

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS
E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca leucadendron* (L.) E PROPOSIÇÃO DE UM
MECANISMO DE AÇÃO

JESSICA PAOLA BAUTISTA SILVA

OURO PRETO

2018

JESSICA PAOLA BAUTISTA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS DE
PRÓPOLIS E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca leucadendron* (L.) E PROPOSIÇÃO
DE UM MECANISMO DE AÇÃO

Dissertação de mestrado apresentada
ao programa de pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal
de Ouro Preto como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David
Henrique dos Santos.

Co-Orientador: Msc. Janaína Brandão
Seibert.

OURO PRETO

2018

S586a

Silva, Jessica Paola Bautista.

Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos de própolis e do óleo essencial de melaleuca leucadendron (L.) e proposição de um mecanismo de ação [manuscrito] / Jessica Paola Bautista Silva. - 2018.

76f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos.

Coorientador: Prof. MSc. Janaína Brandão Seibert.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal.

1. Óleos essenciais. 2. Bactérias. 3. Própolis. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Melaleuca leucadendron. I. Santos, Orlando David Henrique dos. II. Seibert, Janaína Brandão. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 665.52

[Catalogação: www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



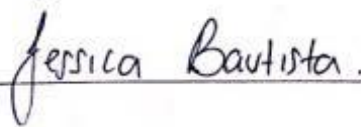
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 02 dias do mês de abril do ano de 2018, às 14:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Jessica Paola Bautista Silva, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Orlando David Henrique dos Santos (Presidente - UFOP), pelo Prof. Breno de Mello Silva (Membro - UFOP), pelo Prof. Jose Carlos de Magalhaes (Membro - Externo). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda Jessica Paola Bautista Silva 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Avaliação do Potencial Antimicrobiano de Extratos de Própolis e do Óleo Essencial de Melaleuca Leucadendron para a Proposição do Mecanismo de Ação", na área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Prof. Breno de Mello Silva; segundo, Prof. Jose Carlos de Magalhaes; terceiro, Prof. Orlando David Henrique dos Santos. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 02 de abril de 2018.

Presidente:  _____

Membro:  _____

Membro:  _____

Mestrando:  _____

¡Pues el SEÑOR concede sabiduría! De su boca provienen el saber y el entendimiento.

Proverbios 2:6

A Dios por ser mi fuerza, mi guía y mi respaldo en todo, al amor de mi vida Andrés por creer en mí y acompañarme siempre; y a mi familia por su apoyo incondicional.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser a minha força, minha guia e estar acompanhando-me em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos, pelo apoio e guia em todo o processo de formação e a minha co-orientadora Msc. Janaina Brandão Seibert, por me guiar, ajudar, ensinar e estar presente em todos os experimentos e todo o processo de elaboração do trabalho.

Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira por permitir a utilização do Laboratório de Microbiologia e assessoramento na pesquisa da atividade antimicrobiana.

Aos colegas do laboratório de Fitotecnologia, por sempre estar dispostos a ajudar e aconselhar.

Ao meu Amor Andrés por sempre estar presente, por acreditar em mim, por ser minha companhia e apoio, principalmente neste momento da minha vida.

A minha família, meus pais e meus irmãos, que de longe sempre torceram pelo meu sucesso e acreditaram em mim.

Aos meus amigos brasileiros Charles, Julya, Andreza, Ana Luiza e Thayná, por sempre estar me acompanhando e me aconselhando, por acreditar em mim, por ser minha força e minha família no Brasil, obrigada sempre!

E a todos os amigos que desde Colômbia estiveram me apoiando e acompanhando todo meu processo, principalmente a Luz Adriana, que todos os dias com uma mensagem me encorajou a avançar.

RESUMO

Os extratos e óleos essenciais provenientes de fontes naturais têm sido reportados como potenciais agentes antimicrobianos e como princípios ativos no desenvolvimento de produtos na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos. Devido ao surgimento de resistência ao tratamento com antibióticos, existe a necessidade de encontrar novas alternativas que possuam melhor eficácia no tratamento de doenças causadas por microrganismos. Este trabalho objetivou desenhar uma estratégia para propor os mecanismos de ação do produto de maior espectro de atividade entre os extratos de própolis e óleo essencial de *Melaleuca leucadendron* sobre diferentes microrganismos de importância clínica. Para isso, foram escolhidas diversas cepas de bactérias patogênicas humanas, foi determinada a concentração ótima de uso e a fase onde tem maior susceptibilidade por meio de curvas de crescimento a partir de duas fontes de inóculo. Os resultados demonstraram que é necessário o uso de uma concentração distinta na hora de ajustar o inóculo inicial, e que a fase exponencial de crescimento varia de um microrganismo para outro. A atividade antimicrobiana dos extratos e do óleo essencial foi confirmada a partir do método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), sendo o derivado com maior espectro o óleo essencial. A caracterização deste óleo foi realizada por meio da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), que revelou os monoterpenos como compostos majoritários. A proposição do mecanismo de ação dos compostos majoritários foi realizada através do programa PASSonline, encontrando valores consideráveis para potencialização da permeabilidade da membrana bacteriana e inibição da síntese de peptidoglicano glicosiltransferase. O teste de permeabilidade de membrana demonstrou que oito das doze bactérias avaliadas incorporaram o marcador, e três delas mostraram diferença estatística em comparação ao controle sem exposição ao óleo. Na microscopia eletrônica, também foi possível observar um efeito na estrutura da parede da célula bacteriana, sugerindo, dessa forma, que o mecanismo de ação deste óleo está relacionado ao aumento da permeabilidade na membrana celular da bactéria. Esses resultados são um avanço importante na procura de alternativas para o desenvolvimento de novos antibióticos a base de produtos naturais.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, bactérias, própolis, óleo essencial, *Melaleuca leucadendron*.

ABSTRACT

Extracts and essential oils from natural sources have been reported as potential antimicrobial agents and as active ingredients in product development in the pharmaceutical, cosmetic and food industries. By the emergence of resistant to treatment with antibiotics, new alternatives that have better efficacy in the treatment of diseases caused by microorganisms are required. The objective of this work was to design a strategy to propose the mechanisms of action of the product with the greatest spectrum of activity between the extracts of propolis and the essential oil of *Melaleuca leucadendron*, against different microorganisms of clinical importance. For this, several strains of human pathogenic bacteria were chosen, the optimum concentration of use and the phase where it was most susceptible by means of growth curves from two sources of inoculum were determined. The results demonstrated that the use of a distinct concentration at the time of initial inoculum adjustment is necessary, and that the exponential phase of growth varies from one microorganism to another. Then, the activity of extracts and essential oil was confirmed by the method of determining the minimum inhibitory concentration (MIC), the derivative with the highest antimicrobial spectrum being the essential oil. The characterization of this oil was carried out using Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS), which revealed the monoterpenes as major compounds. The proposed mechanism of antimicrobial action of the major compounds was performed through the PASSonline program, and considerable values were found for potentiation of bacterial membrane permeability and inhibition of peptidoglycan glycosyltransferase synthesis. The membrane permeability test demonstrated that eight of the twelve evaluated bacteria incorporated the marker, and three of them showed statistical difference in comparison to the control without exposure to the oil. In electron microscopy, it was also possible to observe an effect on the bacterial cell wall structure, thus suggesting that the mechanism of action of this oil is related to the increase of permeability in the cell membrane of the bacterium. These results are a major advance in the search for alternatives for the development of new antibiotics, mainly based on natural products.

Key words: Antimicrobial activity, bacteria, propolis, essential oil, *Melaleuca leucadendron*.

SUMARIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS.....	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Classificação e mecanismo de ação dos antibióticos	3
2.1.1 Inibidores de sínteses da parede celular.....	4
2.1.2 Inibidores da síntese de ácidos nucleicos.....	5
2.1.3 Inibidores da síntese de proteínas.....	5
2.1.4 Inibidores da síntese de cofatores metabólicos.....	5
2.2 Resistências aos antibióticos	6
2.2 Mecanismo de resistência aos antibióticos.....	7
2.3 Recursos naturais e medicinais como base no desenvolvimento de novos antibióticos.....	8
2.4 Extratos de própolis.....	9
2.4.1 A própolis um recurso das abelhas	9
2.4.2 Origem e coleta.....	9
2.4.3 Composição.....	10
2.4.4 Características gerais.....	11
2.4.5 Propriedades e usos.....	11
2.5 Óleos essenciais.....	14
2.5.1 Obtenção dos óleos essenciais.....	15
2.5.2 Uso dos óleos essenciais.....	16
2.6 <i>Melaleuca leucadendron</i>	16
2.6.1 Usos das folhas de <i>Melaleuca leucadendron</i>	17
2.6.2 Óleo essencial de <i>Melaleuca leucadendron</i>	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo geral.....	19

3.2 Etapas do trabalho.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Materiais.....	20
4.1.1 Extratos de própolis.....	20
4.1.2 Óleo essencial de <i>Melaleuca leucadendron</i>	20
4.2 Microrganismos avaliados	21
4.3 Padronização da cinética de crescimento dos microrganismos escolhidos.....	22
4.3.1 Crescimento a partir de meio solido.....	22
4.3.2 Crescimento a partir de meio liquido.....	23
4.4 Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos e do óleo escolhidos, durante a fase exponencial de cada microrganismo.....	38
4.4.1 Avaliação dos extratos etanólico, acetato etilênico e hexânico da própolis.....	23
4.4.2 Avaliação do óleo essencial de <i>Melaleuca leucadendron</i>	24
4.5 Seleção e caracterização do produto com maior espectro de atividade.....	25
4.5.1 Caracterização química do óleo essencial de <i>M. leucadendron</i>	25
4.5.2 Avaliação <i>in silico</i> da atividade antimicrobiana.....	26
4.5.3 Teste de permeabilidade de membrana.....	26
4.5.4 Microscopia eletrônica de transmissão.....	27
4.6 Análises estatísticas.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 Padronização da cinética de crescimento dos microrganismos escolhidos.....	29
5.2 Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos e do óleo escolhidos, durante a fase exponencial dos microrganismos.....	41
5.3 Seleção e caracterização do produto com maior espectro de atividade.....	43
5.4 Análise <i>in silico</i> da atividade antimicrobiana.....	46
5.5 Avaliação de permeabilidade de membrana.....	47
5.6 Microscopia eletrônica de transmissão.....	50
6. CONCLUSÃO	54
7. REFERÊNCIAS.....	55

8. ANEXOS.....62

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC- *American Type Culture Collection*

CG-EM- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CIM- Concentração Inibitória Mínima

DMSO- Dimetilsulfóxido

DO- Densidade ótica

EEP- Extrato Etanólico de Própolis

EHP- Extrato Hexânico de Própolis

EAP- Extrato Acetato Etilênico de Própolis

HF- Hora Final

HI- Hora Inicial

IP- Iodeto de propídio

OML- Óleo Essencial de *Melaleuca leucadendron*

PA- Probabilidade de ser ativo

PABA- Ácido Paraaminobenzoico

PBP- Proteínas Vinculadora de Penicilinas

PBS- Tampão Fosfato Salina

PI- Probabilidade de ser inativo

RPM- Revoluções por minuto

UFC/mL- Unidade Formadora de Colônia/ mililitro~

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Técnicas de extração dos óleos essenciais. A. Extração mediante pressão com vapor; B. Destilação água-vapor; C. Hidrodestilação.....	15
Figura 2. <i>Melaleuca leucadendron</i> . A. Árvore; B. Folhas, flor e fruto.....	17
Figura 3. A. Própolis em presença de etanol; B. Extrato concentrado.....	20
Figura 4. Óleo essencial de <i>Melaleuca leucadendron</i>	21
Figura 5. Curva de crescimento <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido.....	30
Figura 6. Curva de crescimento <i>Escherichia coli</i> . A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido.....	31
Figura 7. Curva de crescimento <i>Staphylococcus aureus</i> . A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido.....	32
Figura 8. Curva de crescimento <i>Listeria monocytogenes</i> . A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido.....	33
Figura 9. Curva de crescimento <i>Klebsiella pneumoniae</i> . A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido.....	33
Figura 10. Curva de crescimento <i>Proteus mirabilis</i> . A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido.....	34
Figura 11. Curva de crescimento <i>Staphylococcus saprophyticus</i> . A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido.....	35
Figura 12. Curva de crescimento <i>Enterobacter aerogenes</i> . A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido.....	36
Figura 13. Curva de crescimento <i>Salmonella thiphymurium</i> . A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido.....	37

Figura 14. Curva de crescimento <i>Shigella flexnerii</i> . A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido.....	37
Figura 15. Curva de crescimento <i>Providencia rettgeri</i> . A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido.....	38
Figura 16. Curva de crescimento <i>Enterococcus faecalis</i> . A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido.....	39
Figura 17. Compostos majoritários do óleo essencial de folhas de <i>Melaleuca leucadendron</i>	45
Figura 18. Avaliação de permeabilidade de membrana celular a partir da citometria de fluxo, A. Seleção da população bacteriana. B. Seleção da população marcada com Iodeto de propídio. C. Histograma do IP positivo e IP negativo.....	48
Figura 19. Teste de permeabilidade de membrana celular com bactérias selecionadas sobre ação do óleo essencial de <i>Melaleuca leucadendron</i>	50
Figura 20. Análise de microscopia eletrônica de transmissão. A. Controle negativo, célula de <i>S.aureus</i> não exposta ao óleo essencial B. Células de <i>S.aureus</i> expostas ao óleo essencial de folhas de <i>Melaleuca leucadendron</i>	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos antibióticos.....	3
Tabela 2. Microrganismos selecionados para avaliação da atividade dos extratos de própolis e do óleo essencial de <i>Melaleuca leucadendron</i>	21
Tabela 3. Concentrações bacterianas iniciais a serem utilizadas nas curvas de crescimento na presença dos extratos de própolis e do óleo essencial de <i>Melaleuca leucadendron</i> , e tempo da fase exponencial de cada bactéria pelas duas fontes de inóculo, meio líquido e meio sólido.....	41
Tabela 4. Atividade avaliada durante a fase exponencial de crescimento dos microrganismos, testando as sete diferentes concentrações dos extratos de própolis e do óleo essencial de <i>Melaleuca leucadendron</i> , e a confirmação mediante a metodologia de concentração inibitória mínima (CIM).....	43
Tabela 5. Caracterização do óleo essencial de folhas de <i>Melaleuca leucadendron</i>	44
Tabela 6. Previsões <i>in silico</i> dos mecanismos de ação antimicrobiana dos compostos majoritários do óleo essencial de <i>Melaleuca leucadendron</i> , utilizando a ferramenta PASS <i>online</i>	47

1. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado dos antibióticos tornou-se um problema cada vez mais grave já que as bactérias são capazes de desenvolver mecanismos de resistência que, com o passar dos anos, têm aumentado a sua prevalência, sobretudo nas espécies de bactérias que causam infecções fundamentalmente fora da área hospitalar (Alos et al., 1997). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, a resistência aos antibióticos gera 700 mil mortes cada ano mundialmente, e, se continuar nesse ritmo, no ano de 2050 serão 10 milhões de mortes a cada ano, números maiores aos reportados em mortes por outras doenças como o câncer (OMS, 2017). Os mecanismos de resistência adquiridos e transmitidos são os mais importantes e consistem, principalmente, na produção de enzimas bacterianas que inativam os antibióticos ou na aparição de modificações que impedem a chegada do fármaco ao ponto de ação, bem como na alteração do próprio mecanismo de ação. Uma cepa bacteriana pode desenvolver vários mecanismos de resistência a um ou vários antibióticos e, da mesma forma, um antibiótico pode ser inativado por distintos mecanismos ou diversas espécies bacterianas (Holmberg et al., 1987).

Para conseguir erradicar ou inibir os microrganismos, os antibióticos devem atravessar a barreira superficial da bactéria e depois fixar-se sobre alguma das estruturas ou mecanismos bioquímicos que lhe são necessários para se multiplicar ou para sobreviver. Os mecanismos de ação dos antibióticos são diversos e às vezes múltiplos, mas todos operam em algum dos seguintes pontos: podem ser bactericidas, bacteriostáticos, inibidores da síntese de ácidos nucleicos, proteínas da parede celular ou também fazendo a alteração da membrana celular da bactéria.

Algumas plantas são produtoras de substâncias que possuem ação antimicrobiana, como foi relatado por diferentes autores como Kujumgiev et al. (2000), Miorin et al. (2003), Sandford et al. (1997), principalmente como mecanismo de defesa contra infecções ou como substâncias envolvidas com o metabolismo celular. Também têm sido relatadas atividades antisséptica, antibacteriana, bactericida ou bacteriostática, antifúngica, antiviral e vermícida de distintos compostos como extratos e óleos essenciais provenientes de plantas. Como é de esperar, além de uma grande lista de plantas com atividade antimicrobiana, existe um número de compostos químicos responsáveis por esta atividade, esses compostos podem ser

derivados de alcaloides, fenóis simples, flavonas, quinonas, taninos e terpenos (Kujumgiev, et.al., 2000).

O extrato de própolis tem sido reconhecido pelas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anestésica e analgésica, sendo utilizado como anestésico local em odontologia, além de apresentar propriedades anti-inflamatórias, cicatrizante e antioxidante (Salatino et al., 2005). Óleos essenciais assim como os extratos também revelam diferentes ações biológicas, como por exemplo, as folhas de *Melaleuca leucadendron* (Linneu) que são conhecidas pelas propriedades antiparasitárias, antissépticas, analgésicas, estimulantes e inseticidas; sendo recomendada na medicina tradicional como antimalárica ou antipirética, expectorante, antisséptico urinário e anti-helmíntico (Rodriguez, 1997).

Diante desse relato, neste trabalho pretendeu-se avaliar diferentes extratos de própolis e o óleo essencial de *M. leucadendron* com antecedentes de propriedades antimicrobianas, com o objetivo de propor o mecanismo de ação do composto com maior espectro de atividade contra diferentes bactérias patogênicas humanas de importância clínica na fase exponencial de cada uma delas. Desta forma pretende-se encontrar alternativas na problemática de resistências aos antibióticos, utilizando antimicrobianos derivados de fontes naturais, os quais podem apresentar vantagens econômicas e de qualidade para a indústria farmacêutica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Classificação e mecanismo de ação dos antibióticos

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas por diferentes espécies de microrganismos (bactérias e fungos) e plantas, ou sintetizados por métodos de laboratório, que suprimem o crescimento de outros microrganismos e podem eventualmente destruí-los. Estes compostos diferem nas suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, assim como em seu mecanismo de ação e espectro antimicrobiano (Calderwood et al., 1988; Bowman et al., 1987). Na prática diária, as classificações que são mais utilizadas se baseiam na ação do antibiótico sobre a bactéria (Bowman et al., 1987). Conforme o efeito que tem sobre a bactéria pode ser (Tabela 1): bacteriostáticos, aqueles que inibem a multiplicação bacteriana, a qual volta uma vez que o tratamento é suspenso; e bactericidas: possuem a propriedade de destruir a bactéria e a sua ação terapêutica é irreversível. Essas designações de bacteriostático ou bactericida podem variar conforme o tipo de microrganismo como por exemplo, a penicilina G geralmente é bactericida para cocos Gram positivos, mas só é bacteriostático contra enterococos (*Streptococcus faecalis*), enquanto que o cloranfenicol costuma ser bacteriostático, mesmo em concentrações elevadas, mas pode ser bactericida contra *Hemophilus influenzae* (Young et al., 1994).

