *Oliveria decumbens*.

O índice FIC (Fractional Inhibitory Concentration) é amplamente aceite para avaliar ações sinérgicas *in vitro* entre os diferentes antibióticos. O valor de MIC da vancomicina contra MSSA foi reduzido de 1 a 0,125  $\mu\text{g/ml}$  quando o óleo foi adicionado a uma concentração de 0,06  $\mu\text{l/ml}$ . Os FICs do óleo de *Z. multiflora* em combinação com vancomicina contra MSSA foram 0,06 e 0,125 para a vancomicina. O óleo demonstrou sinergismo marcado com a vancomicina em MSSA. O FIC foi calculado como 0,2 para o óleo e 0,12 para a vancomicina em MRSA. Assim, a ação conjunta do óleo e da vancomicina pode levar ao desenvolvimento de uma nova combinação de antibióticos contra infeções por MRSA [11].

Combinações	MSSA		MRSA	
	FIC	FICI	FIC	FICI
Óleo de <i>Z. multiflora</i> - Vancomicina	0,06	0,185	0,25	0,32
	0,125		0,12	

Tabela I - Concentrações Fracionais Inibitórias (FIC) e índices FIC (FICI) [11].

### 3.4. *Melaleuca alternifolia*

Durante milhares de anos, as propriedades terapêuticas dos óleos essenciais foram reconhecidas por aborígenes australianos, que usaram cataplasmas da árvore do chá para tratar variadas infecções, feridas e picadas de insetos. Os óleos da árvore do chá foram logo adotados pelos colonizadores e foram comercializados como um germicida medicinal do século XX [1].

O interesse por medicamentos alternativos, principalmente os provenientes de extratos naturais, tem aumentado nas últimas décadas. A *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae), popularmente conhecida como a árvore de chá, é um arbusto cujo principal produto é o OE (TTO - tea tree oil), de grande importância medicinal por possuir comprovada ação bactericida e antifúngica contra diversos patógenos humanos. Em virtude da atividade terapêutica em diversas especialidades médicas, o TTO passou também a ser empregue na área odontológica. A revisão de literatura de OLIVEIRA [22] foi realizada com o objetivo de discutir os ensaios já realizados com o TTO contra microrganismos relacionados com a doença infectocontagiosa cárie, doença periodontal e problemas pulpares. O óleo de *Melaleuca* tem demonstrado boa ação antibacteriana *in vitro* contra microrganismos bucais, porém, pesquisas envolvendo o estudo do mecanismo de ação sobre as células microbianas ou estudos *in vivo* ainda são escassos e precisam de ser realizados, já que esse produto pode ser útil na odontologia, seja na manutenção química da higiene ou na prevenção de doenças bucais [22].

Atualmente são esperados agentes de diferentes classes químicas com diversos mecanismos de ação para atenuar o problema disseminação de resistência aos agentes existentes. Uma possibilidade é o óleo da árvore do chá (TTO), que tem largo espectro de atividade *in vitro* contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo organismos resistentes aos antimicrobianos e multirresistentes. As MICs variam geralmente entre 0,12 - 0,5% e as MBCs variam de 0,12 - 1%. É utilizado como um agente antimicrobiano tópico e o seu uso para a descolonização de portadores de MRSA tem atraído especial atenção.

Vários componentes do chá demonstraram contribuir para a sua atividade antibacteriana. Estes incluem o terpinen-4-ol, 1,8-cineol, linalol, e alfa-terpineol. Estes componentes, em particular o terpinen-4-ol, mostraram afetar desfavoravelmente a integridade estrutural da parede celular bacteriana. Após a exposição ao TTO, o *S. aureus* demonstra uma perda de iões de potássio e de tolerância ao sal, bem como o desenvolvimento e a presença de estruturas semelhantes ao mesossoma das bactérias procariotas, visíveis por microscopia eletrónica. A inibição da respiração dependente de glucose também já foi demonstrada em bactérias a ele expostas. Um estudo também demonstrou que o TTO possui efeitos imunomoduladores e promove a diferenciação monocítica *in vitro*. Outros estudos têm demonstrado que o principal componente do óleo da árvore do chá, o terpinen-4-ol, suprime a produção de mediadores inflamatórios por monócitos ativados *in vitro*. Este facto pode explicar as propriedades anti-inflamatórias observadas clinicamente e corroborar ajuda que confere na cura de feridas crónicas.

Enquanto o TTO tem sido relatado como geralmente bem tolerado, pouco se sabe sobre a farmacocinética sistémica ou farmacodinâmica de OEs em seres humanos. Além disso, as informações disponíveis sobre a toxicidade estão limitadas a estudos *in vitro* sobre linhagens de células ou relatos de casos clínicos. Também há pouca informação sobre os mecanismos de toxicidade. No entanto, podem ser encontrados na literatura relatos de toxicidade sistémica, como casos de dermatite alérgica de contato relacionados com o eucaliptol [1].

Têm também surgido relatórios que sugerem que a exposição ao TTO pode contribuir para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana em patógenos humanos [8,9]. Questões semelhantes têm perseguido a promoção de produtos que contêm triclosano (2,4,4'-triclora-2'-hidroxidifeniléter) e compostos de amónio quaternário para uso em ambientes domésticos e cuidados pessoais. Como o triclosano, o óleo da árvore do chá também está amplamente disponível numa grande gama de produtos de higiene pessoal e cosméticos de venda livre. Portanto, é importante esclarecer se a exposição das bactérias a níveis sub-inibitórios de TTO altera a suscetibilidade a outros agentes antimicrobianos.

