

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP  
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

ANA PAULA MERINO CRUZ

**ELABORAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO ANTIMICROBIANA DE  
AMPLO ESPECTRO CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS PARA  
HIGIENIZAÇÃO DE MÃOS**

RIBEIRÃO PRETO

2023

ANA PAULA MERINO CRUZ

**ELABORAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO ANTIMICROBIANA DE  
AMPLO ESPECTRO CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS PARA  
HIGIENIZAÇÃO DE MÃOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Universidade de Ribeirão Preto UNAERP,  
como requisito para a obtenção do título de  
Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Fachin Saltoratto

RIBEIRÃO PRETO  
2023

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento  
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto –

CRUZ, Ana Paula Merino, 1969-  
C957e      Elaboração de uma formulação antimicrobiana de amplo  
espectro contendo óleos essenciais para higienização das mãos / Ana  
Paula Merino Cruz. – Ribeirão Preto, 2023.  
71 f. : il. color.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Lúcia Fachin Saltoratto.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,  
Mestrado em Biotecnologia, 2023.

1. Óleos voláteis. 2. Desinfecção das mãos. 3. Atividade  
antimicrobiana. II. Título.

CDD 660

**ANA PAULA MERINO CRUZ**

**ELABORAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO ANTIMICROBIANA DE AMPLO  
ESPECTRO CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS PARA HIGIENIZAÇÃO DE MÃOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 28 de junho de 2023

Resultado: Aprovada

**BANCA EXAMINADORA**



Profa. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto  
Presidente/UNAERP



Prof. Dr. João Pedro Rueda Furlan  
USP



Prof. Dr. André Pitondo da Silva  
UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO  
2023**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em especial a minha orientadora, Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto, pelo acolhimento e pelos ensinamentos.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Prof. Dr. Mozart Marins, pela oportunidade.

Aos professores da Biotecnologia e aos meus queridos companheiros e amigos de laboratório: Felipe, Flávia, Gabriela, Laura, Mariana, Rafael e Alessandra.

À colaboração oferecida pelo doutorando Vinícius no desenvolvimento final do trabalho e a Profa. Dra. Bruna Altoe Adorno pelo fornecimento de produtos farmacêuticos.

A todos vocês muito obrigada pelos ensinamentos, paciência e compreensão. Um sentimento de gratidão ficará registrado para sempre.

A todos outros, que não foram citados, mas conheci e convivi nesses anos de mestrado e que de alguma maneira me ajudaram, seja com palavras de incentivo, como voluntários para os experimentos ou com algum outro tipo de colaboração.

Às amigas de uma vida, que mesmo à distância, torcem por mim: Alessandra, Paula Rosana, Cláudia e Adriana.

A minhas queridas: Vera, minha mãe, e Mércia, minha tia, que nunca deixaram de acreditar em mim, sem vocês isso não seria possível. Amo vocês.

Finalmente ao meu amado pai, Irineu, que está em outra dimensão bem próximo ao nosso maior mestre, Jesus.

**Dedico esse trabalho aos meus pais, ao meu marido, ao meu irmão e aos meus filhos. Matheus e Luisa, o conhecimento nos abre portas e quando adquirido nunca o perderão.**

## RESUMO

As mãos são os principais vetores de transmissão de micro-organismos, portanto a higienização das mãos é a medida mais simples e menos dispendiosa para prevenir a propagação de doenças infecciosas. Os óleos essenciais apresentam comprovada ação antimicrobiana e são efetivos contra linhagens resistentes a agentes inibidores atuais por apresentarem diferentes classes de compostos ativos. O objetivo desse trabalho foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* de óleos essenciais de melaleuca, cravo, orégano, tomilho, alecrim, menta e eucalipto contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduriformes e a seguir desenvolver uma formulação para higienização das mãos utilizando os óleos mais ativos. Foram realizados testes de microdiluição e os resultados mostraram que os óleos essenciais de cravo, orégano e tomilho inibiram todas as bactérias ATCCs testadas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis e *Proteus vulgaris*. Além disso, esses óleos apresentaram atividade antibacteriana frente às linhagens de *E. coli* EW222 e *E. coli* EW 239 (linhagens multirresistentes e potencialmente patogênicas) e *Pseudomonas aeruginosa* S15 (isolada do solo), com o valor da CIM variando de 3,125 a 50 µL/mL. Os óleos de cravo, orégano e tomilho apresentaram atividade antifúngica contra *Aspergillus fumigatus* (ATCC e isolada de paciente), *Trichophyton rubrum*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e *Candida auris* com variação da CIM de 0,003 a 12,5 µL/mL. Foi realizado a avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo* com a formulação do sabonete contendo os óleos essenciais de cravo e orégano, que foi comparado com a base (sabonete sem os óleos), com Protex<sup>®</sup> DUOPROTECT e Digluconato de Clorexidina 2% (Riohex<sup>®</sup> - Rioquímica). Foi observado diferença estatisticamente significativa do sabonete com os óleos essenciais frente a base ( $p < 0,0003$ ) e ao Protex<sup>®</sup> DUOPROTECT ( $p < 0.0049$ ). Quando comparamos o sabonete com óleos essenciais com o Riohex<sup>®</sup>2% não observamos diferença estatística. Portanto, conclui-se que os óleos de cravo, orégano e tomilho apresentaram melhores resultados antibacterianos e antifúngicos. A melhor ação sinérgica foi para a combinação do óleo de cravo com orégano e a avaliação antimicrobiana *in vivo* mostrou uma melhor ação antibacteriana para a formulação do sabonete com os óleos essenciais frente à base e ao sabonete antimicrobiano comercial Protex<sup>®</sup> DUOPROTECT.

Palavras-chave: Óleos Essenciais. Atividade Antimicrobiana. Higienização das Mãos.

## ABSTRACT

Hands are the main vectors of transmission of microorganisms, therefore hand hygiene is the simplest and least expensive measure to prevent the manifestation of infectious diseases. Essential oils have proven antimicrobial action and are effective against strains resistant to current inhibitors because they have different classes of active compounds. The objective of this work was to determine the *in vitro* minimal inhibitory concentration (MIC) of essential oils of tea tree, clove, oregano, thyme, rosemary, mint and eucalyptus against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous and yeast fungi and then to develop a formulation to wash your hands using the most active oils. Microdilution tests were carried out and the results appreciated that the essential oils of clove, oregano and thyme inhibited all bacteria ATCCs examined: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis and *Proteus vulgaris*. In addition, these oils presented antibacterial activity against *E. coli* EW222 and *E. coli* EW239 (multidrug-resistant strains and potentially pathogenic) e *Pseudomonas aeruginosa* S15 (isolated from the ground), with MIC ranging from 3.125 to 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Clove, oregano, and thyme oils presented antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* (ATCC and isolated from patient), *Trichophyton rubrum*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and *Candida auris* with MIC ranging from 0.003 to 12.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . The evaluation of the *in vivo* antimicrobial activity was carried out with the soap formulation containing the essential oils of clove and oregano, which was compared with the base (soap without the oils), with Protex® DUOPROTECT and 2% Chlorhexidine Digluconate (Riohex® - Rioquímica). A statistically significant difference was observed between the soap and the essential oils compared to the base ( $p < 0.0003$ ) and the Protex® DUOPROTECT ( $p < 0.0049$ ). When comparing the soap with essential oils with Riohex®2%, we did not observe any statistical difference. Therefore, it is concluded that clove, oregano, and thyme oils showed better antibacterial and antifungal results. The best synergistic combination was for the combination of clove oil and oregano and the *in vivo* antimicrobial evaluation showed a better antibacterial action for the soap formulation with essential oils compared to the base and to the commercial antimicrobial soap Protex® DUOPROTECT.

Keywords: Essential Oils. Antimicrobial activity. Sanitization of hands.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Microbiota da pele.....	9
<b>Figura 2.</b> Semmelweis e a queda na mortalidade materna após a lavagem das mãos. ..	10
<b>Figura 3.</b> Mecanismo antimicrobiano dos óleos essenciais. ....	17
<b>Figura 4.</b> Ensaio de microdiluição para a avaliação da CIM da <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 frente ao óleo de cravo.....	21
<b>Figura 5.</b> <i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880.....	29
<b>Figura 6.</b> Contaminação dos dedos. ....	30
<b>Figura 7.</b> Esfregando as pontas dos dedos contaminados no meio TSB.....	30
<b>Figura 8.</b> Resultado da CIM do antibiótico gentamicina, mostrando o crescimento do isolado ambiental <i>E. coli</i> EW239. ....	37
<b>Figura 9.</b> Ação bactericida do Orégano (3,125 µL /mL) frente a <i>E. coli</i> EW239 multirresistentes.....	39
<b>Figura 10.</b> Linha do tempo mostrando a expansão mundial da detecção de <i>C. auris</i> ....	43
<b>Figura 11.</b> Valores da média do fator de redução logarítmica e o do desvio padrão da base, sabonete com os óleos, Protex® DUOPROTECT e do Riohex®2%. ....	49
<b>Figura 12.</b> Análise comparativa da eficácia do sabonete com óleos essenciais com os controles utilizados. Sabonete com óleos essenciais vs base ( <b>A</b> ), sabonete com óleos essenciais vs Protex® DUOPROTECT ( <b>B</b> ) e sabonete com óleos essenciais vs Riohex®2%. Teste t. **p<0,0049; ***p<0,0003.....	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Linhagens bacterianas ensaiados.....	20
<b>Tabela 2.</b> Formulação da base do sabonete líquido.....	27
<b>Tabela 3.</b> Formulação do sabonete com os óleos essenciais para volume de 10 mL.....	28
<b>Tabela 4.</b> Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais para linhagens bacterianas (em $\mu\text{L}/\text{mL}$ para os óleos; $\mu\text{g}/\text{mL}$ para gentamicina e % para a clorexidicina).....	35
<b>Tabela 5.</b> Características das bactérias multirresistentes <i>E. coli</i> EW222 e EW239.....	36
<b>Tabela 6.</b> Classes terapêuticas de antibióticos. ....	36
<b>Tabela 7.</b> Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais frente as bactérias. ....	38
<b>Tabela 8.</b> Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais frente aos fungos filamentosos (em $\mu\text{L}/\text{mL}$ para os óleos; $\mu\text{g}/\text{mL}$ para fluconazol e % para a clorexidina).....	40
<b>Tabela 9.</b> Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais frente aos fungos filamentosos. ....	40
<b>Tabela 10.</b> Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais frente às leveduras (em $\mu\text{L}/\text{mL}$ para os óleos; $\mu\text{g}/\text{mL}$ para fluconazol e % para a clorexidina). ....	42
<b>Tabela 11.</b> Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais frente às leveduras. ....	42
<b>Tabela 12.</b> Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais combinados frente às bactérias (em $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). ....	45
<b>Tabela 13.</b> Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais combinados frente às bactérias. ....	45
<b>Tabela 14.</b> Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). ....	46
<b>Tabela 15.</b> Determinação da CIM e da CBM dos óleos essenciais frente a <i>S. marcescens</i> ATCC 13880 (em $\mu\text{L}/\text{mL}$ para os óleos e % para a clorexidina). ....	46
<b>Tabela 16.</b> Determinação da CIM e da CBM dos óleos essenciais combinados frente a <i>S. marcescens</i> ATCC 13880 (em $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). ....	46
<b>Tabela 17.</b> Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). ....	47

**Tabela 18.** Valores dos logaritmos referentes aos pré e pós-valores e o fator de redução logarítmica para cada um dos procedimentos de higienização, as médias desses valores e o desvio padrão.....48