Tabela 1. Classificação dos antibióticos. (Young et al., 1994).

Bactericidas	Bacteriostáticos
Penicilinas	Tetraciclina
Cefalosporinas	Eritromicina
Aminoglicósidos	Sulfonamida
Rifampicina	Novobiocina
Qinolonas	Cloranfenicol
Monobactâmicos	
Polimixinas	

A maioria dos antibióticos comercializados ou em fase avançada do desenvolvimento clínico atua inibindo processos metabólicos vitais para as bactérias, relacionados com a

sínteses da parede, das proteínas e dos ácidos nucleicos, ou determinando a desestruturação das membranas lipídicas. Também podem ser classificados de acordo a sua ação específica na célula bacteriana como, antibióticos que inibem a síntese da parede celular, antibióticos que afetam a permeabilidade da membrana celular, fármacos que inibem a síntese proteica (inibição da tradução e a transcrição do material genético), e os que inibem a síntese dos ácidos nucleicos (Young et al., 1994).

2.1.1 Inibidores de sínteses da parede celular

Os antibióticos β -lactâmicos compartilham um mecanismo de ação comum: a inibição da síntese da parede de peptidoglicano da bactéria. Por isso são considerados antibióticos de grande segurança, já que as células eucarióticas carecem de parede celular. Esses antibióticos inibem a etapa final da síntese de peptidoglicano, que consiste na reação de entrecruzamento dos polímeros. Esta etapa é catalisada principalmente por dois tipos de enzimas: carboxipeptidase e transpeptidase, as quais estão ancoradas na membrana plasmática da bactéria. Estes tipos de proteínas são denominados como PBP (*Penicillin-binding proteins*) (proteínas vinculadoras de penicilinas). Este é o local onde os β -lactâmicos são fixados, inibindo a sínteses de forma não competitiva e irreversível (Petersdor, 1987).

Todas as bactérias possuem este tipo de proteínas, variando no seu número e afinidade de união por diferentes antibióticos β -lactâmicos de acordo com a bactéria; por exemplo, *Staphylococcus aureus* tem quatro PBP, enquanto a *Escherichia coli* possui no mínimo sete. Em termos gerais, as PBP estão envolvidas no crescimento da bactéria, na conformação da estrutura tridimensional, na reparação da parede, no fornecimento de rigidez e na manutenção do gradiente osmótico entre a bactéria e o meio (Wyatt et al., 2009).

A diferença entre espécies é uma das explicações para os distintos espectros de atuação entre os diversos antibióticos β -lactâmicos. Os efeitos que produzem estes antibióticos dependem da sua concentração, do tempo de exposição a níveis superiores que a concentração inibitória mínima (CIM), do microrganismo, do meio onde se encontra e, provavelmente, do tipo de PBP (Calderwood et al., 1999).

2.1.2 Inibidores da síntese de ácidos nucleicos

Compreende os antibióticos que interferem na replicação do DNA bacteriano ou na sua transcrição e geralmente atuam como bactericidas. O primeiro antimicrobiano deste tipo foi o ácido nalidíxico, que permitia o desenvolvimento rápido de resistências e mutações de alto nível. As quinolonas possuem um núcleo de dois anéis de seis membros unidos e podem ser produzidas de forma sintética. Foi desenvolvida uma série de quinolonas fluoradas que proporcionam excelentes níveis de atividade bactericida frente a um amplo espectro de microrganismos e que apresentam um baixo grau de união a proteínas (Calderwood et al., 1999).

2.1.3 Inibidores da síntese de proteínas

Os antibióticos aminoglicosídeos são um grupo de agentes bactericidas caracterizados por ter combinações de anéis de seis membros, com cadeias laterais de caráter variável que determinam o seu espectro e o seu grau de resistência frente a enzimas inativáveis. Pertencem a esse grupo, a Estreptomicina, Neomicina, Canamicina, Gentamicina, Tobramicina, Amicacina. Em concentrações suficientes, os aminoglicosídeos se unem de forma irreversível aos ribossomos, bloqueiam os complexos de iniciação e inibem a elongação das cadeias polipeptídicas, causando um efeito bactericida de caráter rápido. Concentrações inferiores causam uma dispersão de lugar do RNA, uma leitura errada do mensageiro e uma falta de produção das proteínas corretas, o que produz um efeito drástico sobre o crescimento e a estrutura bacterianos (Wyatt et al., 2009).

2.1.4 Inibidores da síntese de cofatores metabólicos

Os inibidores metabólicos utilizados como antimicrobianos usam vias metabólicas presentes nos microrganismos. Um desses agentes é o que interfere na síntese do ácido fólico por parte das bactérias. O ácido fólico deriva do ácido para-Aminobenzoico (PABA), do glutamato e da unidade pteridínica. Na sua forma reduzida, é uma coenzima essencial para o transporte dos compostos de um carbono nas sínteses das purinas, da timina e de alguns aminoácidos e, como consequência e indiretamente, da síntese dos ácidos nucleicos e das proteínas. Os principais inibidores da via do ácido fólico são as sulfamidas, o trimetoprim, o ácido para-Aminosalicílico e as sulfonas. As sulfamidas são análogas estruturais do PABA

e competem pela enzima (dihidropteroato-sintetase) que combina o PABA e a pteridina na fase inicial da síntese do ácido fólico (Wyatt, et al., 2009).

2.2 Resistências aos antibióticos

Novos mecanismos de resistência que são propagados mundialmente estão surgindo e põem em perigo a capacidade para tratar doenças infecciosas comuns, como consequência, tem-se o aumento das mortes e a prolongação das doenças (Crisler et al., 2012).

Na ausência de antimicrobianos eficazes para prevenir e tratar as infecções, intervenções como o transplante de órgãos, à quimioterapia do câncer, o tratamento da diabetes ou cirurgias maiores (por exemplo, as cesáreas ou as próteses de quadril) se converteriam em procedimentos de muito risco (Crisler et al., 2012). A resistência é um fenômeno que aparece de forma natural com o tempo, geralmente por modificações genéticas e seleção dos microrganismos. Porém, o processo tem sido acelerado pelo mal-uso e o abuso dos antimicrobianos (Crisler et al., 2012). Os pacientes com infecções causadas por bactérias fármaco-resistentes têm maior risco de ter piores resultados clínicos e levar ao falecimento do paciente. Além disso, consomem mais recursos sanitários que aqueles infectados por cepas não resistentes das mesmas bactérias.

A resistência de *Klebsiella pneumoniae* (uma bactéria intestinal comum que pode causar infecções potencialmente mortais) ao tratamento utilizado como último recurso (os antibióticos carbapenêmicos) tem sido propagada em todas as regiões do mundo. *K. pneumoniae* é uma importante causa de infecções hospitalares, como a pneumonia, a sepsia, as infecções dos recém-nascidos e os pacientes ingressados em unidades de cuidados intensivos. Devido à resistência, em alguns países os antibióticos carbapenêmicos já não são eficazes em mais da metade dos pacientes com infecções por *K. pneumoniae* (Merck et al., 2000). A resistência de *E.coli* a uma das classes de medicamentos mais utilizadas no tratamento das infecções urinárias (as fluoroquinolonas) está muito disseminada (Merck et al., 2000).

Pelo menos 10 países (Austrália, Áustria, Canadá, Eslovênia, França, Japão, Noruega, África do Sul, Suécia e Reino Unido) têm confirmado casos em que tem fracassado o tratamento da gonorreia com o último recurso frente essa doença: as cefalosporinas de terceira geração. O que demonstra o grande problema e a necessidade de

desenvolver novas opções de antibióticos para combater as infecções causadas por microrganismos patogênicos (Crisler et al, 2012).

2.2.1 Mecanismo de resistência aos antibióticos

Existem diversos mecanismos de resistência aos antibióticos que podem ser utilizados pelos microrganismos. Os principais são:

A) β -lactamases: As β -lactamases são enzimas que catalisam a ruptura do anel β -lactâmico das Penicilinas e das Cefalosporinas, obtendo produtos sem atividade antibacteriana. Estas enzimas podem estar codificadas em cromossomos ou plasmídeos. As β -lactamases aparecem em sua maioria em bactérias Gram-negativas e tem atividade preferencialmente cefalosporinase, embora tenha também algumas penicilinases e outras de amplo espectro. As β -lactamases cromossômicas podem ser constitutivas ou induzíveis. São chamadas constitutivas aquelas intrínsecas ao cromossoma bacteriano ou que estão sempre presentes no mesmo gênero, espécie e subespécie bacteriana (é de caráter genético), e que contribuem para delimitar o espectro de um antibiótico β -lactâmico. Este tipo de β -lactamases é produzido como consequência de mutações do material genético bacteriano. São as que definem a resistência natural. As mais importantes são as encontradas nas espécies de *Klebsiella* sp. e *Bacteroides fragilis*. Existem outras β -lactamases cromossômicas que são induzíveis, que é um mecanismo de resistência adquirido, uma bactéria que foi sensível se torna resistente mediante a produção de uma β -lactamase cromossômica. Este último mecanismo de resistência é extremamente comum em espécies de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp. e *Acinetobacter* sp. (Neu, 2007).

B). Menor afinidade do antibiótico pelas PBP: As PBP podem perder afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos, nesse caso as concentrações de antibióticos exigidas para obter igual efeito aumentam notoriamente com a perda de potência do antibacteriano. Os antibióticos β -lactâmicos inibem PBP diferentes em uma bactéria, razão pela qual deve diminuir a afinidade de várias PBP por esses antimicrobianos para que a bactéria fique resistente. Este é o caso do *Streptococcus pneumoniae* altamente resistente à Penicilina, apresentando quatro das cinco PBP de alto peso molecular com menor afinidade pelos β -lactâmicos. As cepas com resistência a Cefalosporinas de terceira geração apresentam

alterações só em duas das cinco PBP de alto peso molecular, dado que as PBP restantes têm pouca afinidade por esses fármacos (Thompson, 1997).

C) Incapacidade do antibiótico para penetrar as membranas bacterianas: Para ligar as PBP (localizadas nas camadas mais internas da bactéria) os β -lactâmicos devem atravessar as camadas externas da parede bacteriana. Nas bactérias Gram-positivas isto é relativamente fácil, uma vez que as suas moléculas são pequenas e que esses microrganismos carecem de membrana externa. Nas bactérias Gram-negativas o antibiótico deve atravessar a membrana externa. Esta membrana possui proteínas denominadas porinas que formam poros através dos quais podem ingressar substâncias no espaço periplasmático. Estas porinas são seletivas e por isso, nem todos os antibióticos podem ingressar através das mesmas. Os antibióticos β -lactâmicos são, em geral, pouco lipossolúveis e devem utilizar as porinas para chegar ao espaço periplasmático e alcançar as PBP. A partir de mutações nos genes responsáveis pela síntese das porinas a bactéria cria um mecanismo de resistência para esses antibióticos (Broek et al., 1987).

2.3 Recursos naturais e medicinais como base no desenvolvimento de novos antibióticos

As plantas medicinais são um recurso biológico em que alguns casos são utilizados de forma completa e em outros é utilizada só alguma parte, flor, fruto, tubérculo. Da seção selecionada, se obtém extratos que são usados para o tratamento de alguma afecção como dor de cabeça, estômago ou inchaço, sendo, portanto, reconhecida pela medicina tradicional a ação terapêutica (alívio ou melhora) definida pelos princípios ativos presentes nas plantas (Sforcin et al., 2000).

O uso de fármacos de origem vegetal é reportado desde a época pré-histórica e foi uma das formas mais estendidas na medicina, já que virtualmente todas as culturas conhecidas têm evidências do uso medicinal de alguma planta. A indústria farmacêutica atual têm muitas substâncias derivadas de plantas que formam parte dos princípios ativos de medicamentos modernos (Scheller et al., 1990).

O consumo de plantas medicinais tem aumentado nos últimos anos mundialmente e é frequente o seu uso juntamente com medicamentos prescritos pelos médicos. Devido ao problema da resistência aos antibióticos, a medicina e as indústrias farmacêuticas estão voltando às origens, pesquisando as plantas que possuem ativos antimicrobianos presentes na natureza como parte dos mecanismos de defesa das mesmas ou como metabólitos secundários (Sanabria et al., 2002).

Estudos como o realizado por Qin et al., (2017), demonstraram que actinobactérias isoladas de plantas medicinais coletadas de florestas tropicais em Xishuangbanna, também possuem atividade antimicrobiana contra bactérias de importância clínica, o que confirma que produtos ou organismos provenientes de fontes naturais podem ter compostos úteis no desenvolvimento de novos antibióticos.

2.4 Extratos de própolis

2.4.1 A própolis um recurso das abelhas

As colmeias se encontram geralmente em espaços protegidos, em árvores ou caixas que quase sempre são fechadas. Com uma temperatura e humidade elevada e constante, com milhares de indivíduos geneticamente muito similares, estas são construídas com materiais orgânicos (cera e madeira) e com uma grande quantidade de reservas ricas em açúcares e proteínas armazenadas. Constituem, portanto, um meio extremamente favorável para a proliferação de microrganismos (Bankova et al., 2005).

As abelhas conseguem manter asséptico o interior da colmeia mediante uma extrema limpeza e a ajuda da própolis, com o que recobrem todas as superfícies da colmeia, os lugares de cria e armazenamento (Bankova et al., 2005).

2.4.2 Origem e coleta

A própolis é coletada pelas abelhas de mais de 15 dias que, com as suas mandíbulas, pegam as partículas resinosas que tem sobre as plantas, árvores e arbustos, principalmente: álamo, salgueiro, bétula, amieiro, castanha silvestre, pinho, ensina, sisal e algumas plantas herbáceas. Estas resinas possuem diversidade de metabólitos secundários tóxicos que algumas plantas podem produzir para proteger as partes mais ativas do crescimento, e que combatem, assim, possíveis patógenos bióticos e pragas. As abelhas despreendem as

sustâncias resinosas, armazenando-as com as suas patas nas cestas de pólen. As enzimas da sua boca participam também na operação para evitar a sua aderência. Quando chegam à colmeia com a carga, as outras abelhas lhes ajudam a descarregar a própolis. Também existe a teoria de que parte da própolis é o resultado da digestão do pólen por parte das abelhas (Bankova et al., 2005).

A quantidade de própolis que pode gerar uma colmeia varia entre os 150 e os 300g por temporada, sendo o verão e o outono as épocas de maior produção. São poucas as abelhas destinadas a realizar esta tarefa, que só se realiza com temperaturas superiores a 20° C e durante as primeiras horas da tarde. Durante os períodos de seca, substitui-se a coleta do néctar pela de própolis (Fernandes et al., 2005).

Essa resina balsâmica se encontra recobrindo todas as paredes e quadros da colmeia, assim, uma das formas de extraí-la é pela raspagem dos componentes da caixa com o uso de uma espátula, mas esse método supõe tirar os quadros da caixa e manipular a colmeia no fundo, além disso, a própolis assim coletada tem muitas impurezas (cera, lascas de madeira ou abelhas mortas) (Fernandes et al., 2005).

2.4.3. Composição da própolis

A composição da própolis é extremamente complexa e variável em função das espécies botânicas que existem na zona de coleta, dos ciclos biológicos das plantas que proveem as resinas, do tipo de abelhas e do clima. É um produto muito heterogêneo, tanto no que se refere aos elementos que compõem como as suas proporções. Embora a sua composição seja bastante complexa, os compostos podem se agrupar nas seguintes classes com a sua concentração aproximada: resinas e bálsamos (50-55%); cera (25-35%); óleos voláteis (10%); pólen (5%); substâncias orgânicas e minerais (5%) (Fernandes et al., 2005).

Nesses 5% de substâncias orgânicas e minerais que são concentrados a maioria de matérias ativas e compostos que tornam interessante este produto das colmeias. Nas substâncias orgânicas, podem se encontrar: ácidos orgânicos (ácido benzoico, ácido gálico), fenóis (ácido caféico, ácido cinâmico), aldeídos (vanilina), cumarinas, flavonoides (flavononas, flavonóis e flavonas) e vitaminas (vitamina A, B3 e outros do grupo B).

Também é relatada a presença de alguns metais, como níquel, prata, alumínio, boro e cobre, bem como, o iodo que se encontra em uma proporção importante (Bankova et al., 2005).

2.4.4. Características gerais

A própolis é praticamente insolúvel em água, mas solúvel em álcool, razão pela qual a maioria das aplicações é realizada através de extratos etanólicos. A própolis é uma substância resinosa, balsâmica, de uma cor verde pardo, castanho, quase preto às vezes, dependendo da sua origem botânica. Tem um sabor acre, frequentemente amargo, e um odor agradável e doce, de forma que quando é queimado, exala uma fragrância de resinas aromáticas. A consistência é variável de acordo com a sua temperatura; abaixo de 15° C é dura e frágil, em torno de 30-35° C é macia e modelável, entre os 35 e 60° C é pegajosa e se funde aos 60-70° C. Sendo assim, esta é bastante termoestável, mantendo as suas propriedades antibacterianas depois de ter sido submetida a temperaturas de até 100° C durante meia hora (Prado Filho et al., 1962).

Embora a própolis conserve bem as suas propriedades no longo do tempo, é melhor utilizá-la o mais fresco possível, ou conservá-la a menos alterada possível, protegida da luz e num ambiente seco e fresco (Bankova et al., 2005).

2.4.5. Propriedades e usos

Na área da medicina humana é onde os benefícios da própolis têm sido mais estudados e aplicados. São atribuídas propriedades e usos tais como: antibacteriana, antifúngica e antiviral; utilizada em micoses cutâneas e outras afecções dermatológicas, assim como para infecções vaginais, anestésica e analgésica; alivia a inflamação e a coceira das picadas de insetos, e tem sido utilizada como anestésico local em odontologia (3,5 vezes mais potente como anestésico que a cocaína), anti-inflamatórias; utilizada em processos reumáticos e artríticos; cicatrizante, tem sido utilizado em cirurgia para facilitar a cicatrização de feridas, e tem efeitos positivos no tratamento de úlceras e gastrites assim como para queimaduras; antioxidante, aumenta a ação da vitamina C; estimulador do sistema imunológico; efeitos antitumorais; tratamento de afecções do sistema respiratório; laringites, anginas, e afecções bronco pulmonares (Serra et al., 1994).

As referências mais antigas do uso da própolis remontam-se ao antigo Egito, onde já era utilizada como medicinal e como parte de cremes e unguentos de embalsamar. Mais tarde foi utilizada pelos gregos, a quem se deve seu nome (para o que significa “a frente de” e polis “cidade”). Aristóteles (século I a. C.) já reportava a própolis no seu livro “Reprodução dos animais” e foi considerada como “remédio para as infecções da pele e feridas” (Salamanca, 2007).

No século XI, Avicena, médico e filósofo persa escreveu: “tem a qualidade de eliminar as pontas de setas e as espinhas, vivifica e limpa facilmente”. Parece ser que os Incas utilizavam a própolis quando se apresentava um quadro de infecções febril e no continente europeu durante os séculos XVIII e XIX, existem referências na França que relatam seu uso para a cura de feridas. Seu último reporte de uso na história foi em torno do ano de 1900, durante a denominada guerra dos Boers, que acabou no que agora conhecemos como a República de África do Sul, onde se produziam e importavam grandes quantidades de própolis para o tratamento de feridas infectadas e como cicatrizante (Salamanca, 2007).