O objetivo do estudo de THOMSEN et al. [23] foi fornecer dados adicionais sobre a suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus spp.* após a habituação a baixos níveis do agente antimicrobiano tópico TTO. MRSA, MSSA e *Staphylococcus coagulase-negativa* (CoNS) foram habituados a 0,075% de TTO durante 3 dias. Subsequentemente, a suscetibilidade de cada um dos isolados ao ácido fusídico, mupirocina, cloranfenicol, linezolida e vancomicina foi avaliada por E-test e a suscetibilidade do TTO, terpinen-4-ol, carvacrol e triclosano foi determinada por diluição em agar. Depois da habituação a 0,075% de TTO, as MICs

antimicrobianas diferiram 33 vezes (em 150 possíveis) entre o controlo e os isolados habituados, com MICs superiores em isolados habituados em 22 ocasiões. Utilizando os critérios de *breakpoint* clínico, um isolado de MSSA altera a sua categoria de vancomicina-suscetível (MIC = 2 µg/mL) para suscetibilidade intermédia (MIC = 3 µg/mL) depois da habituação numa de duas repetições. Para os agentes antimicrobianos que não são antibióticos, as MICs dos isolados habituados diferiram em 12 ocasiões (em 120 possíveis) dos controlos, em 10 ocasiões nos MRSA e em 2 ocasiões nos MSSA. As MICs foram maiores para isolados habituados em cinco ocasiões. No entanto, todas as diferenças se verificaram numa única diluição em série e não foram considerados como significativas. A habituação a concentrações sub-letais de TTO levou a pequenas mudanças nas MICs dos agentes antimicrobianos, que não foram clinicamente relevantes pois apenas se verificou um caso de aumento da MIC não significativo. Não houve nenhuma evidência que sugira que o TTO induz resistência a agentes antimicrobianos [23].

### 3.5. *Quercus suber*

Os biopolímeros têm muitas vezes propriedades únicas de considerável interesse como uma base para novos materiais. Contudo, a forma de os extrair a partir de plantas sem destruir o seu esqueleto químico e as propriedades inerentes não é evidente.

Num estudo de GARCIA et al. [24] foi relatada a reconstituição *ex situ* do biopoliéster suberina como um novo material impermeável e antimicrobiano. A suberina, uma rede reticulada de monómeros aromáticos e alifáticos, estabelece nas paredes celulares do sobreiro (*Quercus suber*) uma proteção hidrofóbica e uma barreira antimicrobiana. Recentemente, conseguiu-se extrair suberina a partir da parede da célula da planta com o líquido iónico hexanoato de colina. Durante a extração a estrutura tridimensional nativa da suberina foi parcialmente preservada.

Neste estudo, foi demonstrado que essa preservação é a chave para a sua reconstituição *ex situ*. Sem quaisquer aditivos químicos ou purificação, as macromoléculas que compõem a suberina associam-se sobre a superfície de vazamento e formam uma película. Os filmes de suberina obtidos mostram propriedades de barreira semelhantes às da suberina nas plantas, incluindo um efeito bactericida potencialmente amplo.

Para avaliar a viabilidade bacteriana durante a exposição aos filmes suberina, foram coletadas aliquotas (1 mL) da cultura (incluindo culturas controlo) em diferentes pontos do tempo de incubação e as células foram marcadas com iodeto de propídio e diacetato de fluoresceína 15 min à temperatura ambiente, com agitação. Foram observadas células

bacterianas por microscopia de fluorescência. No final da incubação, foram recuperados filmes de suberina, secos a 50 ° C, e a sua superfície foi analisada. Utilizaram-se testes de difusão em agar padrão para avaliar as propriedades de lixiviação dos filmes de suberina. Todas as experiências foram repetidas utilizando os materiais de controlo, ou seja, o poli(ácido láctico) (PLA) e polietileno (PET), incubados previamente com hexanoato de colina (ver anexo I)[15].

### 3.6. Outros

Um estudo de WARNKE et al. [2] permitiu avaliar a eficácia antibacteriana de três óleos essenciais selecionados com comprovadas propriedades antimicrobianas sobre uma ampla gama de isolados clínicos de agentes patogénicos normalmente adquiridos no hospital e encontrado com frequência em enfermarias cirúrgicas: MRSA, VRE, *P. aeruginosa* MR, *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs.

Para o grupo de teste foram selecionados os óleos essenciais de capim-limão, de eucalipto e da árvore do chá. Os óleos não foram diluídos e nem quimicamente alterados por nenhum solvente ou processamento. Foram fornecidos pela *Felton Grimwade & Bosisto's Pty Ltd*, FGB, Melbourne, na Austrália. Os efeitos antibacterianos dos óleos essenciais foram comparados com os do grupo controlo, composto por azeite doméstico não diluído, bem como os antissépticos clínicos normalmente utilizados etanol (70%) e cloro-hexidina (0,1%).

Para a avaliação, foram medidos os diâmetros das zonas de inibição do crescimento de bactérias em torno dos discos de teste. Os procedimentos de teste e medição foram ocultados, portanto os microbiologistas não receberam nenhuma informação sobre as substâncias que foram testadas.