**Tabela 19.** Resultado da análise por CG-MS dos óleos essenciais de cravo, orégano e tomilho.....51

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>CBM</b>	Concentração bactericida mínima
<b>CDC/EUA</b>	Centers for Disease Control and Prevention dos Estados Unidos da América
<b>CIF</b>	Concentração Inibitória Fracionada
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FCFRP/USP</b>	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
<b>ICIF</b>	Índice de concentração inibitória fracionada
<b>IRAS</b>	Infecções relacionadas à assistência à saúde
<b>MDR</b>	Bactérias multirresistentes
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PVPI</b>	Polivinilpirrolidona-iodo
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>TSB</b>	Tryptic Soy Broth
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colônia

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
1.1 HIGIENIZAÇÃO DAS MÃOS.....	8
1.2 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS).....	11
1.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA .....	11
1.4 AGENTES ANTISSÉPTICOS QUÍMICOS .....	12
1.4.1 DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA .....	13
1.4.2 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	14
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	19
3.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	19
3.2.1 PREPARO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	19
3.2.2 PREPARO DOS CONTROLES POSITIVOS .....	19
3.2.3 MICRO-ORGANISMOS .....	19
3.2.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	20
3.2.5 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) .....	22
3.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	22
3.3.1 PREPARO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	22
3.3.2 PREPARO DOS CONTROLES POSITIVOS .....	22
3.3.3 MICRO-ORGANISMOS .....	23
3.3.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	23
3.3.5 CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....	24
3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS PARA A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> .....	24
3.4.1 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	24
3.4.2 PREPARO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	25
3.4.3 PREPARO DOS CONTROLES POSITIVOS .....	25
3.4.4 MICRO-ORGANISMOS .....	25

3.4.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	25
3.4.6 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) .....	26
3.4.7 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (ICIF).....	26
3.5 EFEITO SINÉRGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAS DE CRAVO, ORÉGANO E TOMILHO FRENTE A <i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 .....	27
3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VIVO</i> .....	27
3.6.1 FORMULAÇÃO DO SABONETE.....	27
3.6.2 CONSTITUINTES DO Protex® DUOPROTECT .....	28
3.6.3 DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA 2% (Riohex®2% - Rioquímica).....	28
3.6.4 PREPARO DA CULTURA BACTERIANA PARA CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DOS DEDOS.....	28
3.6.5 ENSAIO <i>IN VIVO</i> .....	29
3.6.6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DA AMOSTRA:.....	31
3.6.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS DO ENSAIO <i>IN VIVO</i> .....	32
3.7 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASSAS (CG-MS). .....	33
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	34
4.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	39
4.3 SINERGISMO.....	45
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DO SINERGISMO DA <i>S. marcescens</i> ATCC 13880. ....	46
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VIVO</i> .....	47
4.6 AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	51
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO A – Procedimento padrão de lavagem de mãos.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO B – Esclarecimentos ao sujeito da pesquisa. ....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido. ....</b>	<b>64</b>

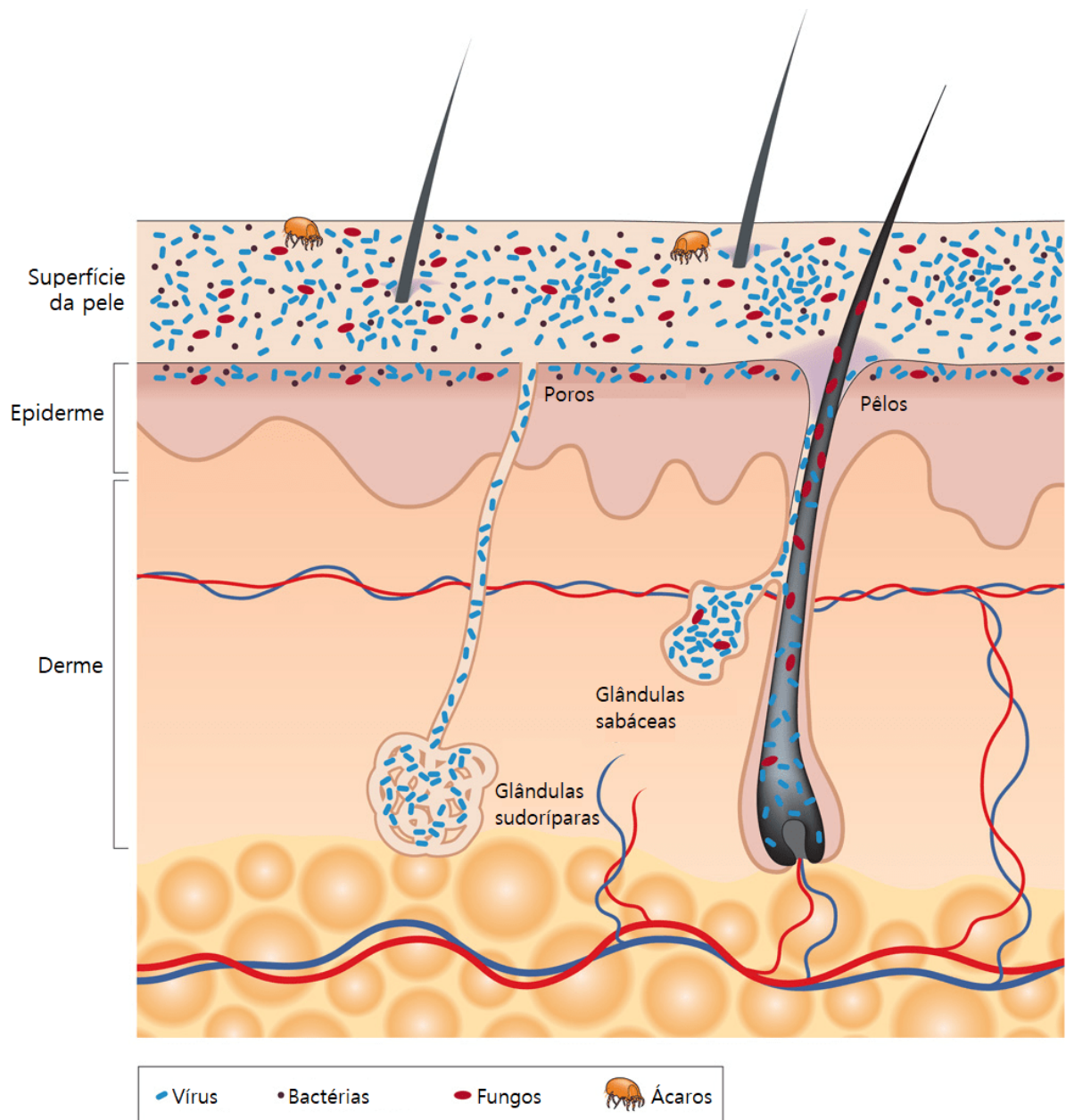
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 HIGIENIZAÇÃO DAS MÃOS

A pele é o maior órgão do corpo humano consistindo em seu revestimento. A pele é indispensável à vida devido as suas importantes funções: isolar componentes orgânicos do meio externo, impedir a ação de agentes externos, evitar a perda de água, eletrólitos e outras substâncias do meio interno, fornecer proteção imunológica, realizar termorregulação, propiciar a percepção e apresentar função secretória. (CDC, 2002; GRANATO, 2003; SIVIERI *et al*; 2021). Devido a sua localização, a pele apresenta características específicas, que a torna um reservatório para uma grande variedade de micro-organismos que podem ser transferidos de uma superfície para outra, através do contato direto (pele com pele), ou indireto, através do contato com objetos e superfícies contaminadas (BRASIL, 2009; ARDA *et al.*, 2014).

A microbiota da pele é classificada em transitória e residente. A microbiota transitória se encontra na camada mais superficial da pele e sua remoção das mãos ocorre pela simples higienização com água, sabonete e fricção mecânica. A microbiota transitória pode servir de reservatório de micro-organismos patogênicos que causam infecções e micro-organismos não-patogênicos (KAMPF; KRAMER, 2004). A microbiota residente, a qual se encontra nas camadas mais profundas da pele, é mais resistente à higienização simples, com apenas água, sabonete e fricção das mãos. As bactérias encontradas na microbiota residente apresentam uma menor chance de causar infecções quando transmitidas por contato (Figura 1) (Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde - PNPCIRAS - 2021 a 2025).

**Figura 1.** Microbiota da pele.



Fonte: MANON *et al.*, 2021.

As mãos são os principais vetores de transmissão de micro-organismos. Portanto, a higienização das mãos é a medida mais simples e menos dispendiosa para prevenir a propagação de micro-organismos, seja pelo contato direto ou pelo contato indireto. A higienização das mãos se refere tanto a higienização simples quanto a antisepsia cirúrgica (Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do Paciente em Serviços de Saúde: Higienização das Mãos/Anvisa, 2009).

Há muito tempo já se falava sobre a importância da higienização das mãos. O médico húngaro Ignaz Philip Semmelweis (1818-1865), comprovou a relação da febre puerperal com

a ausência de lavagem das mãos dos médicos. Semmelweis pressupôs que a transmissão de partículas cadavéricas das mãos de estudantes e médicos para as parturientes era o fator responsável pelo aparecimento da febre puerperal (Figura 2). A febre puerperal afetava muitas parturientes que vinham a óbito. Por volta de maio de 1847, ele insistiu que estudantes e médicos lavassem suas mãos com solução clorada após as autópsias e antes de examinar as pacientes da clínica obstétrica (FERNANDES; FERNANDES; RIBEIRO FILHO, 2000; TRAMPUZ; WIDMER, 2004). Após essa medida, no mês seguinte, a taxa de mortalidade caiu de 12,2% para 1,2% (MACDONALD *et al.*, 2004).

**Figura 2.** Semmelweis e a queda na mortalidade materna após a lavagem das mãos.



**Fonte:** <https://radis.ensp.fiocruz.br/index.php/home/reportagem/o-estranho-semmelweis-e-um-misterio-milenar>

O uso preconizado de um agente tópico de eficácia antimicrobiana, ou seja, técnica e tempo adequados, aliado a adesão regular do seu uso nos momentos indicados, são conjuntamente essenciais para a prevenção da transmissão de micro-organismos pelas mãos.

O principal meio de transmissão de micro-organismos em ambientes de assistência à saúde são as mãos dos profissionais de saúde. Portanto, a higienização das mãos se torna o principal protagonista para o controle e prevenção das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Aliado a isso temos também a necessidade de elaboração e aplicação de uma série de protocolos de prevenção, a aplicação de medidas de precaução e isolamento, o gerenciamento do uso de antimicrobianos e finalizando os protocolos de limpeza e desinfecção

de superfícies (Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do Paciente em Serviços de Saúde: Higienização das Mãos /Anvisa, 2009).

## 1.2 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS)

Um problema grave para a saúde pública mundial são as IRAS, as quais são os principais eventos adversos associados à assistência à saúde. As IRAS acometem os pacientes após sua internação e podem se manifestar durante essa ou após sua alta, sempre que forem relacionadas a procedimentos realizados durante a assistência. Desconhecendo-se o período de incubação do agente etiológico e não obtendo-se evidência clínica ou dados laboratoriais que indiquem infecção no momento da internação ou admissão do paciente, diagnostica-se como IRAS, a toda manifestação clínica de infecção que se apresenta a partir de setenta e duas horas após a internação ou admissão do paciente. Como consequências das IRAS ocorrem: aumento da morbidade e da mortalidade, aumento dos custos a elas relacionados, além de prejudicar a segurança do paciente e a qualidade dos serviços de saúde (Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde - PNPCIRAS - 2021 a 2025).