A razão do uso da própolis na medicina, na veterinária, na agricultura e a apicultura, assim como na elaboração de produtos farmacêuticos, baseia-se em suas propriedades antimicrobianas, proporcionadas pelos ácidos benzoico, oxibenzoico, cafeico, ferúlico, os sesquiterpenos e os flavonoides. Mas quase todas essas propriedades podem ser atribuídas fundamentalmente aos flavonoides, (do latim flavos, "amarelo") um termo genérico com o que se identifica a uma série de metabólitos secundários das plantas. E de fato, os flavonoides têm sido usados como marcadores de qualidade da própolis (Salamanca, 2007).

Os flavonoides são sintetizados a partir de uma molécula de fenilalanina e 3 de malonil-CoA, através do que se conhece como "a via Biossintética dos flavonoides", que o seu produto, a estrutura base, é sintetizado graças a uma enzima isomerase. A estrutura base, um esqueleto C₆C₃-C₆, pode sofrer posteriormente muitas modificações e adições de grupos funcionais, pelo que os flavonoides são uma família muito diversa de compostos, embora todos os produtos finais caracterizam-se por ser poli fenólicos e solúveis em água (Graf et al., 2005).

Todas as plantas sintetizam flavonoides em maior ou menor grau, já que todas compartilham a mesma via Biossintética básica, mas o resultado varia muito de uma espécie

ou família para outra. Dentro das plantas tem diferentes funções: proteção contra a luz ultravioleta, defesa do herbivoríssimo criando sabores desagradáveis, regulação do transporte do hormônio auxina, atração de polinizadores (pigmentação) e proteção frente a fungos (o fitoalexinas, são flavonoides de baixo peso molecular, metabólitos secundários tóxicos para alguns patógenos que são gerados imediatamente depois de um ataque, por exemplo a pisantina (García-Mateos e Pérez-Leal, 2003). Dentro dos flavonoides, a galangina e a pinocembrina são as mais numerosas e que tem a maior parte das propriedades fungicidas e fungo estáticas (Quiroga et al., 2006). Também junto aos flavonoides, o ácido cafeico, presente na própolis e os seus extratos alcoólicos tem propriedades fungicidas (Ojeda-Contreras et al., 2007).

Em relação a sua ação antimicrobiana, a própolis é notavelmente mais eficaz sobre as bactérias Gram positivas do que sobre as Gram negativas (Bankova et al., 1995). Na agricultura, já tem sido utilizada pelas suas propriedades cicatrizantes e antibióticas; em extrato para proteger as feridas produzidas depois de podas severas. Mas ultimamente estão se realizando estudos em diferentes partes do mundo, para melhorar as suas aplicações como biocida contra fungos, bactérias e vírus fito patogênicos. Alguns exemplos de patógenos controlados com maior ou menor efetividade pelos extratos etanólicos ou aquosos de própolis são: bactérias fitopatogênicas, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas axonopodis* (Basic et al., 2005); fungos fito patogênicos, *Fluvia fulva* e *Colletotrichum gloeosporoides* (Sosa-López et al., 2000). E de acordo com o autor Joan Sisa (2000), em seu artigo “Apicultura prática e medicinal”, tem se desenvolvido ensaios para estudar o efeito inibidor da própolis contra alguns vírus que afetam as plantas, sendo o mais sensível ao tratamento o vírus da necrose do tabaco, e o menos o vírus do mosaico do pepino (Serra et al., 1994).

Dentro das aplicações agrícolas, também foi reportado o seu uso como ativador dos mecanismos químicos de defesa das plantas. Nos últimos anos têm sido identificados compostos antimicrobianos que são acumulados nas plantas em altas concentrações, depois da presença de infecções bacterianas ou causadas por fungos, ajudando a limitar a dispersão do patógeno. (Vivanco et al., 2005). Esses metabólitos secundários de defesa não são produzidos de forma contínua dentro da planta, já que necessitam de um gasto de energia,

sendo assim, sua síntese é ativada quando a planta nota que está sendo atacada. Esses indicadores podem ser fragmentos da parede celular da própria planta, partes de células microbianas ou a própria fitoalexina (Vivanco et al., 2005).

2.5 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são uma mistura de compostos voláteis, produto do metabolismo secundário das plantas. São formados nas partes verdes do material vegetal e quando a planta cresce são transportadas a outros tecidos, especificamente na formação da flor (Maia et al., 2008). Esses óleos essenciais são responsáveis, na aromaterapia, pela aromatização do ar e melhoram o meio ambiente, harmonizando, equilibrando e purificando, gerando assim uma atmosfera clara e fresca. Os seus aromas são revigorantes tanto para o corpo como para a mente, satisfazem os sentidos trazendo benefícios para a saúde, regulando e atuando como regenerador do balanço das funções mentais e orgânicas no ser humano, renovando, recuperando e mantendo a saúde espiritual, física e mental. É um dos ingredientes básicos na indústria dos perfumes, alimentícia e na indústria farmacêutica (Fontes et al., 2008).

Estes óleos são compostos por moléculas de baixo peso molecular, gerados na planta por diferentes rotas biossintéticas e pertencentes a diferentes tipos de classes químicas: álcool, ácidos, ésteres, fenóis, terpenos, entre outras. Alguns deles se caracterizam por um odor típico e uma volatilidade alta. Atuam como agentes de defesa química nas plantas contra predadores, insetos, microrganismos (bactérias, fungos, vírus), e contra qualquer tipo de praga, também são remédios vegetais endógenos que ajudam a regenerar os tecidos da planta (Ortiz et al., 2008).

Os seus usos foram reportados por diferentes culturas através da história, foi encontrada a menção dos seus usos nos hieróglifos egípcios, e a presença de *Frankincense* (árvore de incenso) e de Nardo indico (*Nardostachys jatamansi*) na tumba do faraó Tutankamon, os antigos gregos e os romanos usavam os extratos de plantas com fins cosméticos e quando tomavam banho, para aromatizar o seu cabelo e corpo, e a sua elaboração industrial começou na França no final do século XVII. O conhecimento obtido pelos árabes na idade média de como destilar o álcool, foi o início da fabricação de perfume como é conhecido nos dias atuais, uma mistura de água, álcool e óleos essenciais (Suarez et al., 2007).

2.5.1 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ser obtidos por meio de três técnicas principais (Figura 1). A pressão com vapor é um processo onde é utilizado um vapor superaquecido que penetra no material vegetal a uma pressão mais alta que a pressão atmosférica, a corrente de vapor rompe as células da planta e carrega a mistura volátil que é condensada depois por meio de um agente esfriante, geralmente os óleos são muito mais leves e não são solúveis em água, sendo separados por decantação. Esse método é utilizado para extração de óleos de rizomas, raízes, sementes e folhas secas ou fermentadas. No sistema de destilação com água-vapor, é utilizado um vapor de água em ebulição que passa pelo material vegetal que se encontra pendurado em uma malha. E na hidrodestilação, ocorre um processo onde o material vegetal se submerge diretamente na água, que é esquentada até a fervura, esse método é utilizado principalmente com material delicado como algumas flores (Camargo et al., 2008).

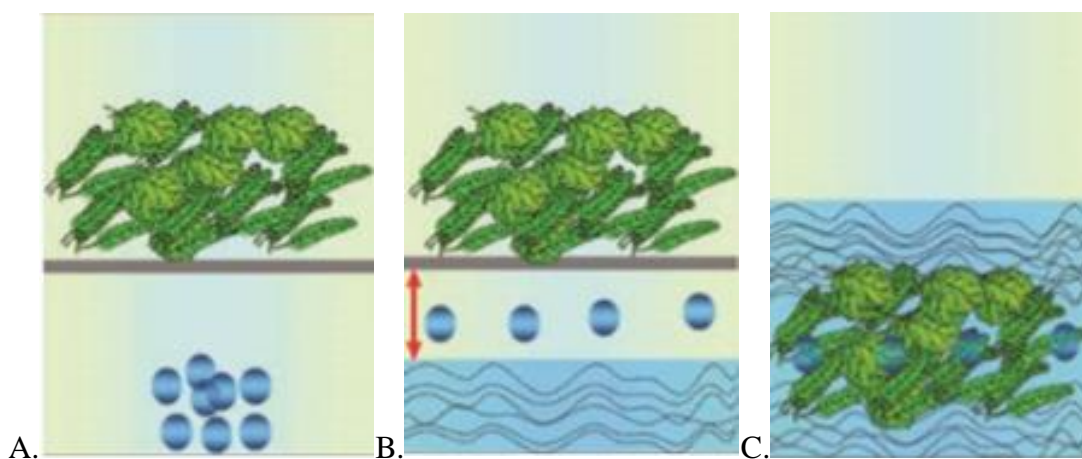


Figura 1. Técnicas de extração dos óleos essenciais A. Extração mediante pressão com vapor, B. Destilação água-vapor, C. Hidrodestilação.

De acordo com a espécie, o rendimento no processo de extração do óleo varia, pode ser desde 0,01% em flor de jasmim e rosas, e de 4-6% em diferentes tipos de sementes, em média as plantas aromáticas tem de 0,2 até 2% de óleo essencial. O rendimento é uma característica importante desde o ponto de vista econômico, que avalia a rentabilidade do processo, bem como a qualidade organoléptica, uma vez que a sua apreciação sensorial às vezes é subjetiva, mas de muita importância para sua posterior incorporação em produtos comerciais (Palacio et al., 2008).

2.5.2 Uso dos óleos essenciais

Os óleos essenciais provenientes de plantas são compostos em sua maioria por hidrocarbonetos de terpeno (Monoterpenos $C_{10}H_{16}$, e sesquiterpenos, $C_{15}H_{24}$) e os seus derivados oxigenados (álcool, aldeídos, cetonas e alguns ácidos) que juntos são conhecidos como terpenoides. Têm sido reportados como agentes químicos preventivos usando os seus princípios ativos em tratamentos de doenças como arterioscleroses, trombozes, e como veículo para facilitar a penetração dérmica de fármacos de aplicação tópica. Os óleos essenciais ou os seus compostos também são reportados como agentes antimicrobianos, antifúngicos e têm propriedades antivirais e antidiabéticas. O êxito na ação antimicrobiana em bactérias como o *Staphylococcus aureus* ou a *Escherichia coli*, resistentes aos antibióticos tradicionais, está relacionada com a composição dos óleos, que são misturas de substâncias que atuam mediante um sinergismo potenciado (Colorado et al., 2007).

A indústria de óleos essenciais está relacionada não só com o setor produtivo e tecnológico por meio da destilação, transformação e refinaria, mas também com o desenvolvimento agrícola no estabelecimento de cultivos industriais de plantas aromáticas para a obtenção de óleos. Em média, a cada mil quilogramas de material vegetal são obtidos dez quilogramas de óleo essencial, só um 1%, o que indica a necessidade de ter cultivos extensos, de muitos hectares (10.000 até 40.000 plantas/ha) para a obtenção de 500 até 1.000 Kg de óleo por ano (Staschenko et al., 2009).

Os óleos essenciais são utilizados como ingredientes em dentifrícios, shampoo, cremes, óleos para massagem, perfume, aromatizantes, desodorantes, desinfetantes e múltiplos produtos de higiene pessoal, também são utilizados na indústria do tabaco, têxtil, bebidas alcoólicas, refrigerantes, aromatizantes, e na indústria agrícola, como biorreguladores, bioinseticidas e em compostos alelo químicos (Castellanos et al., 2007).

2.6 *Melaleuca leucadendron* (Linneu)

Melaleuca leucadendron (L.) é uma árvore originária da Austrália, conhecida como a árvore da crosta de papel. Esta espécie se encontra geralmente em bosques, pomares ou matagal aberto, particularmente do lado de lagos e na borda de pântanos; transforma o ecossistema ao deslocar a vegetação típica da zona e a fauna original. Pertence à família

Myrtaceae, apresenta caule branco acinzentado e esponjoso com folhas geralmente verde-escuras. As flores são branco-amareladas e pequenas e os frutos são lenhosos, capsulados e globosos. Essa árvore tem a propriedade de secar o terreno onde é plantado, diminuindo o conteúdo de água para as demais espécies (Pérez, et al., 2010).



Figura 2. *Melaleuca leucadendron*. A. Árvore; B. Folhas, flor e fruto.

2.6.1 Usos das folhas de *Melaleuca leucadendron*

As folhas de *M. leucadendron* podem ser úteis para o tratamento da pressão arterial alta, o herpes simplex e da inibição de *Helicobacter pylori* (Marshall et al., 2002; Goodwin et al., 2007). Também podem ter efeitos hipoglicêmicos, diminuindo os níveis de açúcar no sangue. São atribuídas propriedades antiparasitárias, antissépticas, analgésicas, estimulantes e inseticidas; na medicina tradicional é recomendada como antimalárica ou antipirética, expectorante, antisséptico urinário, anti-helmíntico, para o tratamento do reumatismo e doenças da pele (Pérez et al., 2010).

2.6.2 Óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*

O óleo essencial extraído dessa planta tem atividade anti-helmíntica, antimicrobiana, antifúngica, antiviral e como repelente de insetos (Goodwin et al., 2007). Tem sido comprovada a ação inseticida do óleo em larvas de *Aedes aegypti* L. e o efeito repelente sobre *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hym. Formicidae) (Marshall et al., 2002). Também foi

realizado pelo autor Rodríguez um estudo toxicológico da administração do extrato e do óleo essencial em ratos Wistar e não foram encontrados sinais clínicos, lesões morfológicas, nem histológicas que evidenciam efeitos tóxicos (Pérez et al., 2010). Embora o mecanismo de ação antimicrobiana ainda não tem sido elucidado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos etanólico, acetato etilênico e hexânico da própolis e do óleo essencial de *Melaleuca leucadendron* a fim de propor um mecanismo de ação do produto com maior atividade antimicrobiana.

3.2 Etapas do trabalho

- ✓ Padronizar a cinética de crescimento dos microrganismos selecionados a partir de diferentes fontes de inóculo.
- ✓ Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos e do óleo escolhidos, durante a fase exponencial dos microrganismos.
- ✓ Selecionar e caracterizar o produto com maior potencial de atividade antimicrobiana.
- ✓ Propor um mecanismo de ação antimicrobiana do produto selecionado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Extratos de própolis

A própolis foi adquirida do Apiário Flores, situado na localidade de Santo Amaro do Botafogo - Ouro Preto, Minas Gerais-Brasil. Em seguida as frações foram obtidas através da extração sequencial utilizando solventes de polaridade crescente (hexano, acetato de etila e etanol). O método utilizado foi o ultrassom a partir de 3 ciclos de 60 minutos para cada solvente, sendo que a cada período o extrato foi filtrado e adicionado mais solvente. Após completada a extração, as soluções foram submetidas a evaporação dos solventes extratores em evaporador rotativo, a uma temperatura limite de 40° C.



Figura 3. A. Própolis durante o processo de extração sequencial. B. Extrato de própolis concentrado após evaporação do solvente extrator.

4.1.2 Óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*

As folhas de *M. leucadendron* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), situada no município de Ouro Preto, Minas Gerais (20°23'51"S; 43°30'40"W), no ano de 2016. A exsicata *M. leucadendron* foi depositada no Herbário Prof. José Badini do Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente (DEBIO) do

Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (ICEB/UFOP), sob o número OUPR 29495. As folhas frescas foram cortadas a fim de reduzir o seu tamanho e obter uma maior superfície de contato, depois foram pesadas e acondicionadas em um compartimento denominado dorna. O vapor de água ao passar pelo material vegetal extrai os compostos voláteis da planta. Depois de obter o óleo, foi colocado em um tubo de ensaio para centrifugação. O óleo foi recolhido e pesado para cálculo do rendimento. O acondicionamento foi realizado em vidro de penicilina devidamente tampado, ao abrigo de luz com auxílio de papel alumínio e mantido a baixa temperatura em geladeira.



Figura 4. Óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*

4.2 Microrganismos avaliados

Os microrganismos selecionados (Tabela 2) foram crescidos em ágar e caldo Muller-Hinton procedentes de um estoque e cada repique foi incubado durante 24 horas em estufa para cultura bacteriológica a 37° C.

Tabela 2. Microrganismos selecionados para avaliação da atividade dos extratos de própolis e do óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*.

Microrganismo	Referência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Listeria monocytogenes</i>	Isolado clinico
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883

<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 25933
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Salmonella thiphymurium</i>	ATCC 14028
<i>Shiguela flexnerii</i>	ATCC 12022
<i>Providencia rettgeri</i>	ATCC 29944
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433

4.3 Padronização da cinética de crescimento dos microrganismos selecionados

Nesta etapa foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços com meio de cultura, caldo Mueller-Hinton, os inóculos foram preparados de acordo com a fonte de crescimento que seria testado (meio líquido ou meio sólido) em sete diferentes concentrações e foi lida a absorvância de cada um, no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 600nm, desde o início do crescimento até chegar à fase estacionária de cada um dos microrganismos. A avaliação foi feita de hora em hora e confirmada pela técnica de contagem em placa durante três diferentes tempos da curva.

4.3.1 Crescimento a partir de meio sólido

A partir de um repique do estoque de cada bactéria, com 24 horas de crescimento em ágar Mueller-Hinton, foi tomada uma colônia, fazendo um ajuste de acordo com o ponto 0,5 da escala de McFarland, sendo confirmado mediante absorvância e contagem em placa, uma concentração aproximada de 10^8 UFC/mL. Após ser confirmado o ajuste, foram feitas diluições seriadas em microtubos tipo Eppendorf® na relação 1:10 (100 µL inóculo ajustado em solução salina 0,9%/ 900 µL de caldo Mueller-Hinton), até chegar a uma concentração de 10^3 UFC/mL. Em seguida, foram adicionadas na microplaca, 50 µL de caldo Mueller-Hinton e 50 µL de inóculo ajustado a cada concentração em triplicata. Como controles foram utilizados um controle de antibiótico, colocando 50 µL do antibiótico específico reportado para cada bactéria tetraciclina ou moxifloxacino, de acordo com o caso, e 50 µL de inóculo ajustado em caldo Mueller-Hinton, e como controle do meio de cultura, 100 µL de caldo Mueller-Hinton. As amostras foram incubadas por 20 horas a 37° C em estufa, e cada hora desde a hora zero foram feitas as medidas de absorvância, as contagens em placa foram realizadas na hora zero, na hora dez e na hora vinte de incubação.

4.3.2 Crescimento a partir de meio líquido

Com um repique obtido com 24 horas de crescimento, foi tomada uma colônia que depois foi transferida para 2 mL de caldo Mueller-Hinton, incubando em estufa bacteriológica entre 10-12 horas a 37° C. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos e lavadas com 2 ml de solução salina a 0,9%. Após a lavagem, as bactérias foram re-suspensas em 2 mL de solução salina a 0,9% e 200 µL desta foram transferidos a 1,8 mL de um caldo Mueller-Hinton fresco para obter um volume final de 2mL. Em seguida, foram incubados novamente por mais duas horas em estufa a 37° C, após esse processo foi feito o ajuste de acordo com a escala de McFarland 0,5 sendo confirmado mediante absorvância e contagem em placa, uma concentração aproximada de 10⁸ UFC/mL. Após ser confirmado o ajuste, foram feitas diluições seriadas 1:10, como foi descrito na metodologia anterior. Na microplaca foram colocados 50 µL de caldo Mueller-Hinton e 50 µL de inóculo ajustado a cada concentração por triplicata, e os controles como já foram descritos anteriormente. As amostras foram incubadas por 10 horas a 37° C na estufa, e cada hora desde a hora zero foram feitas as medidas de absorvância, as contagens em placa foram realizadas na hora zero, na hora cinco e na hora dez de incubação.