Cada teste foi repetido três vezes. Foi medido o diâmetro total de inibição, incluindo os discos de 6 mm de diâmetro de filtro. A zona normalizada de inibição foi calculada como o diâmetro de inibição menor que 6 mm. Os valores médios da zona efetiva de inibição foram calculados e apresentado pelo óleo essencial e estirpe bacteriana.

Todos os óleos essenciais testados apresentaram boa atividade bactericida contra estirpes de VRE, MRSA, *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs, enquanto apenas o óleo da árvore do chá demonstrou atividade notável contra as estirpes multirresistentes (MR) de *P. aeruginosa*. No OE de capim-limão verificaram-se as maiores zonas de inibição de todas as substâncias contra VRE (13 - 18 mm) e MRSA (20 - 29 mm), contudo mostraram inibição relativamente moderada contra as estirpes de *E. coli* produtora de ESBLs (2 - 13 mm) e má inibição contra *P. aeruginosa* MR (0 - 2 mm) e *Klebsiella* produtora de ESBLs (2 - 4 mm). O

OE da árvore do chá demonstrou as maiores zonas de inibição de todas as substâncias contra isolados produtores de ESBL de *E. coli* (12 - 15 mm), *K. pneumoniae* (11 - 15 mm) e *P. aeruginosa* (1 - 8 mm), no entanto mostraram inibição relativamente moderada contra outros patógenos. O óleo de eucalipto não é em nenhum caso, o inibidor mais potente, no entanto, teve um desempenho relativamente moderado contra todos os patógenos. A sua maior zona de inibição foi contra MRSA (8 - 14 mm).

As substâncias do grupo de controlo não demonstraram em nenhum caso melhor atividade bactericida do que a melhor substância no grupo de teste. A cloro-hexidina foi consistentemente o inibidor mais potente, com uma gama de 1 - 10 mm sobre todos os patógenos. O etanol a 70% demonstrou uma gama de 0 - 4 mm e o azeite demonstrou uma inibição máxima de 2 mm.

Neste estudo, a suscetibilidade dos isolados clínicos aos óleos essenciais em causa foi comprovada *in vitro*. Os três óleos essenciais testados demonstraram atividade antimicrobiana consistente. Os antissépticos utilizados normalmente na prática clínica não demonstraram tais efeitos bactericidas dominantes contra qualquer um dos patógenos testados. De realçar que o óleo de capim-limão provou ser particularmente ativo contra bactérias gram-positivas, enquanto o óleo da árvore do chá mostrou inibição superior de microrganismos Gram-negativos.

Uma crítica comum ao uso de óleos essenciais é que são normalmente diluídos em etanol, o que permite que sejam utilizados através de recipientes em *spray*, aumentando a volatilidade do óleo e, assim, o seu aroma. Argumenta-se que qualquer efeito antibacteriano da solução é derivado desse solvente em vez do óleo essencial. Para contrariar esta situação, foram utilizados neste estudo apenas óleos não diluídos. Além disso, deve notar-se que a experiência incluiu etanol 70% como um controlo, que demonstrou atividade inibidora significativamente menor do que os OEs testados. Portanto, pode concluir-se que a atividade antimicrobiana primária advém do próprio OE e apenas parcialmente do solvente. Como a maioria dos OEs tem demonstrado consistentemente zonas de inibição superiores às do etanol a 70% por si só, é mais provável que este efeito seja devido aos óleos.

Outra crítica frequente é que essa ação bactericida se deve a um simples efeito físico-químico de um meio oleoso em membranas microbianas num ambiente dentro de água. Se fosse o caso, então todos os óleos deveriam ter propriedades inibidoras semelhantes. Portanto, o forte efeito antibacteriano comprovado é altamente improvável devido a este efeito físico-químico, mas é devido sim a um verdadeiro efeito farmacológico.

Os mecanismos subjacentes à ação antibacteriana dos óleos essenciais permanecem pouco compreendidos, mas alguns componentes do óleo da árvore do chá têm

demonstrado possuir propriedades bactericidas discretas, incluindo o terpinen-4-ol, 1,8-cineol, terpinoleno e  $\alpha$ -terpineol. Estas substâncias demonstraram causar degradação da parede celular bacteriana e uma diminuição da tolerância osmótica.

Clinicamente, os óleos da árvore do chá estão relatados como bem tolerados em aplicações tópicas e vapores. O OE de capim-limão demonstra, de longe, a maior eficácia contra as estirpes de MRSA e VRE testadas e está a começar a ser cada vez mais investigado como um agente antibacteriano. Tem sido demonstrada eficácia contra estirpes clinicamente isoladas de MRSA, bem como a eficácia contra MRSA e VRE quando entregues em fase de vapor [2].

Noutro estudo de WARNKE et al. [1] com o objetivo de avaliar a eficácia antibacteriana e antimicótica de diferentes OEs sobre isolados frequentes e estirpes bacterianas nosocomiais através do teste de difusão em ágar, foram selecionados para análise os OEs puros de plantas de diferentes países, que não foram diluídos nem quimicamente modificados por nenhum solvente ou processamento.

Para comparar os efeitos antibacterianos de óleos essenciais com outros óleos, o azeite, a parafina industrial e os antissépticos convencionais, tais como o etanol (70%), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (3%), a cloro-hexidina (0,1%) e a iodopovidona, serviram como controlos.