Os Estados Unidos da América (EUA) e países da Europa reportaram custos estimados em vários bilhões por ano com as ocorrências de IRAS. Nos países em desenvolvimento, os valores econômicos dispendidos com as IRAS ainda não são muito evidenciados. O Centers for Disease Control and Prevention dos Estados Unidos da América (CDC/EUA), diz que os custos médicos diretos das IRAS para hospitais, apenas nos EUA, variam de US\$ 35,7 a 45 bilhões anuais, enquanto que na Europa chega a € 7 bilhões anuais (STORR *et al.*, 2017).

No Brasil um estudo realizado mostrou que o custo diário do paciente com IRAS foi 55% superior ao de um paciente sem IRAS (KIFFER *et al.*, 2015). A taxa de IRAS no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde em 15/05/2019, era de 14%. O recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é de 5%. A preocupação com as infecções relacionadas à assistência à saúde, vem crescendo no Brasil desde a década de 1990.

## 1.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Muitos estudos descrevem sobre o surgimento de micro-organismos resistentes a diferentes medicamentos antimicrobianos e, segundo Fracarolli, Oliveira e Marziale (2017),

isso é considerado um problema de saúde global, uma vez que compromete a efetividade dos agentes antimicrobianos. Esse aumento de resistência antimicrobiana ocorre devido ao uso indiscriminado e intenso de antibióticos, tanto na área hospitalar, quanto na produção de alimentos para os animais e na agricultura. Dessa forma, aumenta-se a pressão seletiva e a oportunidade de exposição dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos, promovendo o desenvolvimento da resistência antimicrobiana através da aquisição de genes de resistência ou por mutações em determinantes de resistência. (SANTOS, 2004; FRACAROLLI; OLIVEIRA; MARZIALE, 2017; GARCÍA-SALINAS *et al.*, 2018). Esse problema torna-se mais grave uma vez que um número pequeno de agentes antimicrobianos está sendo desenvolvido (BOUCHER *et al.*, 2009; EUROPEAN CDP and CE, 2009).

Uma bactéria é considerada resistente a uma classe de antimicrobiano quando ela é resistente a um ou mais agentes antimicrobianos dentro dessa classe. Portanto, bactérias multirresistentes (MDR) são bactérias que não apresentam suscetibilidade a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

#### 1.4 AGENTES ANTISSÉPTICOS QUÍMICOS

Vários antissépticos e sabonetes associados a antissépticos, como: clorexidina, polivinilpirrolidona-iodo (PVPI), triclosan e álcool, podem ser utilizados na higienização das mãos. Os antissépticos para a higienização das mãos devem ter as características descritas a seguir: um amplo espectro de ação antimicrobiana; ação rápida; efeito residual persistente; não devem ser tóxicos; não devem apresentar absorção sistêmica; não devem causar sensibilidade, ressecamento, manchas, irritação, corrosão ou fissuras; devem apresentar odor agradável ou ausente; apresentar boa solubilidade; ter boa estabilidade química, para que não ocorra sua decomposição por efeito da luz e calor; ter um custo acessível e ser de fácil manuseio em dispensadores ou embalagens de pronto uso (BRASIL, 2009).

Sabonetes antimicrobianos contém agentes antissépticos e esses podem contribuir para o aumento da resistência bacteriana, após exposições consecutivas. Esses agentes antissépticos podem também provocar um desequilíbrio da microbiota normal da pele levando a ocorrência de infecções oportunistas. A presença de substâncias carcinogênicas e reações adversas, como alergias e distúrbios endócrinos, são também associados ao uso de alguns sabonetes antissépticos (GNATTA *et al.*, 2013; HALDEN, 2014).

Clorexidina e Triclosan são agentes antissépticos comumente utilizados para a higienização das mãos e ambos são relacionados a causas de dermatites de contato. Um estudo

diz que a clorexidina tem uma ação alérgica subestimada e que deveria ser testada em profissionais de saúde, uma vez que esses se expõem frequentemente ao agente (TOHOLKA; NIXON, 2013).

O uso indiscriminado de sabonetes antissépticos (uso contínuo e a longo prazo) podem trazer riscos à saúde e ao meio ambiente. Exemplo disso são os agentes antissépticos: triclosan e triclocarban (SNYDER; O'CONNOR, 2013; YUEH; TUKEY, 2016; WEATHERLY; GOSSE, 2017). A seleção de linhagens bacterianas, que pode levar a resistência microbiana, tem sido uma grande preocupação (BEDOUX *et al.*, 2012); juntamente com o descarte doméstico e industrial, o qual traz riscos à saúde de organismos aquáticos e seres humanos devido a bioacumulação e persistência no ambiente (YUEH; TUKEY, 2016). O Food and Drug Administration (FDA), desde 2016, proibiu o uso do triclosan e triclocarban em produtos antissépticos para a lavagem das mãos, os quais são vendidos sem prescrição médica, como os sabonetes encontrados nas farmácias e supermercados (FDA, 2016).

Uma alternativa de substituição ao uso de antissépticos e desinfetantes sintéticos é o uso de compostos de origem vegetal. Isso pode evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana, pois os metabólitos vegetais atuam por mecanismos variados (BARBOUR *et al.*, 2004).

#### 1.4.1 DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

O digluconato de clorexidina (bis-biguanida, catiônica sintética) é utilizada como antisséptico. Foi desenvolvido na Inglaterra no início dos anos 1950 e introduzido nos EUA nos anos 70. Este antisséptico apresenta atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas, menor atividade contra bactérias Gram-negativas e fungos, mínima atividade contra micobactérias, esporos e grande parte dos vírus. A ocorrência de irritação na pele é concentração dependente, com probabilidade maior para produtos que contêm 4% de clorexidina e quando utilizados com frequência na higienização das mãos (DENTON, 2001; BOYCE; PITTE, 2002; KRAMER *et al.*, 2004; WHO, 2006).

A clorexidina tem sido considerada no contexto de resistência a agentes antimicrobianos ao longo dos anos de sua utilização (POOLE, 2002; CHAPMAN, 2003). Subpopulações com diferentes suscetibilidades a clorexidina foram encontradas em várias espécies incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* (BUXSER, 2021). Muitas alterações na expressão genética foram descritas após o tratamento com clorexidina. *Pseudomonas aeruginosa* apresentou duzentos e cinquenta alterações

estatisticamente significativas na expressão gênica quando tratada com 5 µg/mL de clorexidina (NDE *et al.*, 2009).

#### 1.4.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Atualmente, busca-se alternativas de agentes antissépticos, devido ao aumento de relatos científicos sobre a capacidade de adaptação de linhagens, que desenvolvem mecanismos de resistência a múltiplas drogas, e até mesmo aos biocidas, tornando-se, então, uma preocupação para a população brasileira e mundial com relação ao impacto desse fator de risco na saúde pública. Assim sendo, os óleos essenciais de diferentes plantas podem ser uma alternativa no combate de micro-organismos resistentes (BRUNO, K. F. *et al.*, 2007; FIORENTINO, 2009; YAP *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2019).

Os óleos essenciais são substâncias voláteis produzidas naturalmente pelas plantas com a finalidade de proteção contra pragas e micro-organismos e de atrair insetos polinizadores. Esses são obtidos de partes de plantas como: flores, botões, caules, folhas, sementes, galhos, raízes, frutos e cascas. Os óleos essenciais são armazenados em cavidades, células secretoras, células epidérmicas, canais ou tricomas celulares. Eles são produzidos pelas plantas como metabólitos secundários e são conhecidos por suas propriedades: antibacterianas, antifúngicas, inseticidas e antivirais. As propriedades biológicas e fragrâncias são resultantes de terpenos e fenilpropanóides os quais são os principais componentes dos óleos essenciais. A presença de terpenos, fenólicos e aldeídos em óleos essenciais tem grande aplicação em biomedicina, pois essas substâncias eliminam muitos patógenos virais, fúngicos e bacterianos. Além disso, podem conter outros compostos como ácidos graxos, óxidos e derivados de enxofre. A propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais é resultado da interação das diferentes classes de compostos presentes na sua constituição. Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos naturais com cerca de 20 a 60 constituintes com quantidades variáveis. Os principais constituintes em torno de 2 ou 3 (específicos de cada óleo essencial), como por exemplo: carvacrol, timol ou eugenol, constituem de 20% a 70% em relação ao total de componentes (GARCÍA-SALINAS *et al.*, 2018; TARIQ *et al.*, 2019; VALDIVIESO-UGARTE *et al.*, 2019; WIŃSKA *et al.*, 2019).

Os óleos essenciais de cravo, canela, orégano, pimentão, alecrim e tomilho também demonstraram inibir o crescimento de linhagens microbianas resistentes, as quais são difíceis de serem tratadas com os antibióticos convencionais, um exemplo é a linhagem de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, sendo o mais eficaz o óleo de cravo. Além disso, diversos estudos

revelaram que os óleos essenciais podem inibir a formação de biofilme. Biofilme é uma matriz complexa de micro-organismos em que as células se ligam à superfície biótica ou abiótica. Essa inibição se dá por meio da inibição do *quorum sensing* que é a comunicação, troca de sinais entre as células para regular a densidade populacional das bactérias. A atividade antibacteriana dos óleos essenciais difere devido às diferentes composições da membrana celular das bactérias, agindo de maneira diferente em relação às Gram-positivas e Gram-negativas (VALDIVIESO-UGARTE *et al.*, 2019; TARIQ *et al.*, 2019).

As pesquisas científicas atuais têm comprovado a ação dos óleos essenciais como anti-inflamatória, bactericida, analgésica, sedativa, estimulante, antifúngica, repelente de insetos, entre outras. Além disso, devido ao problema de rápido surgimento de micro-organismos resistentes a medicamentos, a atividade antimicrobiana está sendo o principal foco de diversos estudos. Os óleos essenciais estão ganhando mais popularidade, pois muitas drogas sintéticas apresentam reações adversas e ao fato de serem uma alternativa interessante devido à resistência dos micro-organismos a algumas drogas. Os óleos essenciais são considerados como produtos químicos GRAS (geralmente considerados seguros) pelo FDA, sendo assim, na maioria das vezes, não há problemas de toxicidade associados a eles (VALDIVIESO-UGARTE *et al.*, 2019; TARIQ *et al.*, 2019).

Diante de uma vasta pesquisa nos artigos publicados sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, selecionamos para testar os óleos de: orégano (*Origanum vulgare*), melaleuca ou tea tree (*Melaleuca artemifolia*), cravo (*Eugenia caryophyllus*), tomilho (*Thymus vulgaris*); alecrim (*Rosmarinus officinalis*), menta piperita USA (*Mentha piperita*) e eucalipto citriodora (*Eucalyptus citriodora*); em razão de suas atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais (SCHERER *et al.*, 2009; GNATTA *et al.*, 2013; PAPADOPOMLOU, 2017; SAKKAS; PUŠKÁROVÁ *et al.*, 2017; MAN *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2019; TARIQ *et al.*, 2019).

#### 1.4.2.1 Mecanismo de ação dos óleos essenciais

Os óleos essenciais apresentam diferentes classes de compostos em sua constituição e a interação entre os mecanismos de ação desses compostos resulta em sua potente ação antimicrobiana (TARIQ *et al.*, 2019).