4.4. Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos e do óleo escolhidos, durante a fase exponencial de cada microrganismo

De acordo com o experimento anterior, após realizar os ensaios de padronização das cinéticas de crescimento para cada bactéria escolhida e determinar a concentração ótima de partida, foram realizados os ensaios de avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos e do óleo essencial na fase exponencial correspondente para cada microrganismo. Para isto foram avaliadas sete diferentes concentrações dos extratos e do óleo para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e avaliar a ação antimicrobiana na fase onde a bactéria se encontra metabolicamente mais ativa.

4.4.1 Avaliação dos extratos etanólico, acetato etilênico e hexânico de própolis

Tendo um repique com 24 horas de crescimento, foi utilizada a metodologia de crescimento em meio líquido para avaliar os extratos, essa metodologia foi desenvolvida e padronizada neste trabalho. Foram feitas diluições de cada um, na relação 1:2 em caldo

Mueller-Hinton, para ajustar as concentrações que seriam avaliadas. Foram pesados 100 mg de cada extrato de própolis e foi diluído em 1 mL de caldo com DMSO 2%, para obter uma concentração inicial de 100 mg/mL, depois foram feitas as diluições 1:2 em microtubos tipo Eppendorf®, onde foram colocados 500 µl de caldo em cada um dos tubos, logo após adicionou 500 µl da primeira suspensão homogeneizando e retirando 500 µl, e assim sucessivamente, a fim de fazer o ajuste, e obter as seguintes concentrações avaliadas: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625 e 0,78125 mg/mL. Depois desse procedimento, foram colocadas nas microplacas de Elisa de 96 poços, 50 µL de suspensão de bactéria, e 50 µL de extrato ajustado, por triplicata, a microplaca foi incubada em estufa bacteriológica a 37° C por 3-4 horas de acordo com o início da fase exponencial de cada bactéria. Para os controles foram utilizados, um controle negativo onde foram colocados 50 µL de caldo e 50 µL de suspensão de bactéria, um controle positivo ou de antibiótico, onde foram utilizados 50 µL de antibiótico específico para cada bactéria, tetraciclina ou moxifloxacino de acordo com o caso, e 50 µL de inóculo ajustado em caldo Mueller-Hinton, e um controle de meio de cultura com 100 µL de caldo Mueller-Hinton. As amostras foram incubadas e lidas de hora em hora, no espectrofotômetro, de acordo com o tempo da fase exponencial determinada para cada bactéria, terminada a fase exponencial de cada uma, foi feita a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) seguindo a metodologia de Ostrosky et al (2008).

4.4.2 Avaliação do óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*

Com um repique de 24 horas de crescimento, e com a metodologia de crescimento em meio líquido, foram ajustadas as suspensões de bactérias. Após o ajuste foram deixadas em incubação na estufa bacteriológica a 37° C por 3-4 horas de acordo com o início da fase exponencial de cada uma. Para o ajuste das concentrações do óleo, foram utilizados microtubos tipo eppenforf®, onde foram adicionados 500 µL de óleo essencial, em 500 µL de caldo, homogeneizando e passando para o seguinte tubo, a fim de fazer o ajuste das concentrações a avaliar, que foram: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 e 7,8125 µL/mL. Depois desse procedimento, foram adicionados nas microplacas de 96 poços, 50 µL de suspensão de bactéria, e 50 µL do óleo ajustado, e os controles como foram descritos na metodologia anterior. Foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) seguindo a metodologia de Ostrosky et al., (2008).

4.5. Seleção e caracterização do produto com maior espectro de atividade

De acordo com o resultado do objetivo anterior foi selecionado o produto com maior espectro de atividade antimicrobiana, que com base nos resultados foi o óleo essencial de *M. leucadendron*.

4.5.1. Caracterização química do óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*

A caracterização química do óleo essencial foi realizada através da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (Shimadzu, modelo QP2010 com coluna capilar de sílica fundida DB-5MS com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme) na Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Farmacêutico da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (DDTF/DPD – FUNED).

As amostras foram preparadas a partir de 20 µL do óleo essencial e 980 µL de acetato de etila e injetadas sob as seguintes condições de uso: temperatura inicial da coluna: 60°C, Split 1:50, pressão: 79,7 kPa, temperatura do injetor: 250°C; gás de arraste: Hélio; temperatura inicial do forno: 60°C, aumentando até 240°C na taxa de 3°C/min, com tempo total de análise de 60 min por uma velocidade linear de 41,6 cm/s, temperatura na fonte: 250°C, temperatura na interface: 290°C, tempo de *cut off*: 3.8 min, scan de 4-60 min e velocidade de scan de 1666 e faixa de m/z 20-500. O banco de dados utilizado foi o “Wiley Mass Spectral Database”.

Hidrocarbonetos de 9 a 25 carbonos foram utilizados como padrão e, em seguida, realizou-se o cálculo do índice de Kovats (IK) de acordo com a fórmula abaixo:

$$IK = 100 \times \left\{ n + (N - n) \left[\frac{(tr \text{ amostra} - tr n)}{(tr N - tr n)} \right] \right\} \quad \text{Equação 1}$$

Onde, IK é o índice de Kovats, n é o número de átomos de carbonos no n-alcano menor, N é o número de átomos de carbonos no n-alcano maior e tr é o tempo de retenção.

A identificação das substâncias foi realizada pela interpretação dos respectivos espectros de massa e por comparação com espectros de massa de banco de dados, com dados da literatura e pelo índice de Kovats (Adams, 1989).

4.5.2 Avaliação *in silico* da atividade antimicrobiana

Os compostos majoritários identificados por meio da CG-EM do óleo essencial obtido a partir de folhas de, *M. leucadendron* foram analisados *in silico* utilizando PASS online (*Prediction Activity Spectra of Substances*). Os resultados das análises por PASS online são fornecidos como probabilidade de o composto ser ativo (Pa) e inativo (Pi) (www.pharmaexpert.ru/passonline) (Amparo, 2016).

Visando avaliar o potencial para a atividade antimicrobiana dos constituintes majoritários do óleo essencial, foram analisados os resultados de Pa e Pi para os seguintes efeitos biológicos: anti-infeccioso, antimicobacteriano, inibição da biossíntese da parede bacteriana, inibição da síntese de DNA, inibição da síntese proteica e potencializador da permeabilidade da membrana. Também foram analisados os resultados relacionados aos seguintes mecanismos de ação: inibição da DNA girase, inibição da DNA topoisomerase IV, inibição da subunidade ribossomal 30S, inibição da subunidade ribossomal 50S, inibição de RNA polimerase dependente de DNA, inibição de NAD⁺-arginina ADP-ribosiltransferase, inibição de piruvato cinase, inibição de peptidoglicano glicosiltransferase, inibição da 2-Deidropantoato 2-redutase, inibição de CDP-glicerol glicerofosfotransferase, inibição de micotiol-S-conjugado amidase. Os resultados das análises foram expressos pela diferença (Pa-Pi) e foram classificados como: Pa-Pi < 0,2: baixo potencial; Pa-Pi < 0,5: moderado potencial; Pa-Pi ≥ 0,5: alto potencial.

4.5.3 Teste de permeabilidade de membrana

A fim de confirmar os resultados obtidos nas análises *in silico* dos possíveis mecanismos de ação antimicrobiana do óleo avaliado, procedeu-se ao repique de cada um dos microrganismos susceptíveis ao óleo essencial de folhas de *M. leucadendron*. Após o repique, foram incubados em estufa a 37° C por 24 horas, para depois fazer o ajuste 0,5 na escala de McFarland estimando uma concentração de 1x10⁸ UFC/mL. O inóculo foi diluído em caldo Mueller-Hinton a fim de obter uma concentração de 1x10⁶ UFC/mL. O óleo essencial foi ajustado em caldo Mueller-Hinton em uma concentração equivalente a 2x concentração inibitória mínima (CIM) para cada microrganismo. Posteriormente, em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de inóculo e 100 µL do óleo, para o controle negativo 100 µL de inóculo e 100 µL de caldo Mueller-Hinton. O teste foi realizado em

triplicata para cada uma das amostras e a placa foi incubada na estufa por 24 horas a 37° C. Após a incubação, foram retiradas as amostras dos poços e colocadas em tubos de citometria e adicionados 2 mL de tampão PBS, para centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm. Em seguida foi descartado o sobrenadante e as amostras re-suspendidas em 100 µL de PBS e 1 µL de iodeto de propídio (1mg/mL) e homogeneizado cada tubo. Em um dos tubos do controle negativo não foi adicionado o iodeto de propídio a fim de obter o controle de marcação. As amostras foram então incubadas a temperatura ambiente e ao abrigo de luz por 30 minutos, e após esse período, foram analisadas no citômetro de fluxo. Os resultados foram analisados utilizando o software *FlowJo v.10* e os gráficos obtidos através do software *GraphPad Prism 5.0*.

4.5.4 Análise em microscopia eletrônica de transmissão

Para essa análise foi selecionada uma das bactérias que mostraram diferença significativa no teste de permeabilidade de membrana com as células não expostas ao óleo essencial, a fim de visualizar o efeito na membrana celular da bactéria. Para isso foi feito um repique do microrganismo e incubado na estufa por 24 horas a 37° C. Após a incubação foi re-suspendido em solução salina 0,9% a fim de obtê-lo na concentração de 1×10^8 UFC/mL (0,5 escala McFarland). Foi adicionado 1 mL de inóculo para cada microtubo (em triplicata) e incubado na estufa por 24 horas a 37°C, depois foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm e descartou-se o sobrenadante. O óleo foi ajustado na concentração inibitória mínima (CIM) previamente relatada, e foi adicionado 1 mL (controle negativo: somente caldo Mueller-Hinton, e o tratamento) e incubado na estufa por 24 horas a 37°C. Após esse período, foi centrifugado novamente por 10 minutos a 4000 rpm, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi lavado três vezes com 1 mL de solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,3. Em seguida foi adicionado 1 mL de fixador glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 e foi armazenado por 6-8 horas em geladeira, centrifugado novamente por 10 minutos a 4000 rpm. Por fim, descartou-se o sobrenadante e foi lavado mais uma vez com 1 mL de solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 e, depois de descartado o sobrenadante, o *pellet* foi mantido em 1 mL de solução tampão fosfato 0,1M pH 7,3 em geladeira até a análise.

A amostra foi levada para o centro de aquisição e processamento de imagens (CAPI/UFMG) para obtenção do corte ultrafino. Posteriormente as amostras foram analisadas através da microscopia eletrônica de transmissão.

4.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do software *GraphPad Prism 5.0*. Foi utilizada a tabela de ANOVA para o estudo de homogeneidade de variâncias, no caso dos dados paramétricos, e foi realizada uma prova de comparações múltiplas de Duncan, no caso de diferenças nos tratamentos, com um intervalo de confiança do 95% e um ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Padronização da cinética de crescimento dos microrganismos escolhidos

Esses resultados permitiram determinar a concentração e a técnica ótima na qual cada bactéria consegue obter o maior rendimento e quanto tempo de incubação seria necessário para atingir a fase estacionária. As curvas de crescimento microbiano representam a evolução do número de células viáveis presentes em um cultivo microbiano líquido ao longo do tempo de estudo. Das quatro fases da curva de crescimento, a fase de crescimento exponencial ou logarítmica é a que apresenta maior interesse, por ser a fase na qual o aumento do número de microrganismos é máximo e a patogenicidade é maior (Crisler et al., 2012), por essa razão concentrou-se em determinar a fase exponencial ou logarítmica para cada microrganismo escolhido.

Nos resultados obtidos na curva de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, consegue-se observar que quando essa bactéria é crescida com uma inoculação a partir do meio líquido, consegue-se chegar ao início da fase exponencial na hora 4, quando apresentou diferença estatística com a densidade ótica do tempo zero, quando a concentração inicial foi de 5×10^7 UFC/mL, enquanto que a partir do crescimento em meio sólido, o início da fase exponencial se encontra na hora 6 com a mesma concentração (Figura 5). Também foi possível identificar que a fase exponencial do crescimento a partir de meio líquido foi menor que a proveniente do meio sólido, esse fenômeno pode estar relacionado com o estímulo que as células tiveram quando foram deixadas por mais duas horas de incubação em meio líquido após as lavagens e a troca de caldo, já que a disponibilidade de nutrientes estimula o crescimento num tempo menor (Wagner et al., 2003). Em curvas de crescimento realizadas com a mesma cepa, relatados em outros estudos, consegue-se observar que a fase de início do crescimento exponencial foi na hora quatro, resultados comparáveis com os obtidos com a curva de crescimento a partir do meio líquido. (Yates et al., 2002).

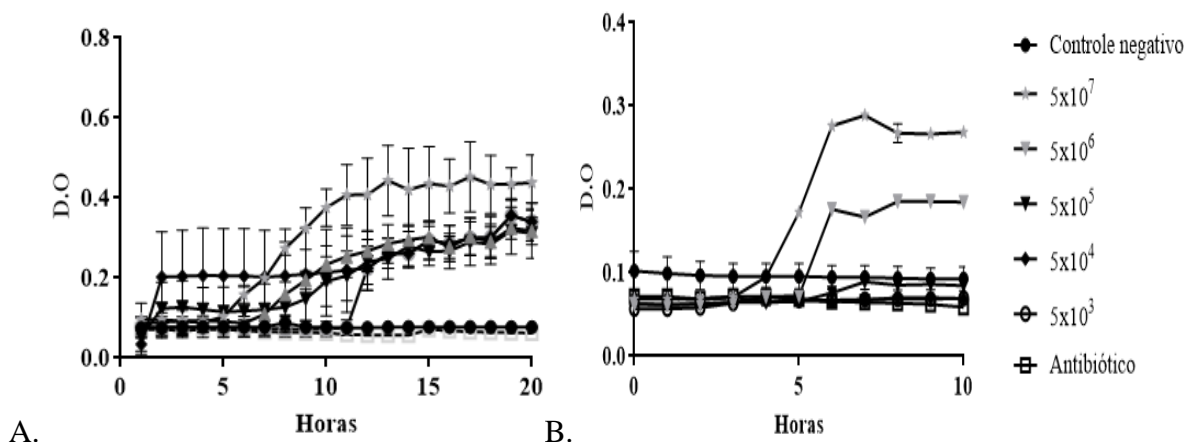


Figura 5. Curva de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*. A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido. Cinco diferentes concentrações de início da cepa bacteriana (5×10^3 a 5×10^7), do controle de antibiótico e o controle do meio de cultura (Controle negativo). Os resultados são produto da média de 3 dados.

Para *Escherichia coli* os tempos de início da fase exponencial foram na hora 4 para as duas metodologias de crescimento, as quais têm diferença estatística com a densidade óptica inicial, mesmo assim, a cinética foi similar com a da bactéria *P. aeruginosa*, demonstrando uma fase logarítmica menor, mas com uma maior quantidade de células quando o crescimento foi a partir do meio sólido. Isso pode ser devido ao fato que as células com menor disponibilidade de nutrientes podem ter uma diminuição no ritmo do metabolismo, sendo mais lento do que as bactérias que tiveram uma renovação do meio de cultura (Conner et al., 1995). Nessa cinética, as concentrações que alcançaram num tempo similar na fase estacionária foram 5×10^7 e 5×10^6 UFC/mL, razão pela qual foi escolhida a concentração 5×10^6 UFC/mL como concentração de início, já que com menor quantidade de nutrientes e oxigênio consegue manter o ritmo metabólico, chegando à mesma densidade óptica final que a concentração de início 5×10^7 UFC/mL (Figura 6). No uso do controle de tetraciclina, antibiótico específico para essa bactéria, este tinha uma coloração amarelada, o que mostra uma leitura maior através do tempo de medição, mesmo assim não houve crescimento bacteriano na presença do antibiótico (Figura 6). De forma similar foi observado esse perfil para as espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella flexneri* e *Enterococcus faecalis*.

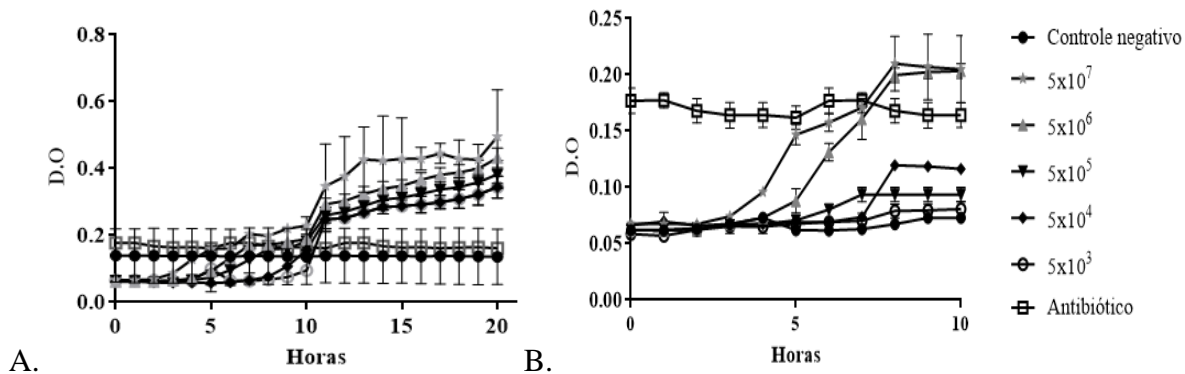


Figura 6. Curva de crescimento *Escherichia coli* A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido. Cinco diferentes concentrações de início da cepa bacteriana (Ino- 5×10^3 a 5×10^7), do controle de antibiótico e o controle do meio de cultura (Controle negativo). Os resultados são produto da media de 3 dados.

As curvas com o microrganismo *Staphylococcus aureus* tiveram uma grande diferença em relação à densidade ótica, já que com a curva a partir do meio sólido foi obtido o dobro da DO em comparação ao do meio líquido. Mesmo assim, a hora de início da fase logarítmica foi a mesma nas duas curvas (Figura 7). Os resultados são comparáveis com o estudo de Kim et al. (2011) onde cepas de *S. aureus* ajustadas a 10^5 UFC/mL, crescidas em caldo Mueller-Hinton e que foram incubadas num agitador orbital a 37°C por 24 horas, mostraram o início da fase exponencial nas mesmas horas que as duas curvas realizadas neste estudo, mas os valores de DO obtidos no estudo relatado têm valores similares aos obtidos com a curva a partir do meio sólido, o que sugere que a troca de substrato feita para as bactérias crescidas em meio líquido, gerou uma diminuição no ritmo de multiplicação celular (Figura 7).