Várias estirpes de estafilococos e estreptococos, bem como espécies de *Candida* foram testados quanto à sua capacidade para crescer na presença de óleos essenciais e antissépticos. Os isolados foram microrganismos patogénicos comuns que causam infeções orais, dentárias ou cutâneas. Além de várias isolados adquiridas no hospital, como MRSA e *C. krusei*, também foram testadas estirpes de referência disponíveis comercialmente *American Type Culture Collection* (ATCC). Os efeitos inibidores foram classificados como nulos em diâmetros das zonas de inibição do crescimento de bactérias menores que 7 mm.

Com exceção do sândalo e da toranja, todos os OEs testados apresentaram boa atividade antibacteriana e antifúngica contra estirpes normalmente responsáveis por infeções da mucosa oral e da derme. As maiores zonas efetivas de inibição foram verificadas nos OEs de tomilho branco, limão, capim-limão e canela, respetivamente (ver Figura 11). Estes quatro OEs apresentaram efeitos antibacterianos consistentes contra todas as estirpes testadas, incluindo problemáticas como MRSA e *C. krusei*. O OE de sândalo mostrou boa eficácia contra as bactérias testadas, mas não contra as estirpes de *Candida*.

Relativamente aos controlos, o etanol na concentração de 70% produziu zonas de inibição com o máximo de 9 mm de diâmetro, enquanto o azeite e a parafina não tiveram



zona eficaz. A iodopovidona, a cloro-hexidina e o  $H_2O_2$  demonstraram zonas efetivas de 14 – 16 mm e, assim, a inibição de bactérias e da propagação de *Candida*.

Vários estudos demonstraram que os OEs não só são bem tolerados, como também possuem valor terapêutico no tratamento de acne, caspa, piolhos e herpes labial recorrente. O OE da árvore do chá também tem sido demonstrado como eficaz contra bactérias patogênicas orais e candidíase orofaríngea. Foi testada a inibição do crescimento de bactérias responsáveis por cárie e doenças periodontais com os OEs de Manuka, árvore do chá, *Eucalyptus*, *Lavandula* e *Rosmarinus*. Os dois primeiros, em particular, tiveram uma forte atividade antibacteriana. Neste estudo foi comprovada *in vitro*, a sensibilidade para os óleos essenciais de várias bactérias patogênicas e fungos isolados da cavidade oral e da pele. Doze dos treze óleos essenciais testados demonstraram atividade antimicrobiana eficaz contra estirpes bacterianas e de *Candida*.

Outro estudo avaliou a atividade antibacteriana de OEs de 21 plantas contra quatro espécies de bactérias gram-negativas, *E.coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, e duas bactérias gram-positivas, *Bacillus subtilis* e *S. aureus*. A maioria dos óleos apresentou atividade antibacteriana, mas destacaram-se os OEs de canela, cravo-da-Índia e limão que inibiram tanto bactérias gram-positivas como gram-negativas.

A iodopovidona,  $H_2O_2$  e cloro-hexidina produziram zonas claramente visíveis de inibição, entre 14 e 16 mm. Estes antissépticos são comumente usados na cavidade oral. Os outros controlos, incluindo azeite e parafina não resultaram num efeito bacteriostático ou bactericida. Portanto, o efeito antimicrobiano dos OEs não é devido a um simples efeito físico-químico de um meio oleoso em membranas microbianas. Caso contrário, o azeite ou o óleo de parafina deviam ter tido um efeito inibidor sobre os microrganismos.

Quatro óleos demonstraram zonas de inibição excepcionais de 16-50 mm: os de tomilho branco, limão, erva-cidreira e canela. Nenhum padrão antisséptico no grupo controlo demonstrou tais efeitos inibidores dominantes. Nos testes de difusão em agar, o tamanho da zona inibidora eficaz depende da solubilidade e características de difusão das substâncias a serem testadas, o que dificulta a comparação dos diferentes tipos de óleos ou controlos. Portanto, os resultados deste estudo podem não refletir diretamente a medida do potencial antimicrobiano destes óleos essenciais, são apenas um teste de *screening*. Mas uma vez que estas zonas eficazes foram claramente visíveis, constituem uma prova da sua eficácia antimicrobiana.

Em contraste com os antibióticos convencionais, a maioria da OEs mostrou notável eficácia contra todas as bactérias testadas. As bactérias de teste eram estirpes de referência e isoladas a partir de pacientes hospitalizados. O *S. aureus* é encontrado normalmente em

abscessos, mas não nos de origem odontogénica. Em abscessos dento-alveolares e da orofaringe, os *Streptococcus viridans* desempenham um papel dominante. Estes foram também suscetíveis aos óleos testados. O *Streptococcus a-hemolítico* isolado de um paciente hospitalizado pode causar graves inflamações. O *Staphylococcus epidermidis* é frequentemente isolado de cateteres IV contaminados e substituições de válvulas artificiais do coração e é muitas vezes difícil de tratar com antibióticos comuns. É importante destacar o facto de que o MRSA foi sensível aos óleos essenciais testados. Isto tem implicações clínicas importantes, pois estas estirpes resultam numa redução significativa da qualidade de vida dos doentes afetados e necessitam de cuidados específicos para os familiares e o pessoal da clínica. O óleo da árvore do chá (TTO) tem sido avaliado como uma alternativa tópica de agente de descolonização de MRSA. O óleo da árvore do chá a 4% numa pomada nasal e a 5% num gel de lavagem do corpo foram comparados com o tratamento padrão de pomada de mupirocina 2% nasal e triclosano na lavagem do corpo em pacientes com colonização da pele por MRSA. O TTO foi mais eficaz do que a tratamento padrão e foi melhor tolerado pelos pacientes.