Vários mecanismos de atividades antimicrobiana de óleos essenciais têm sido propostos. Os óleos essenciais desestabilizam a estrutura da membrana celular das bactérias, levando a

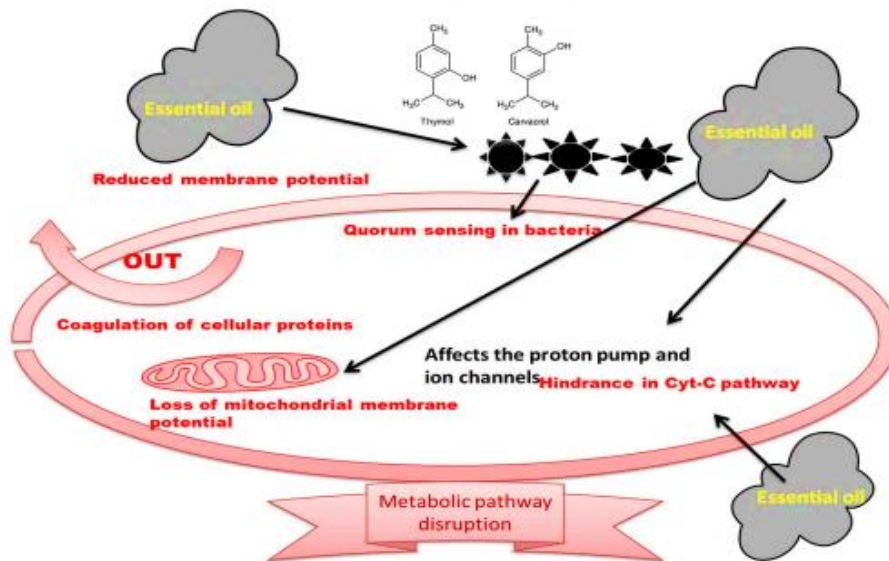
quebra de sua integridade e aumento de sua permeabilidade, que interrompe muitas das atividades celulares, incluindo a produção de energia, transporte da membrana e outras funções regulatórias metabólicas. A ruptura da membrana celular por óleos essenciais pode afetar vários processos vitais como: processamento de nutrientes, síntese de macromoléculas estruturais e a secreção de reguladores de crescimento. Devido à sua natureza lipofílica os óleos essenciais são facilmente penetráveis nas células das membranas bacterianas (SAKKAS; PAPADOPOMLOU, 2017; TARIQ *et al.*, 2019).

Óleos essenciais de várias plantas aromáticas e medicinais foram relatados como causadores de aumento da permeabilidade da membrana de células bacteriana, levando ao vazamento de componentes celulares e perda de íons. O efeito bacteriano dos óleos essenciais também é ligado à redução do potencial de membrana, a interrupção das bombas de prótons e o esgotamento de adenosina trifosfato (ATP). Essa alteração na organização da célula pode causar um efeito em cascata afetando as organelas celulares. Os óleos essenciais passam através da parede celular e membrana citoplasmática rompendo a estrutura lipoproteica. Esses eventos podem ser responsáveis pela coagulação dos componentes celulares internos e quebra das ligações da camada lipoproteica (Figura 3) (SAKKAS; PAPADOPOMLOU, 2017; TARIQ *et al.*, 2019).

A eficácia do efeito antimicrobiano dos óleos essenciais e de seus componentes individuais pode diferir de um micro-organismo para outro. Estudos mais detalhados dos componentes dos óleos essenciais seriam necessários para melhorar nosso entendimento de seu mecanismo de atividade antimicrobiana (SAKKAS; PAPADOPOMLOU, 2017; TARIQ *et al.*, 2019).

Em células de leveduras, os óleos essenciais estabelecem um potencial de membrana através da parede celular e interrompe a cadeia do ATP, causando danos na parede celular. Os óleos essenciais têm o poder de penetrar e destruir a parede celular do fungo e a membrana do protoplasma por um processo de permeabilização que termina com a desintegração da membrana mitocondrial (TARIQ *et al.*, 2019).

**Figura 3.** Mecanismo antimicrobiano dos óleos essenciais.



Fonte: TARIQ *et al.*, 2019.

A ação dos óleos essenciais contra bactérias Gram-positivas e fungos parecem ser semelhantes. Os óleos essenciais inibem a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), proteínas e polissacarídeos. Os efeitos antifúngicos que ocorrem devido à ação dos óleos essenciais são semelhantes aos efeitos da ação dos antibióticos. A atividade antimicrobiana ou antifúngica dos óleos essenciais pode ser causada pela atividade dos terpenos/terpenóides, que devido ao seu caráter extremamente oleofílico e baixo peso molecular, são capazes de romper a parede da célula, causando morte celular (TARIQ *et al.*, 2019)

Esse efeito em cascata dos óleos essenciais nas células dos micro-organismos e sua atuação afetam várias organelas celulares, que proporciona uma menor chance de apresentar resistência bacteriana quando comparado aos produtos sintéticos, pois esses últimos, em sua grande maioria, apresentam um único mecanismo de ação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais frente a bactérias e fungos de interesse clínico, a seguir, elaborar e avaliar uma formulação de sabonete líquido com ação antimicrobiana *in vivo* com os óleos mais efetivos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais contra linhagens de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ATCC e linhagens de bactérias multirresistentes;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais contra fungos filamentosos e leveduras;
- Avaliar o efeito sinérgico dos óleos essenciais para a atividade antimicrobiana *in vitro*.
- Desenvolver formulação de sabonete líquido contendo os óleos essenciais mais efetivos.
- Realizar testes de atividade antimicrobiana *in vivo* do sabonete com os óleos essenciais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Uma revisão bibliográfica foi realizada para selecionarmos os óleos essenciais com melhor atividade antimicrobiana.

Os óleos essenciais testados foram: melaleuca ou tea tree (*Melaleuca artemifolia*) lote: 57841 e cravo (*Eugenia caryophyllata*) lote: 58989 - ambos fabricados pela Oficina de Ervas – Farmácia Fitoterápica; orégano (*Origanum vulgare*) – lote 238; tomilho branco (*Thymus vulgaris*) – lote 195, alecrim (*Rosmarinus officinalis*) – lote 178; menta piperita USA (*Mentha piperita*) – lote: 205 e eucalipto citriodora (*Eucalyptus citriodora*) – lote 120, esses fabricados pela Ferquima Ind. E Com. Ltda.

#### 3.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

##### 3.2.1 PREPARO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais foram dissolvidos em 10% de etanol (900 µL do óleo com 100 µL de etanol) e, posteriormente, em caldo Mueller Hinton (HIMEDIA<sup>®</sup>) - 900 µL do meio com 100 µL do óleo a 10% de etanol, obtendo-se concentrações iniciais de 100 µL/mL. O controle de etanol 10% também foi ensaiado.

##### 3.2.2 PREPARO DOS CONTROLES POSITIVOS

Sulfato de Gentamicina (SIGMA<sup>®</sup> - lote # 051K17475V) foi dissolvido em água, e posteriormente em meio de cultura, utilizando-se a concentração inicial de 100 µg/mL, a qual ficou com 50 µg/mL no primeiro poço. O digluconato de clorexidina 8% - manipulado pela Farmácia Universitária Cidinha Bonini - foi testado inicialmente na concentração de 4% e, a seguir, utilizado em diluições seriadas, com concentrações caindo sempre pela metade.

##### 3.2.3 MICRO-ORGANISMOS

Os óleos essenciais foram avaliados frente a linhagens bacterianas ATCC e bactérias multirresistentes isoladas de ambientes aquáticos públicos e do solo. As linhagens de

*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* multirresistentes, isoladas respectivamente de amostras de solo e ambientes aquáticos, foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Eliana Guedes Stheling da FCFRP-USP: *E. coli* EW222, *E. coli* EW239, *P. aeruginosa* S15 já descritas nos artigos (Tabela 1) (BRAZ *et al.*, 2018; FURLAN; SAVAZZI; STEHLING, 2020).

**Tabela 1.** Linhagens bacterianas ensaiadas.

MICRO-ORGANISMOS	REFERÊNCIAS	LOCAL DE ORIGEM
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	
<i>E. coli</i>	EW222	ambiente aquático público
<i>E. coli</i>	EW239	ambiente aquático público
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	
<i>P. aeruginosa</i>	S15	solo
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	
<i>P. vulgaris</i>	ATCC 6380	
<i>S. Choleraesuis</i>	ATCC 10708	

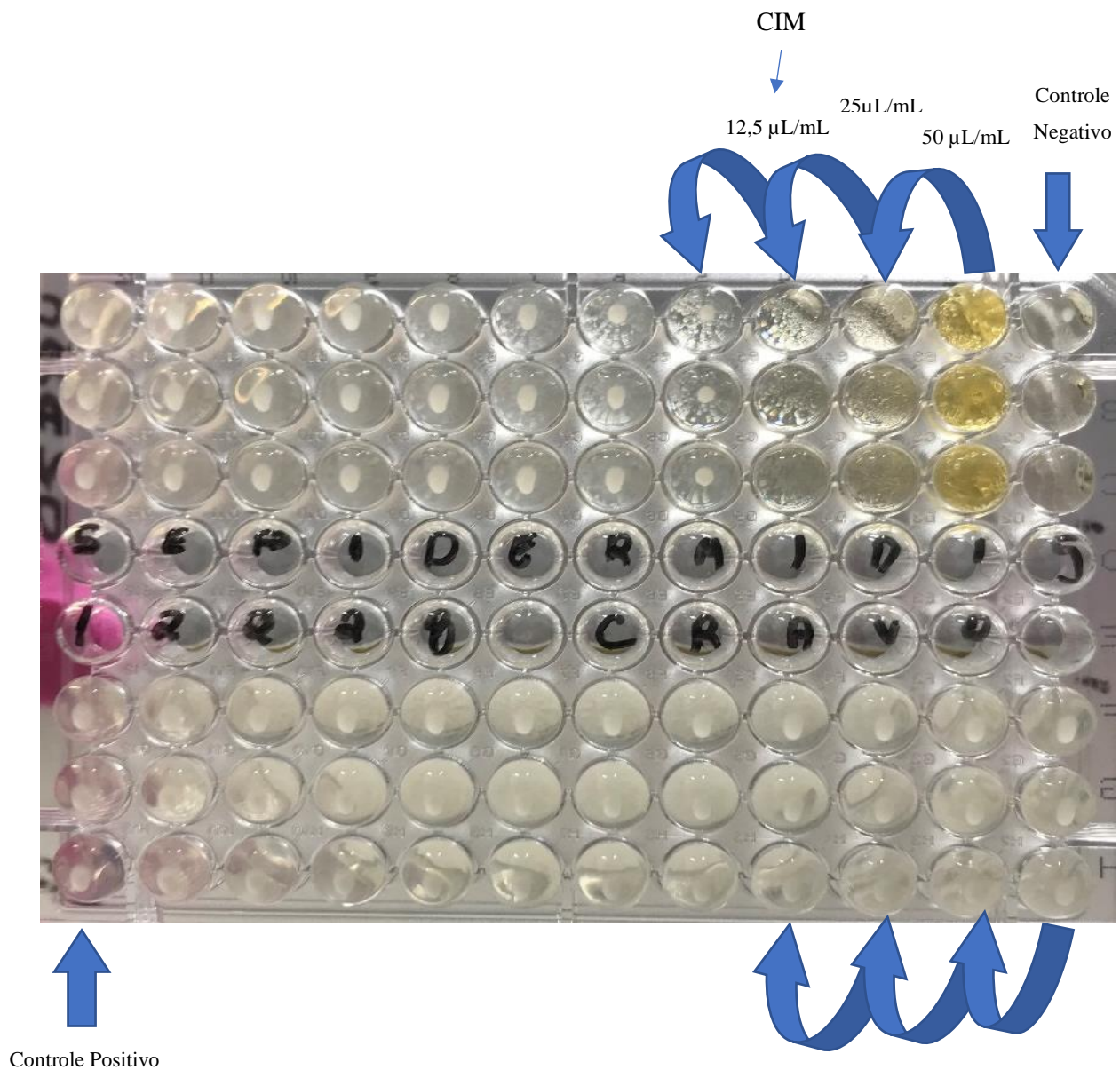
As bactérias foram estocadas em meio BHI – Brain Heart Infusion (HIMEDIA®) + 15% de glicerol (USb®) a -80°C e depois semeadas do estoque em meio Ágar Mueller Hinton (KASVI) e incubadas por 24 horas, a 37 °C como descrito por Cruz *et al.*, 2019.