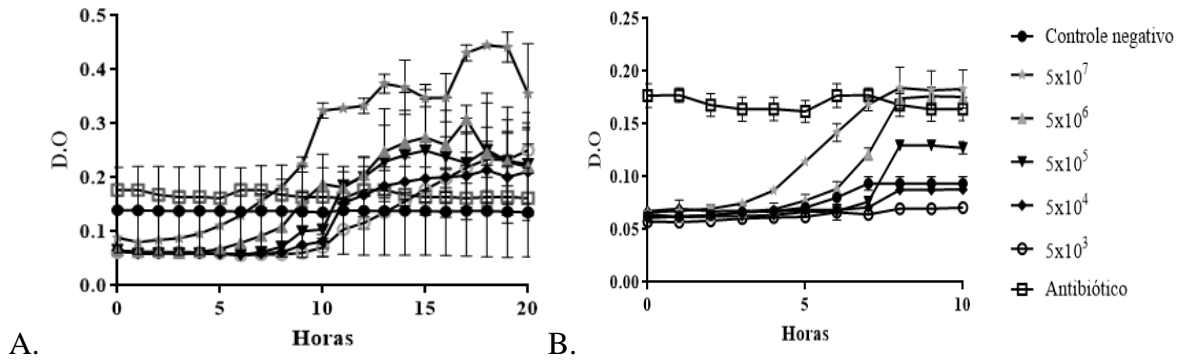


Figura 7. Curva de crescimento *Staphylococcus aureus* A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido. Cinco diferentes concentrações de início da cepa bacteriana (Ino- 5×10^3 a 5×10^7), do controle de antibiótico e o controle do meio de cultura (Controle negativo). Os resultados são produto da media de 3 dados.

Para *Listeria monocytogenes*, o tempo de crescimento na curva a partir do meio sólido foi mais lenta comparada com a do meio líquido. No entanto, a concentração que demonstrou um crescimento mais representativo para as duas curvas foi a de 5×10^7 UFC/mL e o tempo da fase exponencial foi de 5 horas para as duas curvas (Figura 8). Esses resultados foram similares aos encontrados por Giménez et al. (2004), onde testaram diferentes bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *Enterococci* e *Lactobacilaceae*, onde se encontra a *L. monocytogenes*, e na elaboração de curvas de crescimento identificaram que o grupo de bactérias onde o crescimento foi mais lento, pertencia à família da *L. monocytogenes*, confirmando que é uma bactéria de lento crescimento, já que apresenta muita sensibilidade com pequenas mudanças na temperatura, pH e substrato (Giménez et al., 2004).

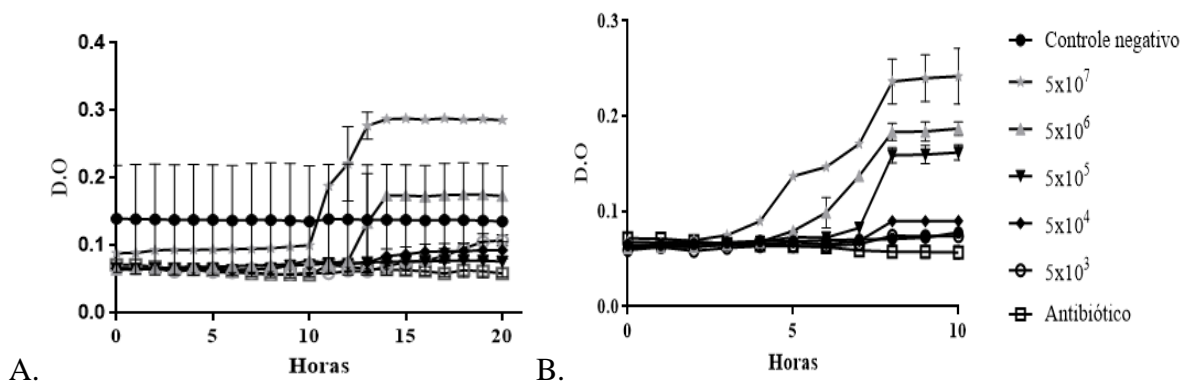


Figura 8. Curva de crescimento *Listeria monocytogenes* A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido. Cinco diferentes concentrações de início da cepa bacteriana (5×10^3 a 5×10^7), do controle de antibiótico e o controle do meio de cultura (Controle negativo). Os resultados são produto da média de 3 dados.

Já a bactéria *Klebsiella pneumoniae* teve uma fase adaptativa muito curta, já que para as duas curvas o tempo de início da fase logarítmica foi nas 2 horas de incubação, demonstrando, assim, ser uma bactéria de rápido crescimento, com uma fase exponencial de aproximadamente 9 horas para as duas curvas. Esses resultados são comparáveis com os de Tsai et al. (2011), onde um isolamento de *Klebsiella pneumoniae* demonstra uma cinética de crescimento com grande similaridade com a curva relatada neste estudo (Figura 9).

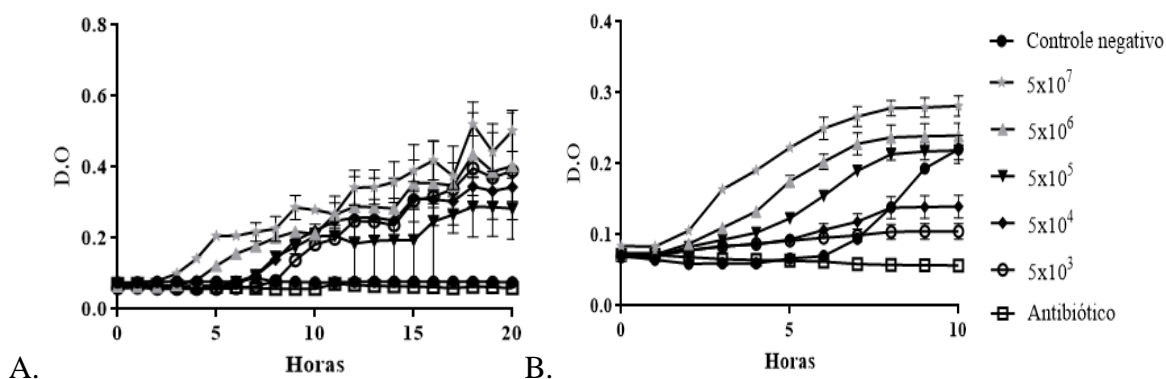


Figura 9. Curva de crescimento *Klebsiella pneumoniae* A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido. Cinco diferentes concentrações de início da cepa bacteriana (5×10^3 a 5×10^7), do controle de antibiótico e o controle do meio de cultura (Controle negativo). Os resultados são produto da média de 3 dados.

O *Proteus mirabilis* mostrou um início da fase logarítmica na hora 3 para as duas curvas e a concentração que teve o maior rendimento de células foi a de 5×10^7 UFC/ mL. Além disso, é também uma bactéria de rápido crescimento que obteve uma maior DO com a curva a partir de meio sólido (Figura 10). Este início precoce da fase exponencial foi confirmado por Siqing et al. (2008), onde avaliaram a produção e caracterização de uma cepa de *P.mirabilis*, que com ótimas fontes de carbono e nitrogênio, consegue iniciar seu crescimento na mesma hora relatada neste estudo.

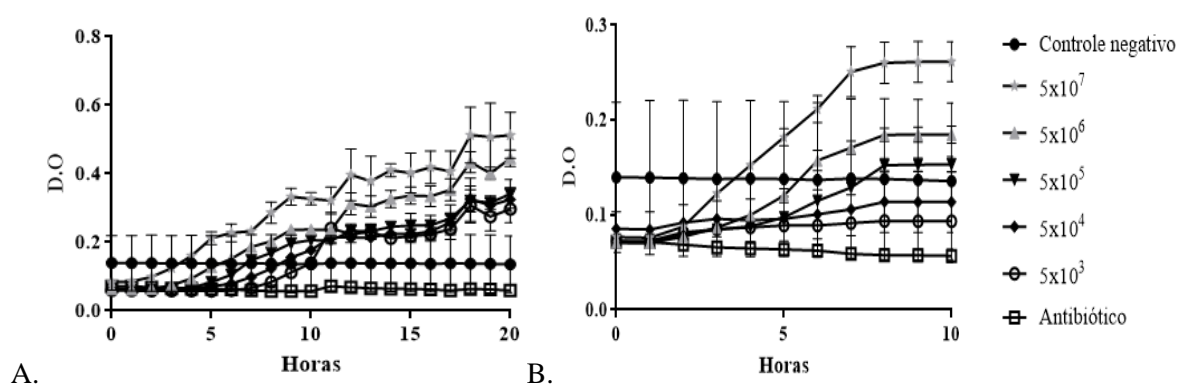


Figura 10. Curva de crescimento *Proteus mirabilis* A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido. Cinco diferentes concentrações de início da cepa bacteriana (5×10^3 a 5×10^7), do controle de antibiótico e o controle do meio de cultura (Controle negativo). Os resultados são produto da media de 3 dados.

Para o crescimento da bactéria *Staphylococcus saprophyticus*, a partir do meio sólido, obteve-se crescimento só na concentração inicial de 5×10^7 UFC/mL. Esse fenômeno pode ser apresentado quando concentrações muito baixas não conseguem se adaptar ao meio de crescimento ou precisam de mais tempo para começar o seu metabolismo (Fux et al., 2005). Caso contrário aconteceu na curva a partir de meio líquido, onde o crescimento nas distintas concentrações foi similar (Figura 11). Essa bactéria não tem relatos prévios de curvas de crescimento para definição da fase exponencial.

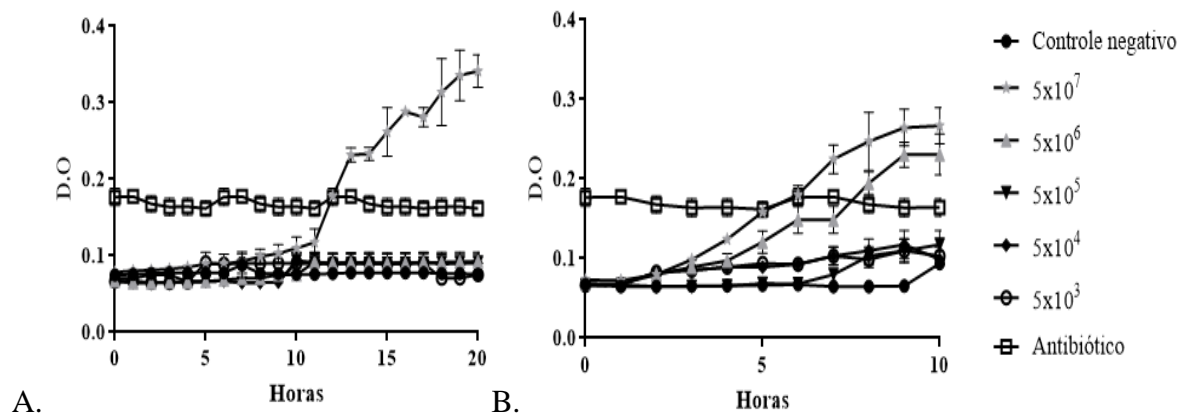


Figura 11. Curva de crescimento *Staphylococcus saprophyticus* A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido. Cinco diferentes concentrações de início da cepa bacteriana (Ino- 5×10^3 a 5×10^7), do controle de antibiótico e o controle do meio de cultura (Controle negativo). Os resultados são produto da media de 3 dados.

Enterobacter aerogenes apresentou um início da fase logarítmica na hora 2 nas duas curvas e no crescimento a partir de meio líquido, a concentração de 5×10^6 UFC/mL não teve diferença com a de 5×10^7 UFC/mL, demonstrando que dependendo da bactéria a concentração inicial deve variar, já que as vezes as concentrações altas podem gerar uma mortalidade maior pela falta de oxigênio e nutrientes no meio de cultura (Quiang et al., 2010). Nesse caso foi selecionada a concentração de 5×10^6 UFC/mL. (Figura 12). Esses resultados são comparáveis com os de Lu et al, (2005), onde os tempos de crescimento de uma cepa de *E. aerogenes* foram similares em comparação aos deste experimento.

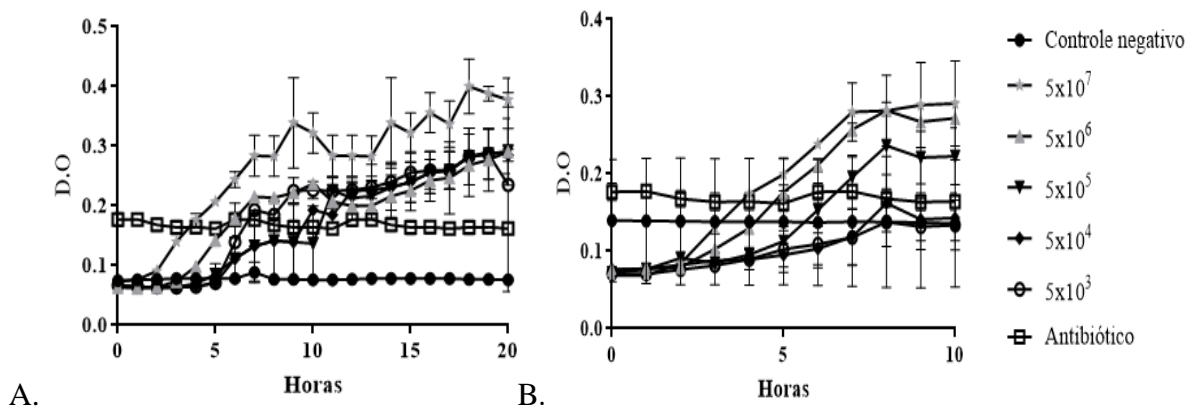


Figura 12. Curva de crescimento *Enterobacter aerogenes* A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido. Cinco diferentes concentrações de início da cepa bacteriana (Ino- 5×10^3 a 5×10^7), do controle de antibiótico e o controle do meio de cultura (Controle negativo). Os resultados são produto da média de 3 dados.

Já a *Salmonella thyphimurium* teve uma cinética similar nas duas curvas, onde as horas de início da fase logarítmica apresentam diferença estatística em relação à hora inicial, a partir da hora 3, mas a curva proveniente do meio sólido conseguiu obter maior número de células do que a de meio líquido. Mesmo assim, por meio da inoculação em meio líquido conseguiu-se chegar na fase estacionária de forma mais rápida, o que é a intenção desse experimento (Figura 13). Estudos como o de Wang et al. (2004) confirmam que *S. thyphimurium* tem um início precoce da fase exponencial e que esta tem uma duração de cinco horas aproximadamente, como também demonstrou-se neste estudo.

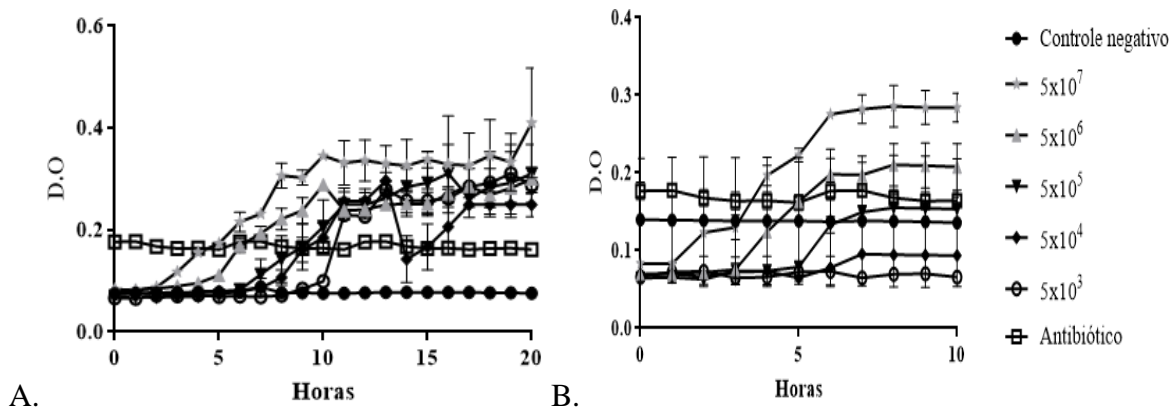


Figura 13. Curva de crescimento *Salmonella thyphimurium* A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido. Cinco diferentes concentrações de início da cepa bacteriana (5×10^3 a 5×10^7), do controle de antibiótico e o controle do meio de cultura (Controle negativo). Os resultados são produto da média de 3 dados.

Shigella flexneri, teve um início da fase logarítmica na hora 3 para a curva a partir de meio sólido e na hora 2 na curva a partir de meio líquido. Além disso, a fase exponencial foi mais curta na segunda curva, tendo uma diferença de duas horas entre cada uma, demonstrando que com o meio líquido consegue-se chegar de forma mais rápida nessa fase de interesse para o trabalho (Figura 14). Essa bactéria não tem relatos prévios de curvas de crescimento para definição da fase exponencial.

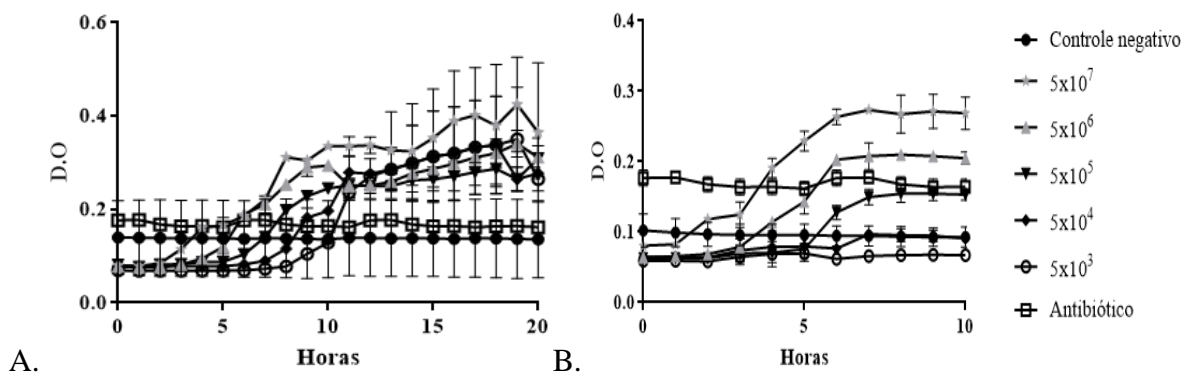


Figura 14. Curva de crescimento *Shigella flexneri* A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido. Cinco diferentes concentrações de início da cepa bacteriana (5×10^3 a 5×10^7), do controle de antibiótico e o controle do meio de cultura (Controle negativo). Os resultados são produto da média de 3 dados.

Providencia rettgeri teve uma grande diferença nas duas curvas, já que com a curva a partir de meio sólido existiram diferentes flutuações com diferenças estatísticas depois de concluir a fase exponencial. Este fenômeno chamado diauxie acontece quando uma bactéria cresce com duas fontes de carbono. Quando a primeira fonte se acaba, a bactéria volta para uma fase estacionária, enquanto sintetiza as enzimas para degradar a outra fonte de carbono (Solopova et al., 2014). Dessa forma, a curva a partir de meio líquido da fase exponencial foi de 4 horas, sendo a concentração de 5×10^7 UFC/mL a que conseguiu a maior densidade ótica (Figura 15).

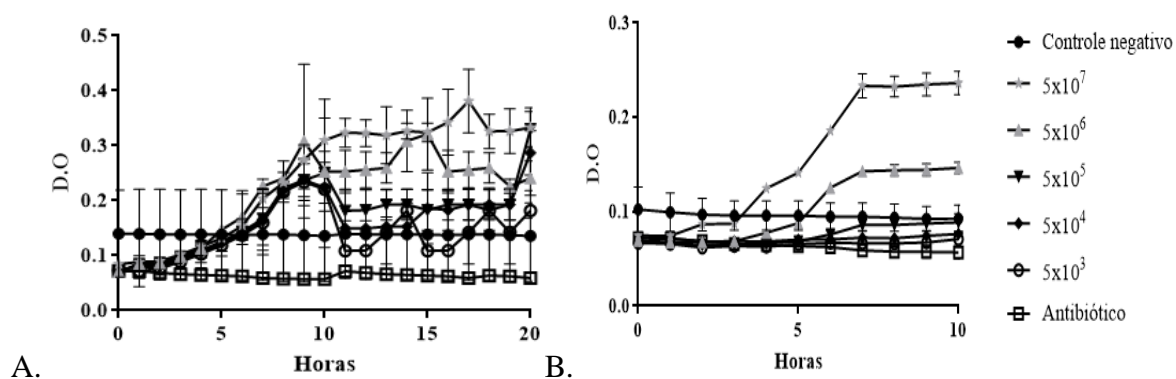


Figura 15. Curva de crescimento *Providencia rettgeri* A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido. Cinco diferentes concentrações de início da cepa bacteriana (5×10^3 a 5×10^7), do controle de antibiótico e o controle do meio de cultura (Controle negativo). Os resultados são produto da media de 3 dados.