Já foi relatada a utilidade clínica significativa de óleos essenciais, muito bem-sucedida na redução do mau cheiro causado pela ulceração de tumores, na promoção da cicatrização de feridas, com efeitos anti-inflamatórios no tratamento de úlceras infetadas e ligeira re-epitelização no cancro maxilofacial, da cabeça e do pescoço. Também foi reportada a utilização de uma mistura de óleo de eucalipto australiano e outros óleos essenciais para o tratamento percutâneo de dois pacientes com osteomielite causada por MRSA que não tinha sido resolvida com cirurgia ou recurso a vários antibióticos. A mistura de OEs foi aplicada diariamente com sinais visíveis de cura passados apenas alguns dias. Depois de algumas semanas, as feridas curaram, os sintomas ficaram resolvidos e as culturas limpas.

Ambos os estudos *in vitro* e os estudos de caso fornecem evidência a favor do uso adjuvante de OEs no tratamento de feridas. Os estudos *in vitro* mostraram boa atividade microbida de OEs contra *S. aureus*. Há também relatos de casos que descreveram resultados promissores no tratamento da tuberculose pulmonar. Combinados, estes estudos apresentam provas convincentes de que os OEs podem ser uma possível terapia para o tratamento de infeções localizadas, mesmo com estirpes graves difíceis de tratar.

Os óleos são baratos e estão disponíveis em todo o mundo. Há patógenos significativos que são suscetíveis a uma ampla variedade de OEs, como provado no presente estudo. No entanto, há uma série de obstáculos à sua aceitação na prática clínica geral. Os constituintes químicos de produtos derivados de plantas muitas vezes variam, tornando a padronização difícil. Adicionalmente, não existe um método padronizado e validado para

testar o efeito destes produtos, o que torna difícil estabelecer a eficácia *in vitro* de acordo com orientações da FDA. Além disso, os OEs variam no seu conteúdo de componentes ativos. Têm-se encontrado diferenças notáveis na atividade antimicrobiana entre OEs do mesmo tipo, mas de diferentes produtores. Além disso, a família de plantas é importante. Para além disso, um óleo da árvore do chá pode não ser equivalente a um óleo de outra árvore do chá, visto que há diferenças entre óleos derivadas do seu clima de crescimento. Por exemplo, o óleo de limão do Nepal mostrou zonas de inibição de 16 a 43 mm, enquanto o óleo de limão da Austrália só demonstrou zonas de inibição de 8 a 16 mm. Assim, os OEs podem não ser adequados como medicação única contra infeções graves devido às suas mudanças de composição. Portanto são necessários estudos farmacêuticos adicionais focando os teores de óleo e a determinação dos ingredientes ativos relativos às substâncias químicas [1].

#### 4. Conclusão

No paradoxo em que vivem atualmente os sistemas de saúde a nível mundial, com um aumento da resistência aos antibacterianos, uma diminuição do número de novas moléculas com atividade antimicrobiana relevante e consequente aumento da morbidade, mortalidade e incremento dos custos dos cuidados em saúde, é importante a descoberta de novas opções terapêuticas.

Como comprovado *in vitro*, os óleos de origem vegetal representam uma opção eficaz e mais barata de tratamento antimicrobiano e de apoio ao tratamento cirúrgico contra infeções multirresistentes, pelo que constituem uma boa aposta de futuro nesta área [1].

Nesta revisão consta a primeira demonstração da atividade antifúngica potente de *T. zygis* subsp. *sylvestris* contra estirpes de dermatófitos, o que justifica o grande uso desta planta na medicina tradicional. Seria muito útil promover a cultura baseada no quimiotipo de carvacrol para respetiva colheita e aproveitamento medicinal, no intuito de garantir um produto final de qualidade. No entanto, é necessária uma investigação mais aprofundada para avaliar a adequação das suas notáveis propriedades antifúngicas em aplicações práticas, nomeadamente em doenças fúngicas que envolvem a mucosa, infeções cutâneas e também como uma alternativa à síntese de fungicidas [2].

O sinergismo entre antibióticos de síntese química e extratos de plantas também se tem verificado. É muito importante continuar a investigar o comportamento sinérgico de produtos naturais com vancomicina na esperança de melhorar os seus resultados. A ação sinérgica com a vancomicina demonstrou o potencial uso do óleo de *Z. multiflora* para melhorar a ação deste antibiótico de última linha. A sua aplicação clínica pode ser útil, mas são necessárias pesquisas adicionais para avaliar o valor terapêutico na prática.

Como se pode observar pelos resultados obtidos, VRE, MRSA, *P. aeruginosa* MR, *E. coli* e *Klebsiella pneumonia* produtoras de ESBLs são sensíveis a uma gama de óleos derivados de plantas, que podem ser uma força promissora de apoio ao tratamento tópico no caso de infeções persistentes e multirresistentes no panorama clínico atual.

Agora talvez seja a vez de a medicina aproveitar as propriedades da árvore que é símbolo nacional, o sobreiro (*Quercus suber*), e do abundante eucalipto para ajudar a curar feridas.