### 3.2.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O efeito da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi avaliado pelo método de microdiluição em caldo em placas contendo 96 poços, como descrito pelo CLSI M7-A11 (2018). A concentração do inóculo bacteriano foi ajustada em espectrofotômetro utilizando-se comprimento de onda de 550 nm, numa faixa de absorvância de 0,100 nm a 0,125 nm. Em seguida, o inóculo padrão foi diluído 50 vezes em meio Mueller Hinton (HIMEDIA®) e 100 µL deste foi utilizado por poço (em triplicata). Controles de esterilidade do meio de cultura e dos óleos foram realizados conjuntamente. Na coluna 1 realizou-se o controle negativo, sempre em triplicata, colocando-se 200 µL do meio (controle de esterilidade do meio de cultura) e na coluna 12 (últimos 3 poços da parte inferior da placa) o controle positivo (controle do crescimento das bactérias, contendo 100 µL do meio e 100 µL do inóculo, sem a presença do óleo). Na coluna 2 foram colocados 200 µL do óleo com concentração de 100 µL/mL diluído em 10% de etanol, obtendo-se uma concentração inicial de 50 µL/mL após a adição do inóculo. A partir da coluna 2 foram realizadas diluições seriadas até penúltima triplicata da parte inferior

da placa. A faixa de variação de concentração dos óleos testados foi de 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  a 0,000023  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . A CIM foi definida como a menor concentração do óleo em que não se observou nenhum crescimento macroscópico da bactéria (Figura 4). A CIM foi determinada após 24 horas de incubação a 37 °C comparada com o crescimento do controle. O antibiótico sulfato de gentamicina (SIGMA® - 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e o degermante digluconato de clorexidina 8% foram utilizados como controles positivos. A CIM foi determinada em dois experimentos independentes realizados em triplicata.

**Figura 4.** Ensaio de microdiluição para a avaliação da CIM da *S. epidermidis* ATCC 12228 frente ao óleo de cravo.



Foram realizados também testes com o meio a 10% de etanol (900 µL do meio com 100 µL de etanol) com todas as linhagens de bactéria.

### 3.2.5 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Após a avaliação da CIM foi realizada a avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos analisados. Com o auxílio de uma ponteira, uma alíquota do meio de cultura dos poços definidos como CIM, assim como dos poços das duas concentrações anteriores e poços do controle, foram semeadas em triplicata na superfície de placas contendo meio Mueller Hinton (HIMEDIA<sup>®</sup>) sólido e colocadas em estufa a 37 °C por 24 horas. A CBM foi definida como a menor concentração do óleo testado que matou as bactérias, a fim de determinar se o óleo apresentou ação bactericida ou bacteriostática. Os ensaios da CBM foram realizados em dois experimentos independentes realizados em triplicata.

## 3.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

### 3.3.1 PREPARO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os mesmos óleos essenciais testados nas bactérias foram testados frente aos fungos filamentos e leveduriformes, com o mesmo preparo (item 3.2.1), diferindo apenas com relação ao meio utilizado RPMI – 1640 Medium – (SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>).

### 3.3.2 PREPARO DOS CONTROLES POSITIVOS

O antifúngico comercial fluconazol (farmácia Universitária Cidinha Bonini – lote: AFLNC0520061) foi diluído em 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) + 950 µL de RPMI (SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>) ficando com concentração de 1 mg/mL, o qual foi utilizada na concentração de 500 µg/mL e, a seguir, foi diluído seriadamente. O digluconato de clorexidina 8% (manipulado pela Farmácia Universitária Cidinha Bonini) foi testado inicialmente na concentração de 4% e, a seguir, foi utilizado em diluições seriadas, com concentrações caindo sempre pela metade.

### 3.3.3 MICRO-ORGANISMOS

Os óleos essenciais foram avaliados frente aos fungos filamentosos: *Trichophyton rubrum* ATCC MYA-3108, *Aspergillus fumigatus* ATCC 46645 e o isolado clínico de escarro de paciente *Aspergillus fumigatus* LMC 9015.01. Para a realização dos ensaios os fungos foram semeados em Agar - Sabouraud – (KASVI) por 7 dias a 30 °C. Posteriormente, os óleos essenciais também foram avaliados frente as leveduras: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida auris* CDC 811903 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112. As duas linhagens de *Aspergillus fumigatus*, assim como as linhagens de *Cryptococcus neoformans* e *Candida auris* foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Marcia Regina Von Zeska Kress da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP).

Para a realização dos ensaios as leveduras foram semeadas em RPMI - 1640 Medium (SIGMA-ALDRICH®), tamponado com ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico (MOPS - SERVA) na concentração de 0,165mol/L, por 24 horas a 35 °C.

### 3.3.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O efeito da atividade antifúngica dos óleos essenciais foi avaliado pelo método de microdiluição em caldo em placas contendo 96 poços, como descrito pelo CLSI M38-A3 (2017) para fungos filamentosos e como descrito pelo CLSI M27-A4 (2017) para as leveduras. A concentração do inóculo foi ajustada em espectrofotômetro utilizando-se comprimento de onda de 530 nm, numa faixa de absorvância de 0,125 nm a 0,155 nm. Em seguida, o inóculo padrão foi diluído 50 vezes em meio RPMI (SIGMA - ALDRICH®) para os fungos filamentosos e, para as leveduras, uma outra diluição após a de 50 vezes foi realizada, essa última de 20 vezes. Foram adicionados aos poços 100 µL dessas diluições. Controles de esterilidade do meio de cultura e dos óleos foram realizados conjuntamente. A mesma descrição das diluições para a realização da CIM com as bactérias foi realizada com os fungos filamentosos e as leveduras. A faixa de variação de concentração dos óleos testados foi de 50 µL/mL a 0,000023 µL/mL. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo em que não se observou nenhum crescimento macroscópico do fungo. A CIM foi determinada após 7 dias a 30 °C de incubação para os fungos filamentosos e após 24 horas a 35 °C para as leveduras, comparada com o crescimento do controle. O antifúngico fluconazol e o digluconato de clorexidina foram utilizados como controles positivos. Os ensaios da CIM foram realizados em dois experimentos independentes em triplicata.

Foram realizados também testes com o meio a 10% de etanol (900 µL do meio com 100 µL de etanol) com todas as linhagens de fungos e leveduras testados.

### 3.3.5 CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Após a avaliação da CIM foi realizada a avaliação da concentração fungicida mínima (CFM) do óleo em análise. Para isso, placas com Ágar Sabouraud (KASVI) foram semeadas com o inóculo do fungo e da levedura na concentração inibitória mínima do óleo em análise, assim como as duas concentrações respectivamente anteriores.

A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada a partir dos resultados dos testes da CIM. Foi utilizado 50 µL da solução dos respectivos poços, onde encontramos a CIM dos óleos e controles analisados, assim como dos poços das duas concentrações anteriores, e semeou-se em triplicata na superfície de placas contendo Ágar Sabouraud (KASVI) e colocadas a 30 °C por 7 dias para os fungos filamentosos. Para as leveduras, com o auxílio de uma ponteira uma alíquota do meio de cultura dos poços definidos como a CIM, assim como dos poços das duas concentrações anteriores e controles, foi semeada em triplicata na superfície de placas contendo meio Ágar Sabourand (KASVI) e colocadas em estufa a 35 °C por 24 horas. A CFM foi definida como a menor concentração do óleo testado que causou a morte dos fungos, a fim de determinar se o óleo apresenta ação fungicida ou fungistática. Os ensaios da CFM foram realizados em dois experimentos independentes em triplicata.

## 3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS PARA A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

### 3.4.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram utilizados os óleos essenciais: cravo (*Eugenia caryophyllata*) lote: 58989 - fabricado pela Oficina de Ervas – Farmácia Fitoterápica; orégano (*Origanum vulgare*) – lote 238 e tomilho branco (*Thymus vulgaris*) – lote 195 fabricados pela Ferquima Ind. E Com. Ltda. Combinados em duplas: cravo/orégano, cravo/tomilho e tomilho/orégano.

### 3.4.2 PREPARO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O mesmo preparo já descrito anteriormente no item 3.2.1 foi realizado. Em cada poço da triplicata colocou-se 100  $\mu$ L de cada óleo, testados dois a dois, ou seja, cravo/orégano; cravo/tomilho e orégano/tomilho. Após a mistura dos dois óleos de cada combinação as concentrações iniciais ficaram em 50  $\mu$ L/ml. O controle de etanol 10% também foi ensaiado.

### 3.4.3 PREPARO DOS CONTROLES POSITIVOS

Os controles, sulfato de gentamicina (SIGMA<sup>®</sup> - lote # 051K17475V) e o digluconato de clorexidina 8% - manipulado pela Farmácia Universitária Cidinha Bonini, foram utilizados de acordo com o descrito no item 3.2.2.

### 3.4.4 MICRO-ORGANISMOS

O efeito sinérgico dos óleos essenciais foi avaliado frente as linhagens Gram-positiva e Gram-negativas ATCC: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538 e *S. epidermidis* ATCC 12228. Além da linhagem bacteriana isolada de ambiente aquático público *E. coli* EW239 (multirresistente), cedida pela Profa. Dra. Eliana Guedes Stheling da FCFRP-USP (FURLAN; SAVAZZI; STEHLING, 2020).

As bactérias foram estocadas em meio BHI (HIMEDIA<sup>®</sup>) + 15% de glicerol (USb<sup>®</sup>) a -80 °C e depois semeadas do estoque em meio Ágar Mueller Hinton (KASVI) e incubadas por 24 horas, a 37 °C como descrito por Cruz *et al.*, 2019.

### 3.4.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.2.4. A faixa de variação de concentração dos óleos testados foi de 25  $\mu$ L/mL a 0,00004668  $\mu$ L/mL. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo em que não se observou nenhum crescimento macroscópico da bactéria. A CIM foi determinada após 24 horas de incubação a 37 °C comparada com o crescimento do controle. O antibiótico sulfato de gentamicina (SIGMA<sup>®</sup>) - 100  $\mu$ g/mL e o degermante digluconato de clorexidina 8% foram utilizados como controles positivos. A CIM foi determinada em dois experimentos independentes realizados em triplicata.

### 3.4.6 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A CBM foi realizada segundo descrito no item 3.2.5. A CBM foi definida como a menor concentração do óleo testado que matou as bactérias, a fim de determinar se a combinação dos óleos apresentou ação bactericida ou bacteriostática. Os ensaios da CBM foram realizados em dois experimentos independentes realizados em triplicata.