Com a *Enterococcus faecalis*, o tempo de crescimento e de chegada na fase estacionária das duas formas de crescimento foi semelhante, sendo assim a incubação foi de 20 horas para as duas curvas, devido ao tempo de chegada na fase estacionária ter sido mais lenta independente da forma de inoculação. Estes resultados são comparáveis com os de Sandford et al.(2007), onde relatam que as bactérias Gram positivas possuem um metabolismo mais lento do que as Gram negativas (Figura 16).

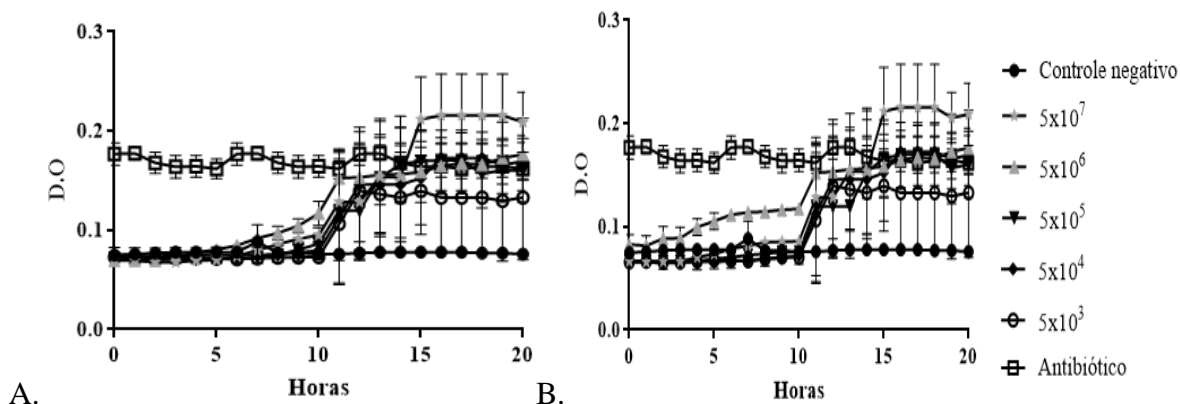


Figura 16. Curva de crescimento *Enterococcus faecalis* A. Curva de crescimento a partir de meio sólido; B. Curva de crescimento a partir de meio líquido. Cinco diferentes concentrações de início da cepa bacteriana (5×10^3 a 5×10^7), do controle de antibiótico e o controle do meio de cultura (Controle negativo). Os resultados são produto da média de 3 dados.

Os resultados pela técnica de contagem em placa demonstraram que os ajustes iniciais para cada bactéria pelas duas técnicas foram reprodutíveis, tendo ajustes iniciais entre as concentrações de 1×10^4 até 9×10^7 UFC/mL de acordo com as diferentes concentrações de início. Com o passar do tempo de incubação a tendência foi um aumento da concentração inicial, sendo as contagens pela técnica de crescimento em meio sólido maiores do que as de crescimento em meio líquido, não conseguiu-se fazer a análise estatística entre as duas curvas (meio sólido e meio líquido) já que as horas de medição foram diferentes. No caso da *P. aeruginosa*, as concentrações que depois da primeira medição não tiveram diferença com a concentração inicial nos outros dois tempos de medição foram 5×10^5 , 5×10^3 UFC/mL para meio líquido, o que sugere que essas concentrações não conseguiram chegar na fase exponencial (Anexo 1-A). Com a *E.coli*, a concentração 5×10^3 UFC/mL a partir do meio líquido não teve diferenças estatísticas no crescimento desde a hora inicial, enquanto as outras concentrações demonstraram mudanças desde a hora inicial e quase todas conseguiram chegar na fase exponencial (Anexo 1-B). *S. aureus* com a concentração 5×10^3 e 5×10^4 UFC/mL a partir do meio líquido não teve diferenças com a hora inicial, as outras concentrações conseguiram chegar na fase exponencial de crescimento (Anexo 1-C).

L. monocytogenes só teve diferenças estatísticas no crescimento desde a hora inicial com as concentrações 5×10^6 e 5×10^7 UFC/mL nas duas metodologias e 5×10^3 UFC/mL com o meio sólido, confirmando as medições de densidade ótica que só tiveram mudanças

desde a hora de início nessas concentrações. (Anexo 1-D). No crescimento de *K.pneumonie*, com as duas metodologias, todas as concentrações cresceram e mostraram aumento da sua concentração desde a hora de início estatisticamente diferente da primeira hora de medição (Anexo 1-E). O *P. mirabilis* na concentração 5×10^4 UFC/mL com as duas metodologias e 5×10^3 com a metodologia de crescimento a partir do meio líquido não tiveram mudanças no crescimento desde a hora inicial, as outras concentrações conseguiram chegar na fase exponencial. (Anexo 1-F). *S. saprophyticus* só teve diferenças estatísticas no crescimento com as concentrações 5×10^6 e 5×10^7 UFC/mL nas duas metodologias, confirmando os valores de densidade ótica (Anexo 1-G). *E. aerogenes* só teve crescimento com diferenças estatísticas nas concentrações 5×10^6 e 5×10^7 UFC/mL, com as duas metodologias, o que demonstra que a bactéria precisa uma concentração alta para iniciar seu crescimento (Anexo 1-H). Com a *S. thiphymurium*, as concentrações 5×10^3 e 5×10^4 UFC/mL nas duas metodologias não tiveram crescimento durante o tempo de incubação, as outras concentrações conseguiram chegar na fase exponencial (Anexo 1-I). *S.flexneri* teve um padrão de crescimento parecido ao da bactéria anterior, onde as concentrações 5×10^3 e 5×10^4 UFC/mL nas duas metodologias e 5×10^5 UFC/mL a partir do meio líquido, não tiveram crescimento durante o tempo de incubação e as outras concentrações conseguiram chegar na fase exponencial (Anexo 1-J). *P. rettgeri* com a concentração 5×10^4 UFC/mL nas duas metodologias não teve diferença com a hora inicial de inoculação, as outras concentrações cresceram, mas as concentrações 5×10^6 e 5×10^7 UFC/mL foram as que conseguiram chegar na fase exponencial de crescimento (Anexo 1-K). *E. faecalis*, que foi a única bactéria que teve as mesmas horas de medição com as duas metodologias, não teve crescimento nas concentrações 5×10^3 e 5×10^4 UFC/mL, sendo 5×10^7 UFC/mL a concentração que conseguiu chegar na fase exponencial (Anexo 1-L). Na análise dos resultados, houve uma tendência das concentrações maiores (5×10^6 e 5×10^7 UFC/mL) conseguiram chegar na fase exponencial em todas as bactérias avaliadas, isso pode ser devido ao fato que o uso de nutrientes e oxigênio por uma maior quantidade de bactérias, faz com que a diminuição ou morte celular, chegue de forma mais rápida durante as cinéticas realizadas (Lambert et al, 2001).

De acordo com distintos autores como Crisler et al. (2012) e Ernebjerg et al. (2012), recomenda-se o uso de concentrações de microrganismo menores no desenvolvimento de curvas de crescimento, devido a essas permitirem um melhor crescimento exponencial das

bactérias, já que têm maior disponibilidade de nutrientes e oxigênio por indivíduo. Por essa razão foram escolhidas as concentrações menores que conseguiram uma maior ou igual densidade ótica na fase exponencial. Além disso, como fonte para o crescimento do inóculo foi selecionado o meio líquido para todas as bactérias avaliadas, já que por meio desse método os microrganismos alcançaram a fase exponencial de forma mais rápida. Por fim, também foi determinado o tempo da fase exponencial para cada bactéria (Tabela 3), resultados estes que foram utilizados como base na avaliação do efeito antimicrobiano dos extratos de própolis e do óleo essencial de *M. leucadendron*.

Tabela 3. Concentrações bacterianas iniciais a serem utilizadas nas curvas de crescimento na presença dos extratos de própolis e do óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*, e tempo da fase exponencial de cada bactéria pelas duas fontes de inóculo, meio líquido e meio sólido.

Microrganismo	Concentração UFC/mL	Fase exponencial (HI-HF)	
		M. líquido	M. Sólido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5×10^7	5-12	3-7
<i>Escherichia coli</i>	5×10^6	3-7	3-11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5×10^7	2-8	3-11
<i>Proteus mirabilis</i>	5×10^7	3-7	3-11
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5×10^6	3-7	3-8
<i>Salmonella thiphymurium</i>	5×10^7	3-6	3-8
<i>Shiguela flexnerii</i>	5×10^7	3-6	3-8
<i>Providencia rettgeri</i>	5×10^7	4-7	4-10
<i>Staphylococcus aureus</i>	5×10^6	3-7	3-10
<i>Listeria monocytogenes</i>	5×10^7	4-8	10-13
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5×10^7	3-8	11-19
<i>Enterococcus faecalis</i>	5×10^7	4-14	9-14

HI. Hora inicial. HF. Hora final. UFC. Unidade formadora de colônia.

5.2 Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos e do óleo escolhidos, durante a fase exponencial dos microrganismos

Com esse ensaio conseguiu-se identificar uma tendência em relação à atividade antimicrobiana, onde os extratos de própolis demonstram uma ação evidente contra as bactérias Gram-positivas (Tabela 4). Isso é comparável com o encontrado por Carrillo et al. (2011), onde aplicações de extratos etanólicos de própolis que foram testados contra

microrganismos como *E. coli*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. agalactiae*, tiveram mais efeito contra bactérias Gram-positivas do que contra as bactérias Gram-negativas. Também, se observou uma tendência na qual os extratos etanólicos de própolis tiveram maior atividade que os extratos hexânico e acetato etilênico, confirmado também por diferentes estudos (Sanabria et al., 2002; Orsi et al., 2005; Moura et al., 1999).

Por outro lado, a atividade do óleo essencial de *M. leucadendron* foi claramente demonstrada contra todas as bactérias avaliadas, com exceção da *Listeria monocytogenes* (Tabela 4). Existem relatos onde foram testados extratos de folhas de *M. leucadendron* (Guevara et al., 2010) contra distintas variedades de bactérias e fungos patogênicos, como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, obtendo uma CIM de 0,5 mg/mL efetiva para todas as cepas testadas, mas na literatura ainda não está relatada a atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de *M. leucadendron*. Um estudo onde avaliam óleos essenciais destilados a vapor de anis, anica, manjeriço, cardamomo, cenoura, aipo, coentro, aneto e erva-doce, com atividade antimicrobiana contra, *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917), *L. monocytogenes* (Isolado de carne), *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *S. aureus* (ATCC 13563), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 228), *Aspergillus niger* (Cepa em estoque), *Geotrichum candidum* (ATCC 34614), e *Rhodotorula sp.* (ATCC 32765), demonstrou que os óleos essenciais são potenciais antimicrobianos contra bactérias e fungos patogênicos (Elgayard et al., 2001). O óleo essencial de *M. leucadendron* foi tão efetivo que pode ser classificado como bactericida, mesmo assim sugerem estudos posteriores para confirmar esse suposto. As CIM se encontraram entre os valores de 7,8125 e 62,5 uL/mL, sendo a bactéria com a CIM mais alta para todos os antimicrobianos testados, a *E. faecalis* (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade avaliada durante a fase exponencial de crescimento dos microrganismos, testando as sete diferentes concentrações dos extratos de própolis e do óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*, e a confirmação mediante a metodologia de concentração inibitória mínima (CIM), os dados são uma média de 3 valores.

Microrganismo	Atividade durante fase exponencial				CIM (mg/mL)			
	EEP	EHP	EAP	OML	EEP	EHP	EAP	OML
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	+	-	-	-	31,25
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	-	-	-	15,625
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	+	-	-	-	62,5
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	+	-	-	-	31,25
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	+	-	-	-	15,625
<i>Salmonella thiphymurium</i>	-	-	-	+	-	-	-	7,8125
<i>Shiguelia flexnerii</i>	-	-	-	+	-	-	-	7,8125
<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	-	+	-	-	-	7,8125
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	+	+	+	1,5625	3,125	3,125	31,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	0,78125	1,5625	1,5625	31,25
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+	-	1,5625	3,125	3,125	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	3,125	6,25	6,25	62,5

EEP. Extrato etanólico de própolis, EAP. Extrato acetato etilênico de própolis, EHP. Extrato hexânico de própolis, OML. Óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*

5.3 Seleção e caracterização do produto com maior espectro de atividade

De acordo com os resultados do objetivo anterior, consegue-se identificar claramente que o composto com maior espectro de atividade antimicrobiana foi o óleo essencial de folhas de *M. leucadendron*, demonstrando uma atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Após obter a quantificação dos diferentes compostos na cromatografia gasosa, foram selecionados os quatro compostos majoritários deste óleo, a fim de determinar por meio de uma análise *in silico*, os possíveis mecanismos de ação antimicrobiana. Os resultados da CG-EM mostraram quatro compostos com as porcentagens mais altas: limoneno (32%), 1,8-cineole (17%), viridiflorol (14,89%) e α -pineno (9,06%) (Tabela 5). Esses compostos majoritários foram relatados em óleos essenciais de folhas de árvore de *Citrus medica*, *Cymbopogon citratus* e *Minthostachys mollis* todos eles com relatos anteriores de atividade antimicrobiana e antifúngica (Ordoñez et al., 2004; Cerón, 2009; Cano et al., 2008).

Tabela 5. Caracterização do óleo essencial de folhas de *Melaleuca leucadendrom*

Pico	TR (min)	IK calculado	IK real	Composto	Porcentagem (%)
1	5,322	925,31	930	α -thujeno	0,17
2	5,558	934,00	939	α -pineno	9,06
3	5,916	947,19	952	α -fencheno	0,06
4	5,968	949,11	954	Camfeno	0,44
5	6,285	960,79	960	Benzaldeído	0,30
6	6,782	979,10	979	β -pineno	7,74
7	6,884	982,86	985	6-metil-5-hepten-2-ona	0,07
8	7,027	988,13	990	Mirceno	0,15
9	7,957	1016,60	1017	α -terpineno	0,10
10	8,285	1025,56	1024	ρ -cimeno	1,08
11	8,565	1033,21	1029	Limoneno	32,00
12	8,643	1035,34	1031	1,8-cineole	17,32
13	8,959	1043,97	1037	(Z)- β -ocimeno	0,21
14	9,402	1056,07	1059	γ -terpineno	1,24
15	10,405	1083,47	1088	Terpinoleno	0,26
16	10,769	1093,41	1090	Metilbenzoato	0,10
17	10,966	1098,79	1096	Linalol	0,67
18	11,728	1117,33	1116	Fenchol	0,16
19	11,847	1120,20	1122	<i>trans</i> - ρ -menta-2,8-dien-1-ol	0,06
20	12,437	1134,45	1137	<i>cis</i> - ρ -menta-2,8-dien-1-ol	0,06
21	12,605	1138,50	1139	<i>trans</i> -pinocarveol	0,12
22	12,931	1146,37	1148	<i>neo</i> -isopulegol	0,34
23	13,175	1152,26	1149	Hidrato de camfeno	0,03
24	13,343	1156,32	1149	Isopulegol	0,09
25	13,843	1168,39	1166	δ -terpineol	0,15
26	13,905	1169,89	1169	Borneol	0,12
27**	14,200	1177,01	-	-	0,15
28	14,287	1179,11	1177	Terpinen-4-ol	1,05
29	14,596	1186,57	1189	<i>trans</i> - ρ -menta-1(7),8-dien-2-ol	0,34
30	14,973	1195,67	1188	α -terpineol	3,68
31**	15,132	1199,51	-	-	0,09
32**	16,205	1224,22	-	-	0,04
33	16,285	1226,06	1125	Citronelol	0,08
34	16,369	1228,00	1230	<i>cis</i> - ρ -menta-1(7),8-dien-2-ol	0,18
35	24,420	1415,13	1419	E-cariofileno	1,14
36	25,880	1450,53	1454	α -humuleno	0,19
37	26,067	1455,06	1460	allo-aromadendreno	0,41
38	27,259	1483,97	1490	β -selineno	0,33
39	27,368	1486,61	1496	Viridifloreno	0,48
40	27,560	1491,27	1498	α -selineno	0,22

41	28,259	1508,55	1513	γ -cadineno	0,14
42	28,488	1514,33	1523	δ -cadineno	0,07
43	30,491	1564,90	1568	Palustrol	0,37
44	30,951	1576,52	1583	Óxido cariofileno	1,36
45	31,619	1593,38	1592	Viridiflorol	14,89
46	31,903	1600,58	1602	Ledol	2,48
47	32,046	1604,38	1608	Epóxido humuleno II	0,14
48	33,286	1637,30	1640	epi- α -cadinol	0,08
Monoterpeno hidrocarbônico					52,51
Monoterpeno oxigenado					24,92
Sesquiterpeno hidrocarbônico					2,98
Sesquiterpeno oxigenado					19,32
Total					99,73

TR = Tempo de retenção; IK = Índice de Kovats; ** Não foi possível a identificação do composto.

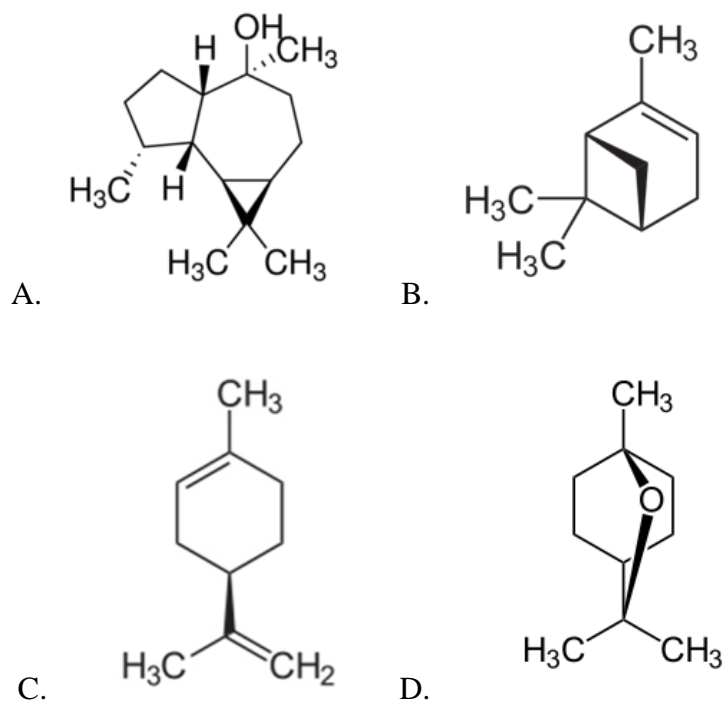


Figura 17. Compostos majoritários do óleo essencial de folhas de *Melaleuca leucadendron*
 A. Viridiflorol. B. Alfa pineno. C. Limoneno. D. 1-8 Cineole.