Apesar destas vantagens, existem algumas barreiras para a aceitação mais ampla do uso de OEs na prática clínica. A sua padronização e definição continuam a ser um desafio para uma aplicação mais generalizada, visto que preparações do mesmo óleo podem ter diferenças significativas na composição decorrentes das condições ambientais de

crescimento da planta. Isso deve-se não só à variação inata em produtos derivados de plantas, mas também à grande variedade de espécies que caem sob a égide de uma única família de plantas. Por exemplo, capim-limão refere-se a mais de 55 gramíneas diferentes da família *Cymbopogon*, encontrada em todo o sudeste da Ásia e Oceânia, o que torna a padronização do produto problemática. Até serem realizados estudos de atividade adicionais para individualizar melhor os componentes ativos dos óleos em questão, a sua aprovação regulamentar generalizada permanece improvável [2].

No contexto atual é importante canalizar recursos para uma opção mais acessível que as existentes e menos suscetível de perda de eficácia. O tratamento de infecções é vital para a saúde humana e animal, pelo que deve ser protegido e preservado. O comprometimento da terapêutica poderá levar a consequências globais imensuráveis, dadas as especificidades em países desenvolvidos e em desenvolvimento, com exigências próprias de controlo da disseminação de resistências. O farmacêutico, para além de ser um profissional de saúde com capacidade científica para a sua análise, tem também um conhecimento farmacológico capaz de liderar na consciencialização da população para estas situações e para a sua prevenção.

Cabe ao farmacêutico o facto de não esquecer o seu papel fundamental no desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas que contribuam para uma melhor compreensão dos problemas atuais e sua resolução, pois a sua formação é completa e dotada de bases científicas eficazes para conseguir edificar novos caminhos para a melhoria da saúde humana e ambiental.

## 5. Bibliografia

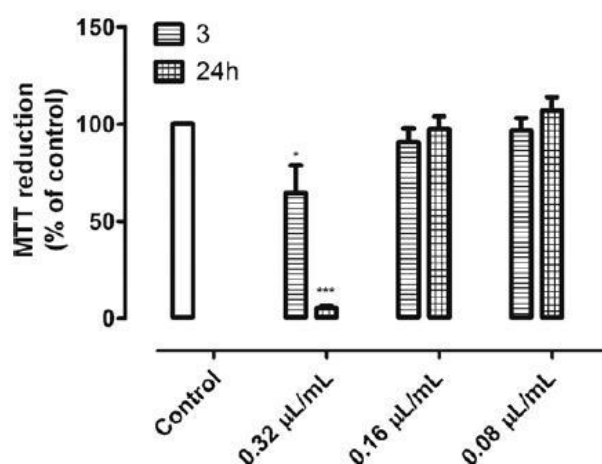
1. WARNKE P.H., BECKER S.T., PODSCHUN R., SIVANANTHAN S., SPRINGER I.N., RUSSO P.A., WILTFANG J., FICKENSCHER H., SHERRY E. - **The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections**, Journal of Cranio-Maxilofacial Surgery 37 (2009) 392 – 397.
2. WARNKE, P. H., LOTT A.J., SHERRY E., WILTFANG J., PODSCHUN R. - **The ongoing battle against multi-resistant strains: *In vitro* inhibition of hospital-acquired MRSA, VRE, Pseudomonas, ESBL E. coli and Klebsiella species in the presence of plant-derived antiseptic oils**, Journal of Cranio-Maxilofacial Surgery 41 (2013) 321 – 326.
3. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance, World Health Organization 2014** [acedido a 30 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1)
4. **OMS publica relatório global sobre as resistências aos antimicrobianos** [acedido a 30 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.dgs.pt/em-destaque/oms-publica-relatorio-global-sobre-as-resistencias-aos-antimicrobianos.aspx>
5. **Para a OMS, resistência de bactérias a antibióticos é ‘ameaça global’** [acedido a 30 de Abril de 2014]. Disponível na Internet: [http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2014/04/140430\\_resistencia\\_antibioticos\\_rb.shtml](http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2014/04/140430_resistencia_antibioticos_rb.shtml)
6. **Tackling the threat of antibiotic resistance** [acedido a 3 de Julho de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.gsk.com/explore-gsk/how-we-do-r-and-d/tackling-the-threat-of-antibiotic-resistance.html>
7. **Decreto-Lei 14178/2007, de 4 de Julho** [acedido a 12 de Março de 2014]. Disponível na Internet: [https://dre.pt/pdf2sdip/2013/02/038000000/07179071\\_80.pdf](https://dre.pt/pdf2sdip/2013/02/038000000/07179071_80.pdf)
8. COSTA A. C. - **A importância do controlo de infecção em meio hospitalar, Relatório da Divisão da Segurança Clínica do Programa Nacional de Prevenção e Controlo das Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde**, Direcção Geral de Saúde, Instituto Português de Oncologia, 2008 [acedido a 1 de Julho de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.dgs.pt/programa-de-prevencao-e-controlo-de-infecoes-e-de-resistencia-aos-antimicrobianos.aspx>
9. **Eurobarometer** [acedido a 12 de Fevereiro de 2014]. Disponível na Internet: <http://apjf.wordpress.com/sabia-que/>