### 3.4.7 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (ICIF)

O efeito combinatório dos óleos essenciais foi obtido através do teste de “tabuleiro em xadrez” com caldo de cultura em placas de microtitulação, com a série de várias diluições dos óleos mais efetivos nas fileiras horizontais e verticais. O Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) dos óleos mais efetivos que é a soma da Concentração Inibitória Fracionada (CIF) foi avaliado segundo a fórmula descrita por (KARPANEN *et al.*, 2008).

$$\frac{A}{\text{CIM } a} + \frac{B}{\text{CIM } b} = \text{CIF } A + \text{CIF } B = \text{ICIF}$$

onde,

A = CIM do fármaco a em combinação

CIM a = CIM do fármaco a sozinho

B = CIM do fármaco b em combinação

CIM b = CIM do fármaco b sozinho

Sendo definida a interação como:

- Sinérgica quando o ICIF é menor ou igual a 0,50;
- Aditiva quando ICIF > 0,50 e menor ou igual a 1,0;
- Indiferente se ICIF >1 e menor ou igual a 4;
- Antagônica quando ICIF > 4,0

### 3.5 EFEITO SINÉRGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAS DE CRAVO, ORÉGANO E TOMILHO FRENTE A *Serratia marcescens* ATCC 13880

Foram realizadas as avaliações da CIM, da CBM e do sinergismo como descritos acima para a linhagem bacteriana de *S. marcescens* ATCC 13880, que foi utilizada como bactéria contaminante no caldo de cultura para o ensaio de lavagem das mãos *in vivo*. Os óleos testados foram: cravo, orégano e tomilho, assim como suas respectivas combinações.

### 3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VIVO*

#### 3.6.1 FORMULAÇÃO DO SABONETE

A formulação do sabonete foi realizada na Farmácia Universitária Cidinha Bonini – UNAERP pela Farmacêutica Profa. Dra. Bruna Altoe Adorno. Para a elaboração da formulação do sabonete líquido, foram selecionados e acrescentados na base os óleos essenciais com melhores atividades antimicrobianas frente as bactérias, fungos filamentosos e leveduras testados, com base nos testes da CIM realizados. Os melhores resultados da CIM foram para os óleos de cravo, orégano e tomilho, os quais foram testados em combinações de dois óleos como descrito na avaliação do efeito sinérgico. A combinação do óleo de cravo e orégano, na concentração de 50 µL/mL de cada um, foi a utilizada na formulação. Essa concentração da CIM é o dobro do maior valor da CIM encontrado durante os testes, o qual foi de 25 µL/mL frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853, tanto para o óleo de cravo quanto para o óleo de orégano. Portanto, foram adicionados na base do sabonete comercial 50 µL/mL do óleo de cravo com 50 µL/mL do óleo de orégano. Os constituintes da base do sabonete estão descritos na Tabela 2 e os constituintes do sabonete com os óleos essenciais para um volume de 10 mL, estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 2.** Formulação da base do sabonete líquido.

CONSTITUINTE	QUANTIDADE
Lauril éter sulfato de sódio	10%
Cocoamidopropilbetaína	4%
EDTA	0,1%
Água destilada qsp	100 mL

**Tabela 3.** Formulação do sabonete com os óleos essenciais para volume de 10 mL.

<b>CONSTITUINTE</b>	<b>QUANTIDADE</b>
Base	9 mL
Óleo de cravo	0,5 mL
Óleo de orégano	0,5 mL

### 3.6.2. CONSTITUINTES DO Protex® DUOPROTECT

Para controle positivo do experimento foi utilizado o sabonete líquido antimicrobiano Protex® DUOPROTECT (lote: 280621BR3413), composto de: água, lauril sulfato de sódio, cocoamidopropil betaina, ácido láctico, fragrância, copolímero de estireno/acrilatos, benzoato de sódio, cocamida MEA, cloreto de sódio, EDTA tetrassódico, hidróxido de sódio, glicerina, óleo de semente de linhaça, extrato de *Camellia sinensis*, limoneno e linalool.

### 3.6.3 DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA 2% (Riohex®2% - Rioquímica)

Foi utilizado como controle positivo do experimento o produto de referência digluconato de clorexidina da marca Riohex®2% - Rioquímica (lote: 2204402). A clorexidina 2% é utilizada para antisepsia das mãos por profissionais da área de saúde em ambientes ambulatoriais e hospitalares.

### 3.6.4 PREPARO DA CULTURA BACTERIANA PARA CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DOS DEDOS

A linhagem bacteriana utilizada para a cultura de contaminação dos dedos foi a *S. marcescens* ATCC 13880. A pigmentação avermelhada de suas colônias foi um fator decisivo na sua escolha, uma vez que facilita a visualização da contagem do número de colônias (Figura 5) quando comparada com as bactérias da microbiota normal que é de coloração amarelada (ANDREYEVA; OGORODNIKOVA, 2015; BHAGWAT; PADALIA, 2020).

**Figura 5.** *Serratia marcescens* ATCC 13880.



A *S. marcescens* foi estocada em meio BHI (HIMEDIA<sup>®</sup>) com 15% de glicerol (USb<sup>®</sup>) a -80 °C e depois semeadas do estoque em meio de cultura sólido Tryptic Soy Broth (TSB - SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>) - acrescido de Ágar (3,75 g a cada 250 mL de meio) e incubadas por 24 horas, a 37 °C. Após o crescimento isolou-se uma colônia a qual foi colocada em meio TSB em tubos de centrifuga de 50 mL com 20 mL de meio TSB (SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>) e a seguir a cultura foi incubada por 24 horas a 37 °C. Um novo crescimento foi realizado, colocando-se 500 µL da solução bacteriana em 30 mL de meio TSB (SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>). Foram preparados 45 tubos de centrifuga de 50 mL com 30 mL de meio TSB (SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>), os quais foram reunidos em um Erlenmeyer de 2 litros. A concentração do inóculo bacteriano final foi ajustada em espectrofotômetro utilizando-se comprimento de onda de 620 nm, numa faixa de absorvância de 0,150 nm a 0,460 nm (BS EN 1500:2013). Foram preparados no total 4 litros da cultura da bactéria para contaminação dos dedos de 20 voluntários.

### 3.6.5 ENSAIO *IN VIVO*

O ensaio da atividade antimicrobiana do sabonete líquido foi realizado conforme método utilizado para avaliar a eficácia de agentes de higiene de mãos: European Standard 1500-2013 (EM 1500 - Chemical disinfectants and antiseptics- Hygienic hand-rub test method and requirements).

Primeiramente os voluntários lavaram as mãos com 1 mL de sabonete líquido sem atividade antisséptica por 60 segundos (seguindo as técnicas do protocolo), secando-as posteriormente por 30 segundos com papel toalha. Em seguida imergiram os dedos parcialmente (até metade dos metacarpos) no caldo de cultura da bactéria por 5 segundos

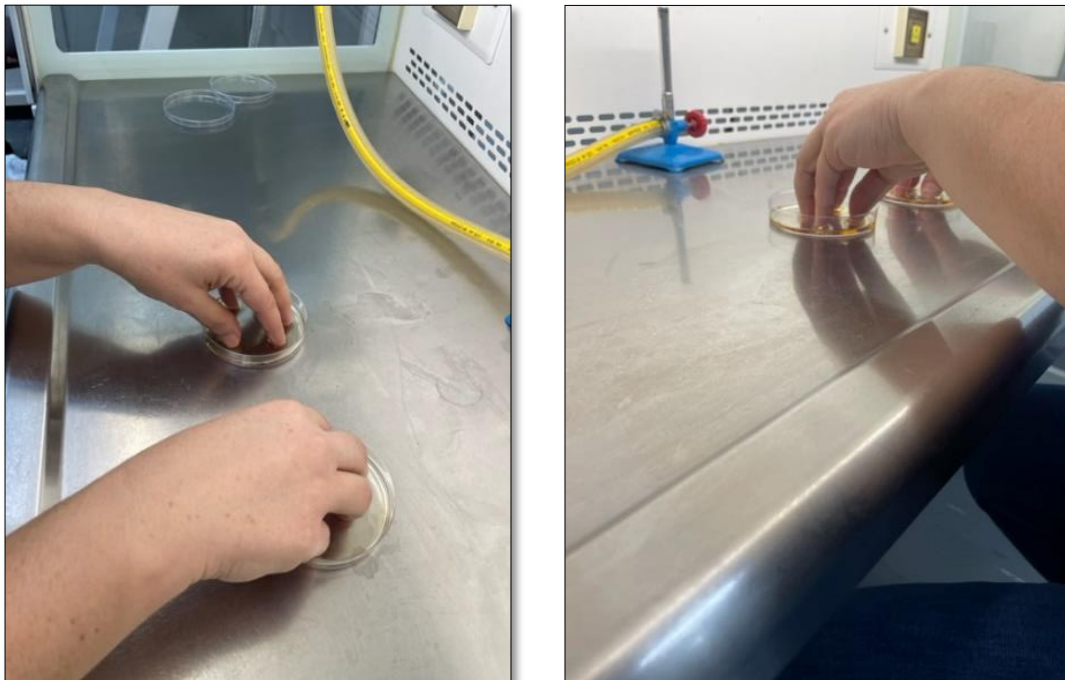
(Figura 6). As mãos foram então retiradas do caldo de cultura, escoando-se o excesso do fluido, inclinando-as com os dedos para baixo, secando-as ao ar por 3 minutos em posição horizontal.

**Figura 6.** Contaminação dos dedos.



Logo após a secagem, para a obtenção da contagem do número de colônias (pré-valor), esfregaram-se os dedos de cada mão separadamente em duas placas de Petri por 60 segundos em 10 mL de meio TSB (SIGMA-ALDRICH®) (Figura 7).

**Figura 7.** Esfregando as pontas dos dedos contaminados no meio TSB.



Aplicou-se posteriormente 1 mL do sabonete teste (contendo os óleos essenciais) para a lavagem das mãos que foi realizada no tempo máximo de 60 segundos, também dentro das técnicas do protocolo. Para a obtenção da contagem do número de unidades formadoras de colônias após o uso do sabonete (pós-valores), realizou-se a secagem das mãos por 30 segundos, mas agora ao ar livre sem a utilização de papel toalha e esfregaram-se os dedos em placas de Petri com 10 mL do meio TSB novamente por 60 segundos. A lavagem das mãos foi estabelecida segundo o protocolo do ANEXO A.

Foi realizado o mesmo procedimento descrito com a base do sabonete (sem a presença dos óleos), com o produto referência digluconato de clorexidina da marca Riohex<sup>®</sup>2% – Rioquímica e com o produto Protex<sup>®</sup> DUOPROTECT.

A seguir fez-se diluições do caldo dos pré-valores (após a contaminação dos dedos) de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  para facilitar a contagem das colônias. Com o auxílio de uma pipeta, 100  $\mu$ L de cada diluição de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , foram semeadas sobre a superfície de placas de Petri com meio TSA. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Esse mesmo procedimento foi realizado para o caldo dos pós-valores (após a lavagem das mãos), mas as diluições foram de  $10^0$ ,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ .

### 3.6.6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DA AMOSTRA:

O projeto foi aprovado pelo COMITE DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP com número do Parecer: 5.486.609.