5.4 Análise *in silico* da atividade antimicrobiana

De acordo com as análises *in silico* foi encontrado que o óleo essencial de *M. leucadendron* tem uma alta probabilidade de ter um mecanismo de ação relacionado com a potencialização da permeabilidade da membrana bacteriana, para dois dos quatro compostos majoritários (0,5-0,63), limoneno e 1,8-cineol, respectivamente, e uma atividade moderada nessa mesma categoria para os outros dois (0,43-0,37), α -pineno e viridiflorol, respectivamente. Também se obtiveram resultados importantes na categoria de inibição da síntese de peptidoglicano glicosiltransferase, composto essencial na síntese da parede celular das bactérias, com valores de 0,59 e 0,53 na diferença de Pa-Pi para 1,8-cineole e viridiflorol, respectivamente, e uma probabilidade de atividade moderada nos outros dois compostos (0,49 e 0,42) (Tabela 6). Estes resultados indicam que o mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *M.leucadendron* pode estar relacionado com a inibição de sínteses de parede celular. Os produtos com atividade antimicrobiana que atuam inibindo a síntese da parede celular, geralmente, estão relacionados com a inibição da síntese de peptidoglicano em algum dos seus níveis, esta é a capa essencial para a sobrevivência das bactérias. Assim o dano produzido pela perda de rigidez na célula, pode gerar apoptose ou morte celular, pelo que são classificados como bactericidas (Molina et al., 2011). Estudos de óleos essenciais com compostos similares aos relatados neste estudo são classificados como bactericidas, já que conseguem gerar morte celular com um tempo de dois a três horas de exposição ao produto, sendo mais efetivos contra bactérias Gram-positivas (Guerra et al., 2004).

Tabela 6. Previsões *in silico* dos mecanismos de ação antimicrobiana dos compostos majoritários do óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*, utilizando a ferramenta PASS online.

Mecanismo de ação	Composto*			
	α -pineno	Limoneno	1,8- cineole	Viridiflorol
Antibacteriano	0,27	0,375	0,201	0,385
Anti-infeccioso	0,2	-	0,453	0,089
Antimicobacteriano	-	0,601	0,006	-
Inibição da biossíntese da parede bacteriana	0,27	0,024	0,152	0,236
Inibição da síntese de DNA	0,07	0,284	0,03	0,287
Inibição da síntese proteica	0,06	0,274	0,175	0,325
Potencializador da permeabilidade da membrana	0,43	0,517	0,634	0,379
Inibição da DNA girase	-	-	-	-
Inibição da DNA topoisomerase IV	0,07	0,03	0,03	-
Inibição da subunidade ribossomal 30S	-	-	-	0,049
Inibição da subunidade ribossomal 50S	-	0,055	0,06	0,079
Inibição de RNA polimerase dependente de DNA	0,24	0,166	0,247	0,086
Inibição de NAD+-arginina ADP-ribosiltransferase	0,03	0,14	0,24	0,072
Inibição de piruvato cinase	0,24	0,032	0,102	0,016
Inibição de peptidoglicano glicosiltransferase	0,49	0,428	0,596	0,533
Inibição da 2-Deidropantoato 2-redutase	0,33	0,159	0,323	0,075
Inibição de CDP-glicerol glicerofosfotransferase	0,02	-	0,072	0,174
Inibição de micotiol-S-conjugado amidase	0,26	0,193	0,149	0,083

*Valores da diferença Pa-Pi (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline>), - Não indicado ou insatisfatório ($Pa \leq Pi$)

5.5 Teste de permeabilidade de membrana

De acordo com os resultados da predição *in silico* dos compostos majoritários do óleo essencial de *M. leucadendron*, procedeu-se a realização do teste de comprovação da permeabilidade de membrana mediante a marcação das células bacterianas com iodeto de propídio, molécula que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja

permeável. Tal propriedade deve-se ao fato de que marcadores de DNA de elevado peso molecular não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu tamanho, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais da apoptose. Desse modo, permite a discriminação de células intactas com as que apresentam permeabilidade na membrana (Trombetta et al., 2005). Nas análises dos resultados foi selecionada a população bacteriana total para cada espécie, em seguida, foi calculada a porcentagem de IP positivo das amostras expostas ao óleo essencial comparadas com o controle negativo (Figura 18). Desta forma, foi possível verificar se o marcador consegue se incorporar dentro da célula quando as células possuem maior permeabilidade na membrana.

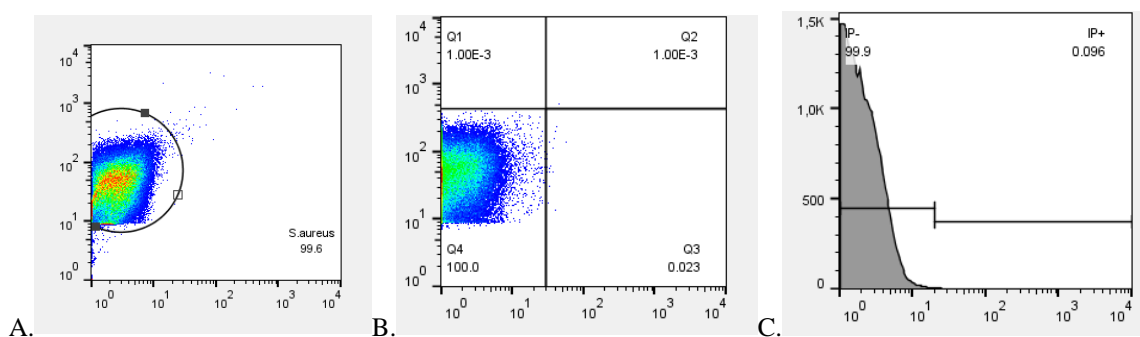


Figura 18. Avaliação de permeabilidade de membrana celular a partir da citometria de fluxo. A. Seleção da população bacteriana. B. Seleção da população marcada com Iodeto de propídio. C. Histograma do IP positivo e IP negativo.

Nos resultados do experimento consegue-se observar que em oito das onze bactérias avaliadas a permeabilidade das células bacterianas expostas ao óleo foi maior do que as não expostas. No entanto, só três das bactérias avaliadas mostraram diferença significativa em comparação ao controle, sendo duas bactérias Gram-positivas (*S. saprophyticus* e *S. aureus*) e uma Gram-negativa (*E. aerogenes*). Além disso, houve três espécies de bactérias que obtiveram resultados desfavoráveis na presença do óleo essencial, todas elas Gram-negativas (*S. thiphymurium*, *P. rettgeri* e *S. flexnerii*) (Figura 19). A partir desses resultados, pode-se afirmar que o óleo foi mais efetivo contra bactérias Gram-positivas onde a parede celular tem uma única membrana (peptidoglicano), pela qual é mais fácil o transporte de substâncias, incluindo substâncias antibióticas. Porém, as bactérias Gram-negativas possuem uma

membrana externa, outra interna e uma capa intermediária de peptidoglicano sendo mais difícil de penetrar e poderia dificultar o efeito de permeabilidade na membrana. Sendo assim, a substância antibiótica funcionaria debilitando a parede bacteriana e favorecendo a lise osmótica da bactéria durante o processo de multiplicação (McOster et al., 2014).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais inclui a degradação da parede celular, dano à membrana citoplasmática, coagulação no citoplasma, alteração das proteínas da membrana, aumentando assim a permeabilidade e levando ao vazamento dos conteúdos celulares e reduzindo o potencial da membrana (Tiwari et al., 2009). A hidrofobicidade que é típica dos óleos essenciais seria responsável pela ruptura das estruturas da parede bacteriana, isso leva ao aumento da permeabilidade devido à incapacidade de separar óleos essenciais da membrana celular bacteriana (Bagamboula et al., 2004).

Isto poderia explicar porque os óleos essenciais, geralmente são mais eficazes contra microorganismos Gram-positivos, confirmando os resultados obtidos neste estudo, já que a membrana externa de algumas bactérias Gram-negativas limita ou impede a penetração dos óleos essenciais na célula bacteriana. Os compostos presentes nos óleos essenciais também são capazes de interferir com proteínas na parede que são muitas vezes envolvidas no transporte de moléculas essenciais para a célula (Ultee et al., 2002).

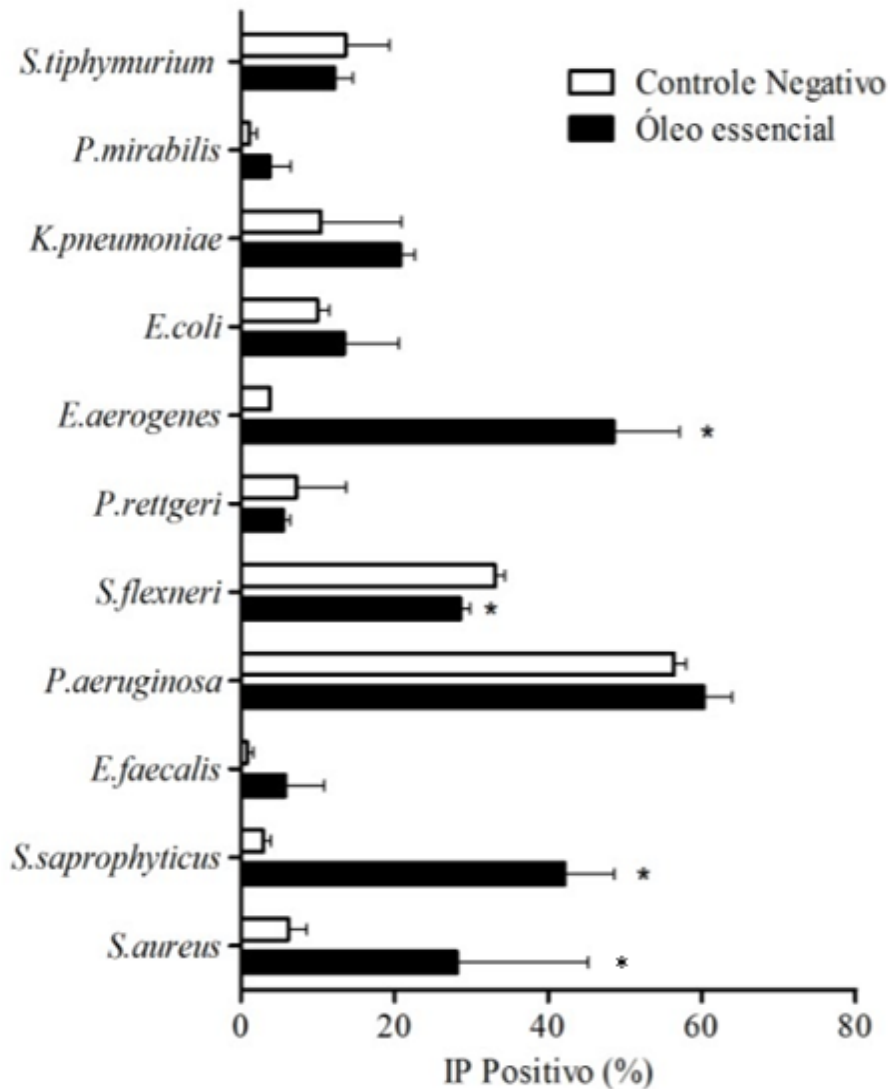


Figura 19. Teste de permeabilidade de membrana celular com bactérias selecionadas sobre ação do óleo essencial de *Melaleuca leucadendron*.

5.6 Análise em microscopia eletrônica de transmissão

Para essa análise foi selecionada uma bactéria que demonstrou resultados favoráveis e com diferença estatística no teste de permeabilidade de membrana. Nesse caso foi selecionado o *S. aureus* a fim de visualizar o efeito na membrana celular quando as células são expostas ao óleo essencial. De acordo com a Figura 20 consegue-se observar claramente o efeito do óleo na membrana das células de *S. aureus*, onde se ressalta que o óleo consegue danificar a grossa capa de peptidoglicano característico das bactérias Gram-positivas. Geralmente as substâncias antimicrobianas que possuem essa capacidade utilizam proteínas

que atuam como canais na membrana da bactéria e quando, conseguem entrar na célula, inibem a formação de ligações cruzadas, afetando, dessa forma, a síntese da parede bacteriana e gerando porosidade, o que abre a comunicação com o meio externo levando a bactéria a lise ou morte celular (McOster et al., 2014). A barreira de permeabilidade proporcionada pelas membranas celulares é indispensável para muitas funções celulares, incluindo a manutenção do estado energético da célula, processos de transdução de energia acoplados à membrana, transporte de soluto e regulação metabólica. A membrana celular também representa uma barreira efetiva entre o citoplasma e o ambiente externo. A importação e exportação de metabólitos e íons essenciais para todas as atividades que ocorrem na célula microbiana ocorrem através da membrana celular, o que confirma que óleos essenciais que posuam a capacidade de danificar a membrana são os antimicrobianos mais efetivos (Ben et al., 2006).

Alguns óleos essenciais, particularmente os óleos que são ricos em compostos fenólicos, são capazes de se inserir na bicamada de fosfolípidos de paredes celulares bacterianas, onde se ligam a proteínas e impedem que elas desempenhem suas funções normais. Esse fenômeno indica que a membrana é o primeiro alvo de óleos essenciais com potencial antimicrobiano (Lambert et al., 2001).

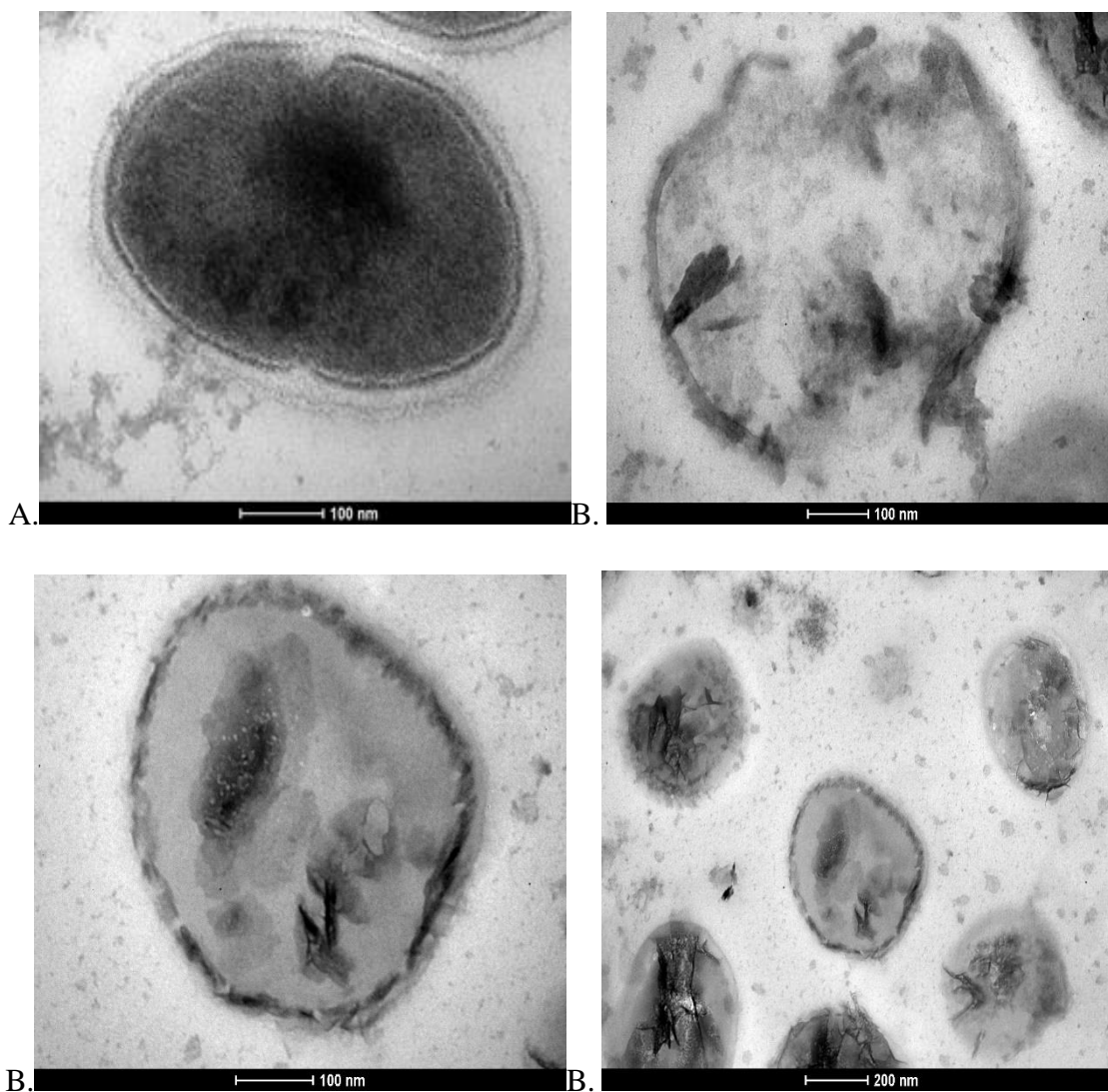


Figura 20. Análise de microscopia eletrônica de transmissão. A. Controle negativo, célula de *S.aureus* não exposta ao óleo essencial B. Células de *S.aureus* expostas ao óleo essencial de folhas de *Melaleuca leucadendron*.

A importância de estudar os óleos essenciais como potenciais antimicrobianos em resposta à crescente resistência de microorganismos a produtos químicos e medicamentos convencionais é cada vez maior e apresenta um desafio para as indústrias farmacêuticas. Os óleos essenciais provenientes de fontes naturais que possuem atividade antimicrobiana precisam ser estudados e caracterizados para assim determinar o seu mecanismo de ação, conhecendo que a atividade antimicrobiana não pode ser atribuída a um único mecanismo. Em vez disso, diferentes mecanismos bioquímicos e estruturais estão envolvidos em

múltiplos locais dentro da célula e na superfície celular. Esses mecanismos incluem modificações químicas da membrana celular, citoplasma, enzimas e proteínas, e podem mudar completamente a conformação da célula microbiana. Além disso, a perda sustentada de íons ou metabólitos, devido à exposição a um óleo essencial, pode comprometer o metabolismo microbiano e levar à morte celular (Burt et al.,2007). Neste trabalho se fez uma aproximação importante na pesquisa do mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *M. leucadendron*, entendendo e propondo esse óleo como um aporte na solução da problemática das resistências aos antibióticos.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Em conclusão, pode se afirmar que na padronização das curvas de crescimento a partir do meio sólido foi obtida uma maior concentração de células viáveis, mas que com o crescimento a partir do meio líquido foi possível alcançar a fase exponencial de forma mais rápida com todas as bactérias avaliadas com exceção da *Enterococcus faecalis*.

Os ajustes e as curvas de crescimento das bactérias foram feitos de maneira reproduzível, em cinco diferentes concentrações e foi possível a determinação da fase exponencial para cada uma das doze bactérias avaliadas, proporcionando o uso desses resultados como referência em experimentos posteriores.

Os extratos de própolis são potenciais antimicrobianos contra bactérias Gram-positivas, sendo o extrato etanólico o mais efetivo.

O óleo essencial das folhas de *M.leucadendron* é um antimicrobiano efetivo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e é um composto promissor no desenvolvimento de novos antibióticos.

O mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *M. leucadendron* está relacionado com a potencialização da permeabilidade da membrana celular e provavelmente também com a inibição de sínteses de peptidoglicano, composto essencial na parede celular das bactérias.

A principal perspectiva do estudo é continuar com ensaios de citotoxicidade, para determinar que o óleo essencial de *M. leucadendron* não afete as células humanas, quando for utilizado como antibiótico.

7. REFERÊNCIAS

- Bagamboula C, Uyttendaele M, Devereux J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool, towards *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. Food microbiol. V.21 P.32-42.
- Bankova V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. Alternat Med. V.2 P.29-32.
- Bankova V. (1995). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J Ethnopharmacol. V.100 P.114-117.
- Bankova V, Castro S, Marccuci M. (2000). Review of Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. V.31. P.3-15.
- Ben A, Combes S, Preziosi B, Gontard N, Chalier P. (2006). Antimicrobial activity of Carvacrol related to its chemical structure. J. Applied Microbiology. V.43 P.149-154.
- Burt S, Van der Z, Koets A, Graf A, Van F, Gastra W. (2007). Carvacrol induces heat shock protein and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157. Appl. Environment microbiology. V.73 P.4484-4490.
- Carrillo J, Cortes L, Sabillon L, Montalvo J, Canizo J, Moreno M, Serna S. (2011). Detrimental effects of increasing concentrations of fermented bacteria. J. Biotechnology. V.33 P.301-307.
- Cano M, Ferreira M, Souza J, Feitosa A, Moreau N. (2008). Antibacterial activity of some Brazilian medicinal plants. J. of ethnopharmacology. V.105 P.137-147.
- Calderwood S, Moellering D. (2006). Principio del tratamiento infeccioso, Stain LH, Medicina interna.V.2 P.1469-86.
- Cerón I. (2009). Separación de metabolitos de los aceites esenciales de Eucalipto y Cidrón por destilación molecular. Universidad Nacional de Colombia. P.56-67.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. V.7 P.207-208.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania, USA. V19 P.23-29.

Conner D, Kotrola S. (1995). Growth and survival of *Escherichia coli* O157 under acidic conditions. Applied and Environmental Microbiology. V.8 P.17-22.

Crisler M, Newville T, Chen F, Clark B, Schneegurt M. (2012). Bacterial Growth at the High Concentrations of Magnesium Sulfate Found in Martian Soils. Astrobiology. V12 P.302-308.

Elgayyard J, Aligianis N, Kalputsakis E, Mitaku S, Chinou I. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J. Agricultural and food chemistry. V.49 P.4168-4170.

Ernebjerg M, Kishony R. (2012). Distinct growth of soil bacteria as revealed by larger escale colony tracking. Applied and environmental microbiology, V78 P.20-25.

Fernandes J, Balestrin A, Betoni E, Orsi E, Cunha R, Montelli L. (2005). Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. Mem Inst Oswaldo Cruz. V.100 P.563-566.

Fernandes A, Sugizaki F, Fogo L, Funari C; Lopes M. (1995). In vitro activity bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. J. Venom. Anim. Toxins. V23 P.27-32. [consultado 8 Janeiro 2017] Disponivel em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79301995000200003. V12:34-37.

Fernández A, Mendiola J, Scull R, Vermeersch M, Cos P, Maes L. (2008). In vitro antimicrobial activity of the Cuban medicinal plants *Simarouba glauca* DC, *Melaleuca leucadendron* L and *Artemisia absinthium* L. Mem Inst Oswaldo Cruz. V.103 P.615-618.

Fux C, Costerton J, Stewart P, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. (2005). Trends in microbiology. V.13 P 34-40.

Guerra M, Rodriguez M, Garcia G. (2004). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (DC). Rev cubana Plant Med. V.9 P.128-130.

- Guevara E, Cabrera T, Peña T, Fernández J, Quintana I, Fernández E. (2010). Efecto antimicrobiano de hojas de *Melaleuca leucadendron*, que crece en la Ciénaga de Zapata. Rev Méd Electrón. V.19 P.25-32. [Seriada en línea] 2010;32(4). URL:<http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202010/vol14%202010/tema04.htm>. [consulta: 25 fevereiro, 2017]
- Holmberg S, Solomon S, Blake P. (1987). Health and economic impacts of antimicrobial resistance. Rev Infect Dis. V.9 P.1065-1.
- Kim H, Lee H, Ryu D, Choi S, Lee D. (2011). Antibacterial activity of silver nanoparticles against *Staphylococcus auerus* and *Escherichia coli*. J of Biothecnology.V.39 P.79-85.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. (2000). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin, J. Ethnopharm. V.64 P.235-240.
- Lambert R, Skandamis P, Coote P, Nychas G. (2001). Study of minimal inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil. J. Applied microbiology. V.91 P.453-462.
- Lu W, Zhang T, Zhang D, Li C, Wen J, Du L. (2005). A novel bioflocculant produced by *Enterobacter aerogenes* and its use in defecating the throna suspension. Biochemical engineering journal. V.27 P.1-7.
- Maia J, Bandoni L, Czepak M. (2008). Plantas aromáticas da região da Amazônia, os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Edufes, Vitoria, V.5 P. 562-580.
- Marcucci, M. (2008). Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. Rev fitos. V.1 P.36-45.
- Merck K. (2000). Microbiology Manual. Ed. Deutscher Akkreditierungs Rat. Berlin, Alemania. V.1 P.3456-3460.
- Miorin, P, Levy J, Custodio A, Bretz, W, Marcucci C. (2003). Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol. V.95 P.913-920.

Miorin L, Levy Junior N, Custodio A, Bretz, W, Marcucci, C. (2003). Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol*. V.94 P.234-247.

Molina J. (2011). Drogas antibacterianas. Departamento de microbiologia y parasitologia. UNAM. P.234-340.

Moreno H, Martínez P, Figueroa J. (2007). Efecto antimicrobiano in vitro de propóleos argentinos, colombianos y cubanos sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Univ. Nacional de Colombia, sede Bogotá.V.3 P.73-78. http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA7_70_75.PDF. (Consultado em fevereiro de 2017).

Moura F, Ikegaki M, Alencar S, Sato H, Park Y. (1999). Abelhas européias vs. abelhas africanizadas: Estudo comparativo de sua própolis. *Revista da Universidade de Franca (Edição Especial) I Simpósio Brasileiro sobre própolis e Apiterápicos*, V.7 P.233-240.

Neu H. (2007). Conceptos generales sobre quimioterapia de enfermedades infecciosas, *Clin Med North Am* V.34 P.71-115.

OMS, informe de resistências a antimicrobianos (2017), <http://www.who.int/gho/es/n> (Consultado 23, noviembre, 2017).

Ordoñez J, Romero A. (2004). Aceites esenciales com potencial antimicrobiano. *Rev acta biológica*. V.7 P.345-350.

Orsi, R, Sforcin J, Rall V, Funari S, Barbosa L, Fernández J. (2005). Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil, *J. Venomous Animals Toxins including Trop. Dis*. V.11 P.109-116.

Petersdor RG, *Infectious disease*. (1997). V.59 P.3-16.

Pienaar D, Young T, Holmes H. (2008). Intervenciones para la prevención y el tratamiento de la candidiasis orofaríngea asociada con la infección por VIH en adultos y niños. *La Biblioteca Cochrane Plus*. V.3 P.123-134.

Qin S, Li J, Chen H, Zhen G, Zhu W, Lin C, Xu L. (2017). Isolation, diversity and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forest in China. *Applied environmental microbiology*. V.75 P. 6176-6186.

Quiang L, Liu H, Sheng Q, Wang F, Zhang Y. (2010). Isolation and characterization of temperature and stable bioflocculant from M-503. *J. New Biotechnology*. V.27 P. 789-794.

Rodríguez L. (1997). Posibilidades del empleo en formas farmacéuticas del extracto fluido y el aceite esencial de *Melaleuca leucadendron* L. [Tese de Mestrado]. Habana: Universidad de la Habana.

Rodríguez M, Martínez M, Rivero R, Álvarez H, Valdez C, Rodríguez A. (2006). Evaluación de la actividad antimalárica de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional cubana. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. V. 27 P.197-205. [consulta 10 Feb 2017]. Disponible en <http://www.win2pdf.com/>

Salamanca G. (2005). Propiedades nutricionales y apiterapéuticas de los productos de la colmena, Memorias I Congreso Internacional de Apicultores de los Andes y III Convención de Apicultores, San Cristóbal, Táchira, Venezuela.V.5 P.234-302.

Salatino A, Teixeira W, Negri G, Message D. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. V.2 P.33-38.

Sanabria- Galindo A, Cárdenas L, Parroquiano M. (2002). Actividad antimicrobiana y examen fotoquímico preliminar de siete angiospermas y una muestra de propóleo, *Rev. Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, V.31 P.36-42.

Scheller S, Wilczok T, Imielski S, Krol W, Gabrys J, Shani J. (1990). Free radical scavenging by ethanol extract of propolis, *Int. Radiat. Biol*. V.57 P.1-5.

Sforcin M, Fernández A, Lopes M, Bankova V, Funari M. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity, *J. Ethnopharmacol*. V.73 P.243-249.

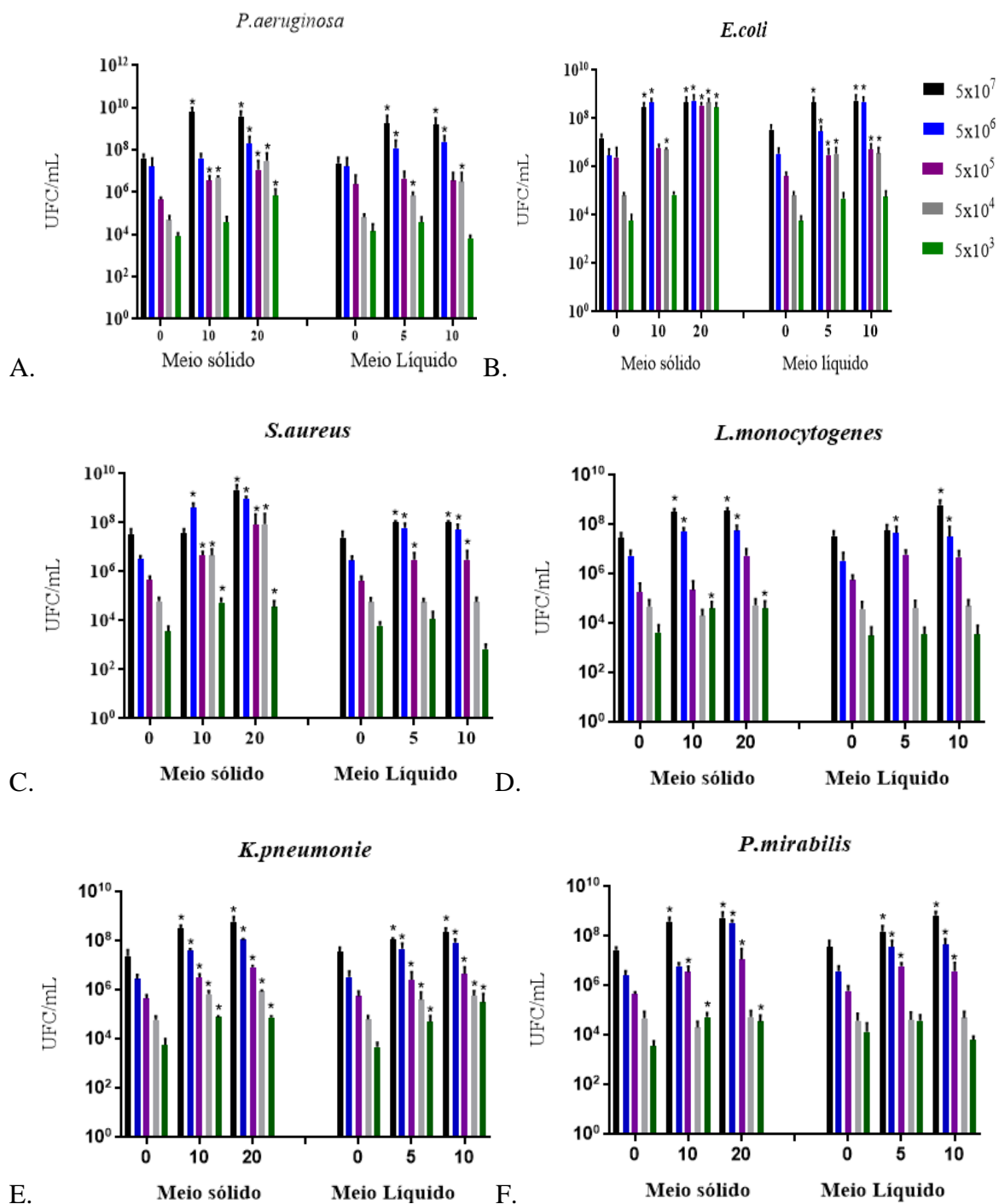
Siqing X, Zhang Z, Wang X, Yang A, Chen L, Zhao J, Leonard D. (2008). Production and characterization of a bioflocculant by *Proteus mirabilis* TJ-1. *J. Bioresource technology*. V.99 P.6520-6527.

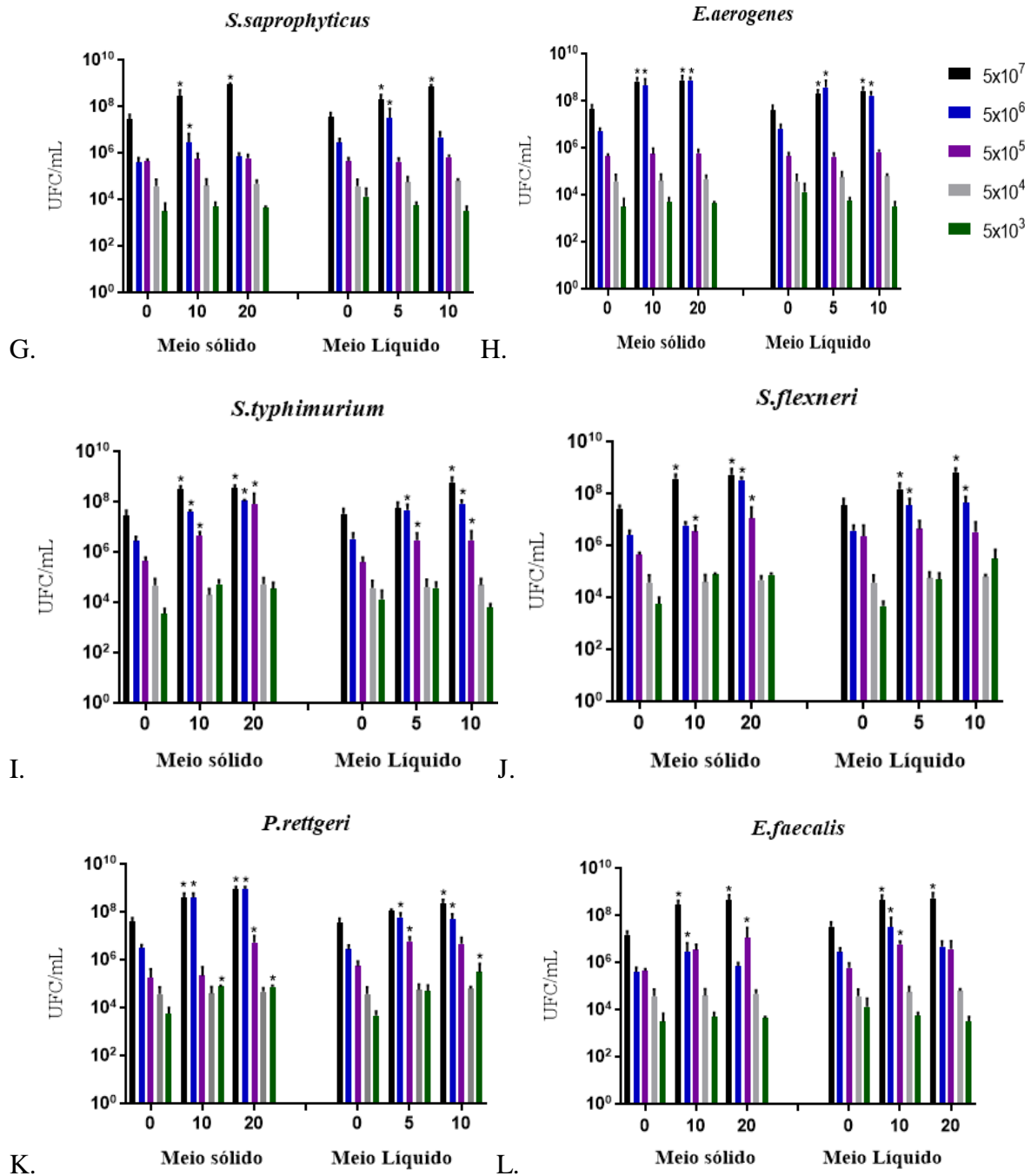
- Solopova A, Gestel J, Weising F, Bachmann H, Teusink B, Kok J, Kuipers O. (2014). Bet-Hedging during bacterial diauxic shift. *J. microbiology*. V. 200 P.427-432.
- Standford A, Nigutova K, Morovsky M, Pristas P. (1997). Production of enterolysin A by *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of homologues among Gram positives. *J. applied microbiology*. V.106 P.563-569.
- Thompson B. (1997). Cephalosporin, Carbapenem and Monobactam antibiotics, *Mayo Clin proc*. V.62 P.821-32.
- Tiwari B, Baldramidis V, Donnel C, Bourke P, Cullen P. (2009). Application of natural antimicrobial for food preservation. *J. agricultural food chemistry*. V.57 P.5987-6000.
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro M, Venuti V, Cristiani M, Daniele C, Saija A. (2005). Mechanism of antibacterial actions of monoterpenes. *Antimicrobial Agents Chemoter*. V.489 P.2478-2480.
- Tsai Y, Fung C, Lin J, Chen J, Chang F, Chen T, Siu K. (2011). *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins Ompk-35 and Ompk-36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *J. Antimicrobial agents and chemotherapy*. V.55 P.1485-1493.
- Ultee A, Bennik M, Moezelard R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacol is essential for action against food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied environmental microbiology*. V.68 P.1561-1568.
- Von C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med*. V.344 P.11-16.
- Wagner V, Bushnell D, Passador L, Brooks A, Iglewski B. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum sensing regulations: effects of growth phase and environment. *J of microbiology*.V.185 P.2080-2095.
- Wang Q, Frye J, Mcclelland M, Harshey R. (2004). Gene expression patterns during swarming in *Salmonella thiphymurium*: genes specific to durface growth and putative new motility and pathogenic genes. *J. Molecular biology*. V.52 P.169-187.

Yates E, Bodo P, Buckley C, Atkinson S, Ram S, Sockett E, Goldner M, Dessaux Y, Camara M, Smith H, Williams P. (2002). N-acyl homocerinlactones undergo lactonosis under growth of *Yersinia* sp. And *Pseudomonas aeruginosa*. J of microbiology.V.70 P.5636-5643.

Young L. (1999). Tratamiento antimicrobiano, tratado de medicina interna. V.19 P.234-450.

8. ANEXOS





Anexo 1. Contagens em UFC/mL das bactérias avaliadas, nos 3 tempos seleccionados, para as curvas em meio líquido e em meio sólido, os resultados são produto da média de 3 dados.

* Diferença estatística ($P < 0.05$) em relação ao tempo zero de incubação