10. BONESSO M., OLIVEIRA A., CUNHA M.L. - **CA-MRSA: Epidemiology of a Pathogen of a Great Concern**, In CUNHA M.L. Epidemiology Insights. InTech: 2012. ISBN 978-953-51-0565-7. [acedido a 7 de Junho de 2014] Disponível na Internet: <http://www.intechopen.com/books/epidemiology-insights/ca-mrsa-epidemiology-of-a-pathogen-of-a-great-concern>
11. MAHBOUDI M., BIDGOLI F.G. – **Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin**, Phytomedicine 17 (2010) 548 – 550.
12. NESTER E.W., ROBERTS, C.E., PEARSALL, N.N., ANDERSON, D.G., NESTER, M.T. - **Microbiology: A Human Perspective**, 4th edition, McGraw Hill, 2004. ISBN: 0072919248.
13. PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P., KLEIN, D.A. - **Microbiology**, 5th Edition, McGraw Hill, 2002. ISBN: 0072320419
14. GILLESPIE, S.H., HAWKEY P.M. - **Principles and Practice of Clinical Bacteriology**, 2nd Edition, John Wiley & Sons Ltd, 2006. ISBN: 9780470849767
15. VIEIRA S., - **Avaliação da actividade antifúngica de óleos essenciais em leveduras do género *Candida***, 2009 [acedido a 3 de Junho de 2014]. Disponível na Internet: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3988/1/SandraVieiraI.pdf>
16. MORGAN J. - **Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005**, Current Infectious Disease Reports 7 (2005) 429-439.
17. CUENCA-ESTRELLA M., GOMEZ-Lopez A., CUESTA I., ZARAGOZA O., MELLADO E., RODRIGUEZ-TUDELA J.L. - **Frequency of voriconazole resistance in vitro among Spanish clinical isolates of *Candida spp.* According to breakpoints established by the Antifungal Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 55 (2011) 1794-1797.
18. GONÇALVES M.J., CRUZ M.T., CAVALEIRO C., LOPES M.C., SALGUEIRO L. - **Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris***, Industrial Crops and Products 32 (2010) 70–75.
19. PINTO E., GONÇALVES M.J., HRIMPENG K., PINTO J., VAZ S., VALE-SILVA L.A., CAVALEIRO C., SALGUEIRO L. – **Antifungal activity of the essential oil of *Thymus villosus* subsp. *Lusitanicus* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species**, Industrial Crops and Products 51 (2013) 93 – 99.
20. PEREIRA V., DIAS C., VASCONCELOS M.C., ROSA E., SAAVEDRA M. J. - **Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of**

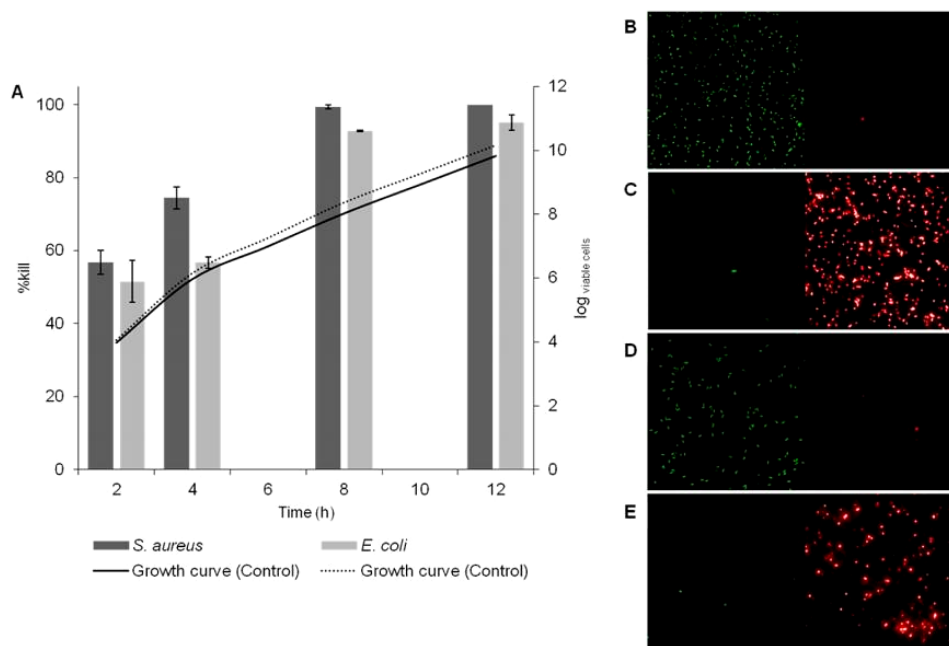
- respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*)**, Industrial Crops and Products 52 (2014) 1-7.
21. TOHIDPOUR A., SATTARI M., OMIDBAIGI R., YADEGAR A., NAZEMI J. - **Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**, Phytomedicine 17 820109 142 – 145.
22. OLIVEIRA A.C., FONTANA A.; NEGRINI T.C.; NOGUEIRA M.N., BEDRAN T., ANDRADE C.R., SPOLIDORIO L.C. - **Use of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) oil in dentistry: perspectives on its use as alternative antimicrobial to infectious diseases of oral origin**, Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 13 (2011) 492-499.
23. THOMSEN N.A., HAMMER K.A., RILEY T.V., BELKUM A.V., CARSON C.F. – **Effect of habituation to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on the subsequent susceptibility of *Staphylococcus* spp. to antimicrobials, triclosan, tea tre oil, terpinen-4-ol and carvacrol**, International Journal of Antimicrobial Agents 41 (2013) 343 – 351.
24. GARCIA H., FERREIRA R., MARTINS C., SOUSA A., FREIRE C., SILVESTRE A., KUNZ W., REBELO L. P., PEREIRA C. S. - **Ex Situ Reconstitution of the Plant Biopolyester Suberin as a Film, Biomacromolecules**, American Chemical Society 15 (2014) 1806 - 1813.
25. FIGUEIREDO C.A., PEDRO L.G., BARROSO J.G., TRINDADE H., SANCHES J., OLIVEIRA C., CORREIA M. – **Óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus***, Agrotec 8 (2013) 96 -100.
26. PATERSON D.L., BONOMO R.A. - **Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update**, Clinical Microbiology Reviews 18 (2005) 657 – 672.
27. PROENÇA DA CUNHA A., TEIXEIRA F., SILVA A.P., ROQUE O. R. - **Plantas na terapêutica - Farmacologia e ensaios clínicos**. Fundação Calouste Gulbenkian, 2007. ISBN 978-972-31-1224-5
28. PROENÇA DA CUNHA A., ROQUE O. R., NOGUEIRA M.T. - **Plantas aromáticas e óleos essenciais, composição e aplicações**. Fundação Calouste Gulbenkian, 2012.
29. **Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)** [accedido a 17 de Março de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/ESBLs>