A amostra composta de 20 indivíduos saudáveis, não subordinados a nenhum membro do grupo, os quais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecimento, atenderam aos seguintes critérios de inclusão:

- Não ter contato com a clorexidina no dia da coleta, pois este apresenta efeito residual;
- Não apresentar sinais de ressecamento nem de lesões na pele;
- Não apresentar sinais de micose ou infecções na pele;
- Idade entre 18 a 55 anos, pois há alterações da microbiota da pele após os 60 anos;
- Gozar de boa saúde.

Critérios de exclusão da amostra:

- Ter contato com a clorexidina, pois este apresenta efeito residual;
- Apresentar sinais de ressecamento, infecções ou lesões na pele;

- Apresentar idade superior a 55 anos, pois há alterações da microbiota da pele após os 60 anos;
- Tomar medicamentos inclusive antibióticos;
- Não gozar de boa saúde.

Esses voluntários foram divididos em 4 grupos: testes com a base (formulação do sabonete sem os óleos essenciais), testes com o sabonete com os óleos essenciais, testes com Riohex<sup>®</sup>2% (digluconato de clorexidina) e testes do Protex<sup>®</sup> DUOPROTECT. Todos os voluntários tiveram acesso aos “Esclarecimentos ao Sujeito da Pesquisa” (ANEXO B) e ao TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, esse último sendo lido e assinado (ANEXO C).

### 3.6.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS DO ENSAIO *IN VIVO*

A contagem das colônias foi realizada após 24 horas de incubação a 37 °C. Foi realizado a contagem das UFC das mãos direita e esquerda dos 5 voluntários, tanto para os pré-valores como os pós-valores, em seguida foi calculado o valor do logaritmo da média ponderada das duas últimas diluições, ou seja, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> (para os pré-valores) e 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-2</sup> (para os pós-valores).

$$\text{Log 10 de } Z = \frac{\Sigma C}{v_1 \times d_1 + v_2 \times d_2}$$

onde:

Z = é a média ponderada das UFC/mL do fluido de amostragem do pré ou pós-valores;

ΣC = é a somatória das UFCs contadas nas placas utilizadas para o cálculo;

v<sub>1</sub> = é o volume do inóculo em mL, retirado do fluido de amostragem na menor diluição;

v<sub>2</sub> = é o volume do inóculo em mL, retirado do fluido de amostragem na maior diluição;

d<sub>1</sub> = é o fator de diluição correspondente à menor diluição do fluido de amostragem;

d<sub>2</sub> = é o fator de diluição correspondente à maior diluição do fluido de amostragem.

Exemplo:

Voluntário 1

Número de colônias na diluição do Pré 10<sup>-3</sup> = 299 UFC

Número de colônias na diluição do Pré 10<sup>-4</sup> = 31 UFC

v<sub>1</sub> = 100 µL (0,1 mL)

$$v_2 = 100 \mu\text{L} (0,1 \text{ mL})$$

$$\text{Log 10 de Z} = \frac{299 + 31}{0,1 \times 10^{-3} + 0,1 \times 10^{-4}}$$

Foi calculado o fator de redução logarítmica, que é a diferença entre o log da média dos pré-valores (considerando a soma das mãos direita e esquerda) e o log da média dos pós-valores (considerando a soma das mãos direita e esquerda), para cada um dos voluntários dos procedimentos de higienização das mãos realizado. A média do fator de redução logarítmica do sabonete com os óleos essenciais deve ser superior ou igual ao do Riohex<sup>®</sup>2% (digluconato de clorexidina) e ou ao do Protex<sup>®</sup> DUOPROTECT para ser aprovado. Se o sabonete com os óleos tiver fator de redução logarítmica menor que os produtos referência, ele não estará em conformidade com o padrão europeu (BSI Standard Publication, 2013).

Para as análises estatísticas foi aplicado o teste t com os valores do fator logarítmico de redução de cada voluntário para cada produto testado.

### 3.7 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-MS).

As análises dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais foram realizadas por CG-EM (Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa), gentilmente pela Profa. Dra. Silvia Helena Taleb Contini, da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, utilizando-se aparelho Varian 3900 com detector seletivo de massa, modelo Saturn 2100T. As condições de análise foram: Coluna capilar: DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ); Temperatura do injetor: 240 °C; Temperatura do detector: 230 °C; Impacto de Elétrons: 70 eV; Gás de arraste: He; Fluxo: 1,0 mL/min.; Split: 1/20; Programa de Temperatura: 60 °C – 240 °C, 3 °C/minuto. Volume de Injeção: 1  $\mu\text{L}$  de solução (1  $\mu\text{L}$  óleo essencial/1 mL AcOEt).

A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (NIST 62 lib.) e índice de retenção de Kovats (ADAMS, 2007).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os óleos essenciais de cravo, orégano e tomilho inibiram todas as bactérias ATCCs testadas: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Salmonella Choleraesuis* e *P. vulgaris*, com valores da CIM variando de 3,125 µL/mL a 50 µL/mL (esse último apresentado pelo óleo de tomilho frente a *P. aeruginosa* ATCC e EW15) (Tabela 4).

Os óleos essenciais de cravo, orégano e tomilho apresentaram atividade antibacteriana frente às linhagens de *E. coli* EW222 e *E. coli* EW239 (Tabela 4). Essas linhagens são multirresistentes e potencialmente patogênicas. A *E. coli* EW222 e *E. coli* EW239 foram isoladas de ambiente aquático e seus genomas foram sequenciados, constatando-se a presença de mutações em seus genes. Essas linhagens apresentam perfil MDR (bactérias multirresistentes), sendo que a *E. coli* EW239 é resistente a 26 antibióticos diferentes enquanto a *E. coli* EW222 apresenta resistência frente a 22 antibióticos diferentes (Tabela 5) (FURLAN; SAVAZZI; STEHLING, 2020).

Os bons resultados dos óleos de cravo, orégano e tomilho já os colocaram em posição de destaque frente aos outros óleos testados. Vale ressaltar também que houve inibição da *P. aeruginosa* EW15, a qual foi isolada de amostras de solo.

Os óleos de menta, eucalipto e alecrim foram testados frente a duas linhagens: *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 6538. Os resultados encontrados, também descritos na Tabela 3, foram bem inferiores aos óleos de cravo, orégano e tomilho. O óleo de menta não inibiu o crescimento das duas linhagens; o óleo de alecrim inibiu apenas a *E. coli*, porém em sua maior concentração 50 µL/mL e o óleo de eucalipto inibiu as linhagens, mas também em sua maior concentração 50 µL/mL. Diante desse resultado, o qual foi bem inferior aos resultados encontrados com os óleos de cravo, orégano e tomilho quando comparamos os valores da CIM frente a essas mesmas linhagens bacterianas testadas, decidimos não fazer a CIM com as outras linhagens de bactérias testadas anteriormente.

O óleo de melaleuca não inibiu o crescimento das linhagens de bactérias as quais foi testado. Foi o óleo de pior resultado em relação a atividade antibacteriana. Os menores valores da CIM foram apresentados com os óleos de orégano e cravo seguido pelo tomilho. O etanol a 10% não inibiu nenhuma das linhagens testadas, o que mostrou que a presença desse na diluição dos óleos não interferiu nos resultados.

**Tabela 4.** Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais para linhagens bacterianas (em  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para os óleos;  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para gentamicina e % para a clorexidicina).

	<b>CRA</b>	<b>ORE</b>	<b>TOM</b>	<b>MEL</b>	<b>MEN</b>	<b>EUC</b>	<b>ALE</b>	<b>GEN</b>	<b>CLO%</b>	<b>ETA 10%</b>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,5	6,25	12,5	*	*	50	50	3,125	$3,05 \cdot 10^{-5}$	*
<i>E. coli</i> EW222	3,125	6,25	25	*	X	X	X	1,562	$2,44 \cdot 10^{-4}$	*
<i>E. coli</i> EW239	12,5	3,125	12,5	X	X	X	X	*	$3,05 \cdot 10^{-5}$	*
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	25	25	50	*	X	X	X	6,25	$1,95 \cdot 10^{-3}$	*
<i>P. aeruginosa</i> S15	12,5	12,5	50	*	X	X	X	0,39	$9,76 \cdot 10^{-4}$	*
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	25	6,25	12,5	*	*	50	*	6,25	$1,22 \cdot 10^{-4}$	*
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	12,5	6,25	12,5	*	X	X	X	0,096	$7,63 \cdot 10^{-6}$	*
<i>P. vulgaris</i> ATCC 6380	12,5	6,25	12,5	X	X	X	X	1,562	$1,95 \cdot 10^{-3}$	*
<i>Salmonella Choleraesuis</i> ATCC 10708	6,25	3,125	6,25	X	X	X	X	12,5	$9,76 \cdot 10^{-4}$	*

**Nota:** (\*) não inibiu; (X) não testado; (CRA) cravo; (ORE) orégano; (TOM) tomilho; (MEL) melaleuca; (MEN) menta; (EUC) eucalipto; (ALE) alecrim; (GEN) gentamicina; (CLO) clorexidina; (ETA) etanol.

A Tabela 5 mostra a lista de antibióticos que as linhagens de *E. coli* EW222 e 239 apresentaram resistência e o local de coleta dessas linhagens, segundo artigo de FURLAN; SAVAZZI; STEHLING, 2020.

**Tabela 5.** Características das bactérias multirresistentes *E. coli* EW222 e EW239.

	<i>E. coli</i> EW222	<i>E. coli</i> EW239
<b>Cidade</b>	Sertãozinho	Sertãozinho
<b>Origem da amostra</b>	Ribeiro	Ribeiro
<b>Antibióticos resistentes</b>	AMP, CZO, CXM, FOX, CEC, CAZ, CTX, CRO, FEP, ATM, STR, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, OFX, LOM, NAL, SXT, SUL, TMP	AMP, AMC, SAM, CZO, CXM, CEC, CAZ, CTX, CRO, FEP, ATM, GEN, TOB, FOR, TET, DOX, CIP, LVX, NOR, OFX, LOM, NAL, SXT, SUL, TMP, CHL

**Nota:** AMC, amoxicilina/ácido clavulânico; AMP, ampicilina; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidizina; CEC, cefaclor; FOX, cefoxitina; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; CRO, ceftriaxona; CTX, cefotaxima; CXM, cefuroxima; CZO, cefazolina; DOX, doxiciclina; FEP, cefepima; GEN, gentamicina; LOM, lomefloxacina; LVX, levofloxacina; NAL, ácido nalidíxico; NOR, norfloxacina; OFX, ofloxacina; SAM, ampicilina/sulbactam; STR, estreptomicina; SUL, sulfonamida; SXT, trimetoprima/sulfametoxazol; TET, tetraciclina; TOB, tobramicina; TMP, trimetoprima (FURLAN; SAVAZZI; STEHLING, 2020).

Na relação de antibióticos da Tabela 6 encontram-se representantes de quatro Classes Terapêuticas de Antibióticos existentes no mercado, logo, se uma pessoa se infectar por alguma dessas linhagens de *E. coli* multirresistentes, haverá poucas opções terapêuticas disponíveis no mercado para seu tratamento.