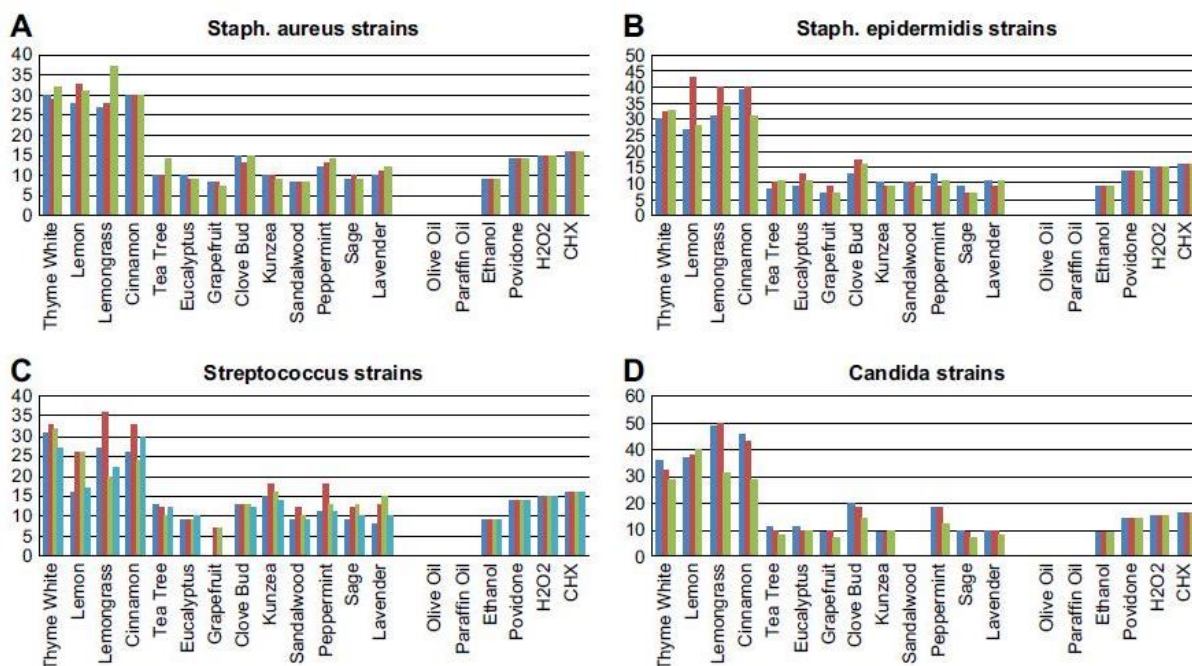
## 6. Anexos



**Anexo 1** – Efeito do OE de *Thymus zygis* subsp. *sylvestris* na viabilidade celular de FSDC no ensaio do MTT. As células FSDC foram expostas a diferentes concentrações do óleo essencial durante 3 e 24 h. O ensaio de MTT foi realizado como descrito anteriormente. Os resultados são expressos como uma percentagem de redução de MTT através das células de controlo mantidas em meio de cultura. Cada valor representa a média  $\pm$  DP de seis experimentos, realizados em duplicado (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Anexo 2** - Atividade antimicrobiana do filme de suberina contra as bactérias. (A) % de morte de *E. coli* e *S. aureus* em filmes de suberina e Log10 de células viáveis nas culturas usadas para obter as curvas de crescimento de controlo. (B-E) Ensaio viabilidade bacteriana após 12 horas de crescimento: culturas de controlo de *E. coli* e *S. aureus* (B, D) e expostas a filmes de suberina (C, E). As células vivas e mortas são mostradas a verde e vermelho, respetivamente [24].



**Anexo 3** - Zonas de inibição (em mm) por substâncias de ensaio e isolados de estirpes microbianas. Os isolados clínicos de pacientes hospitalizados estão marcados com \*.

A) Azul: *Staphylococcus aureus*; vermelho: *Staphylococcus aureus*\*; verde: *Staphylococcus aureus*\* MRSA.

B) Azul: *Staphylococcus epidermidis*; vermelho: *Staphylococcus epidermidis*\*; verde: *Staphylococcus epidermidis*\*.

C) Azul: *Streptococcus mutans*; vermelho: *Streptococcus pyogenes*; verde: *Streptococcus equisimilis*; azul claro: *Streptococcus alfa-hemolítico*\*.

D) Azul: *Candida albicans*; vermelho: *Candida albicans*\*; verde: *Candida krusei*[1].