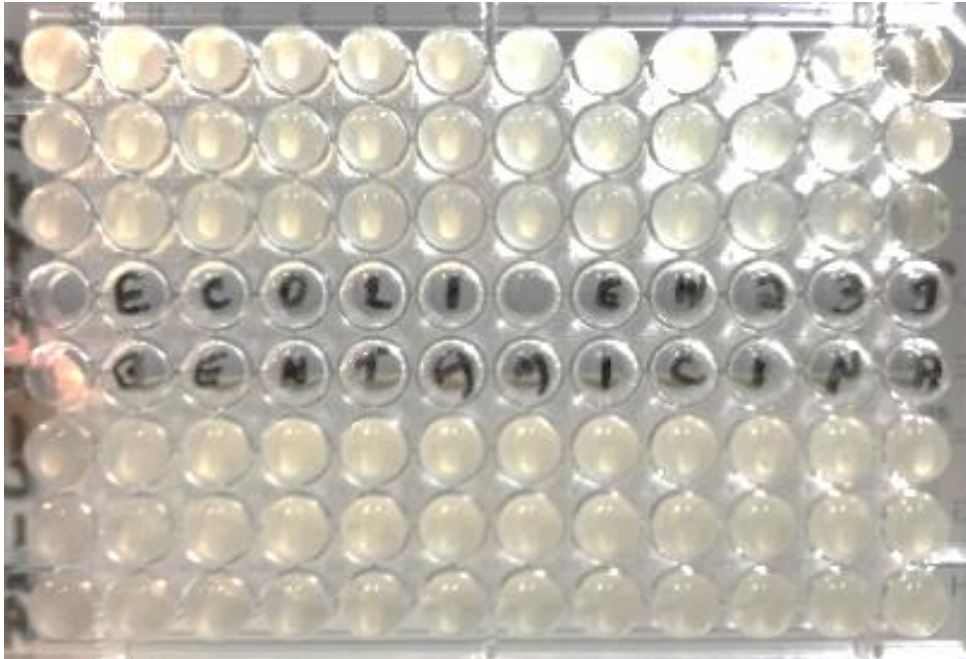
**Tabela 6.** Classes terapêuticas de antibióticos.

<b>Inibidores da Síntese da Parede Celular</b>	<b>Inibidores da Síntese de Proteínas</b>	<b>Inibidores da Biossíntese de Ácidos Nucléicos</b>	<b>Metabolismo do Ácido Fólico e Membrana Celular</b>
AMP, CZO, CXM, FOX, CEC, CAZ, CTX, CRO, FEP, ATM, AMC, SAM	STR, TET, DOX GEN, TOB, CHL	CIP, LVX, NOR OFX, LOM, NAL	SXT, SUL, TMP

**Nota:** AMC, amoxicilina/ácido clavulânico; AMP, ampicilina; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidizina; CEC, cefaclor; FOX, cefoxitina; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; CRO, ceftriaxona; CTX, cefotaxima; CXM, cefuroxima; CZO, cefazolina; DOX, doxiciclina; FEP, cefepima; GEN, gentamicina; LOM, lomefloxacina; LVX, levofloxacina; NAL, ácido nalidíxico; NOR, norfloxacina; OFX, ofloxacina; SAM, ampicilina/sulbactam; STR, estreptomicina; SUL, sulfonamida; SXT, trimetoprima/sulfametoxazol; TET, tetraciclina; TOB, tobramicina; TMP, trimetoprima (FURLAN; SAVAZZI; STEHLING, 2020).

A gentamicina, um dos controles testados, não inibiu o crescimento da *E. coli* EW239 (Figura 8), resultado esse já esperado, pois essa informação consta no artigo de FURLAN; SAVAZZI; STEHLING, 2020.

**Figura 8.** Resultado da CIM do antibiótico gentamicina, mostrando o crescimento do isolado ambiental *E. coli* EW239.



A Tabela 7, mostra que os óleos de orégano, cravo e tomilho apresentaram efeito bactericida para a maioria das linhagens bacterianas testadas, com exceção apenas para as bactérias: *S. epidermidis* ATCC 12228 e *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708. Os controles (gentamicina e clorexidina) apresentaram uma CBM em sua grande maioria bacteriostático.

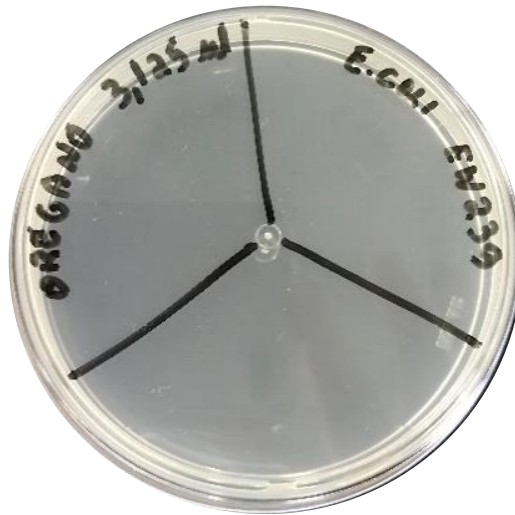
**Tabela 7.** Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais frente as bactérias.

	<b>CRAVO</b>	<b>ORÉGANO</b>	<b>TOMILHO</b>	<b>EUCALIPTO</b>	<b>ALECRIM</b>	<b>GENTAMICINA</b>	<b>CLOREXIDINA</b>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Bactericida	Bactericida	Bactericida	Bactericida	Bactericida	Bacteriostática	Bacteriostática
<i>E. coli</i> EW 222	Bactericida	Bactericida	Bactericida	X	X	Bacteriostática	Bactericida
<i>E. coli</i> EW 239	Bactericida	Bactericida	Bactericida	X	X	*	Bactericida
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Bactericida	Bactericida	Bactericida	X	X	Bactericida	Bacteriostática
<i>P. aeruginosa</i> EW 15	Bacteriostática	Bactericida	Bactericida	X	X	Bacteriostática	Bacteriostática
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Bactericida	Bactericida	Bactericida	Bacteriostática	*	Bactericida	Bacteriostática
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	Bacteriostática	Bacteriostática	Bacteriostática	X	X	Bacteriostática	Bacteriostática
<i>P. vulgaris</i> ATCC 6380	Batericida	Bactericida	Bactericida	X	X	Bactericida	Bacteriostática
<i>Salmonella Choleraesuis</i> ATCC 10708	Bacteriostática	Bacteriostática	Bacteriostática	X	X	Bactericida	Bacteriostática

Nota: (\*) não inibiu; (X) não testado

Os ensaios da CBM realizados com os óleos de cravo, orégano, tomilho apresentaram bons resultados, principalmente Orégano e Cravo (Figura 9).

**Figura 9.** Ação bactericida do Orégano (3,125  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) frente a *E. coli* EW239 multirresistentes.



#### 4.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, os melhores resultados frente as linhagens de fungos filamentosos testados foram para os óleos de orégano, cravo e tomilho. Destaque para o óleo de cravo que inibiu a linhagem *A. fumigatus* LMC 9015.01 (isolada de escarro de paciente) com um valor da CIM de 1,562  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Esses óleos essenciais inibiram o crescimento das três linhagens testadas e com valores da CIM menores quando comparados aos óleos de menta, eucalipto e melaleuca.

O óleo de alecrim não inibiu o crescimento de nenhuma das três linhagens fúngicas. O óleo de melaleuca não inibiu o crescimento da linhagem de *A. fumigatus* LMC 9015.01 (amostra clínica).

Como observado nos resultados da Tabela 9, os óleos essenciais testados apresentaram ação fungistática, assim como o controle fluconazol.

**Tabela 8.** Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais frente aos fungos filamentosos (em  $\mu\text{L/mL}$  para os óleos;  $\mu\text{g/mL}$  para fluconazol e % para a clorexidina).

	<b>CRA</b>	<b>ORE</b>	<b>TOM</b>	<b>MEL</b>	<b>MEN</b>	<b>EUC</b>	<b>ALE</b>	<b>FLU</b>	<b>CLO</b>	<b>ETA</b>
<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645	3,125	0,003051	0,195531	6,25	12,5	3,125	*	250	#	*
<i>A. fumigatus</i> LMC 9015.01	1,5625	6,25	6,25	*	25	50	*	250	#	*
<i>T. rubrum</i> ATCC MYA 3108	1,5625	0,3906	3,125	6,25	12,5	12,5	*	15,62	#	*

**Nota:** (\*) não inibiu; (#) inibiu todos; (CRA) cravo; (ORE) orégano; (TOM) tomilho; (MEL) melaleuca; (MEN) menta; (EUC) eucalipto; (ALE) alecrim; (FLU) fluconazol; (CLO) clorexidina; (ETA) etanol.

**Tabela 9.** Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais frente aos fungos filamentosos.

	<b>CRAVO</b>	<b>ORÉGANO</b>	<b>TOMILHO</b>	<b>MELALEUCA</b>	<b>MENTA</b>	<b>EUCALIPTO</b>	<b>FLUCONAZOL</b>
<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungistático
<i>A. fumigatus</i> LMC 9015.01	Fungistático	Fungistático	Fungistático	X	Fungistático	Fungistático	Fungistático
<i>T. rubrum</i> ATCC MYA 3108	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungistático

**Nota:** (X) não realizado.

O dermatófito antropofílico *T. rubrum* é o agente etiológico mais comum das dermatofitoses em todo o mundo. As infecções causadas por *T. rubrum* são difíceis de tratar e a prevalência de infecções resistentes ou disseminadas é alta em hospedeiros imunocomprometidos (ZHENG, Hailin *et al.*, 2020). Evidencia-se uma necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas a fim de se obter melhores resultados nos tratamentos e mais benefícios para os pacientes, uma vez que, existe uma limitada disponibilidade de antifúngicos seletivos e cada vez mais surgimento de linhagens resistentes (SAM *et al.*, 2018). Os dermatófitos geralmente causam infecções superficiais, mas existem relatos descrevendo dermatófitos que invadem camadas mais profundas e que podem se espalhar para os linfonodos, cérebro e corrente sanguínea, o que pode causar infecções profundas (LANTERNIER *et al.*, 2013).

Os dados da Tabela 10 revelam que frente as leveduras os melhores resultados da CIM foram para os óleos de orégano, cravo e tomilho. Esses dados também foram observados para as bactérias e fungos filamentosos (Tabelas 4 e 8), importante destacar que os valores da CIM dos óleos de orégano, cravo e tomilho para a *C. auris* CDC 811903 foi menor que o do fluconazol (3,9 µg/mL), principalmente se tratando de uma levedura que tem sido reportada como resistente. Lepak *et al.*, 2017 relatou CIM no valor de 2 a 256 µg/mL para fluconazol frente a *C. auris*.

**Tabela 10.** Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais frente às leveduras (em  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para os óleos;  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para fluconazol e % para a clorexidina).

	CRA	ORE	TOM	MEL	MEN	EUC	ALE	FLU	CLO	ETA
<i>C. neofarmans</i> ATCC 90112	6,25	12,5	12,5	12,5	12,5	25	*	15,62	$9,76 \cdot 10^{-4}$	*
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	12,5	3,125	12,5	25	25	25	*	7,81	$2,44 \cdot 10^{-4}$	*
<i>C. auris</i> CDC 811903	1,5625	0,0976	0,7812	6,25	6,25	12,5	25	3,9	$9,76 \cdot 10^{-4}$	*

**Nota:** (\*) não inibiu; (CRA) cravo; (ORE) orégano; (TOM) tomilho; (MEL) melaleuca; (MEN) menta; (EUC) eucalipto; (ALE) alecrim; (FLU) fluconazol; (CLO) clorexidina; (ETA) etanol.

Com relação a concentração fungicida mínima, diferente dos resultados dos fungos filamentosos, vários óleos essenciais apresentaram ação fungicida. Destaque para os óleos de orégano e tomilho que apresentaram ação fungicida frente as leveduras *C. neofarmans* ATCC 90112 e *C. albicans* ATCC 1023 (Tabela 11).

**Tabela 11.** Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais frente às leveduras.

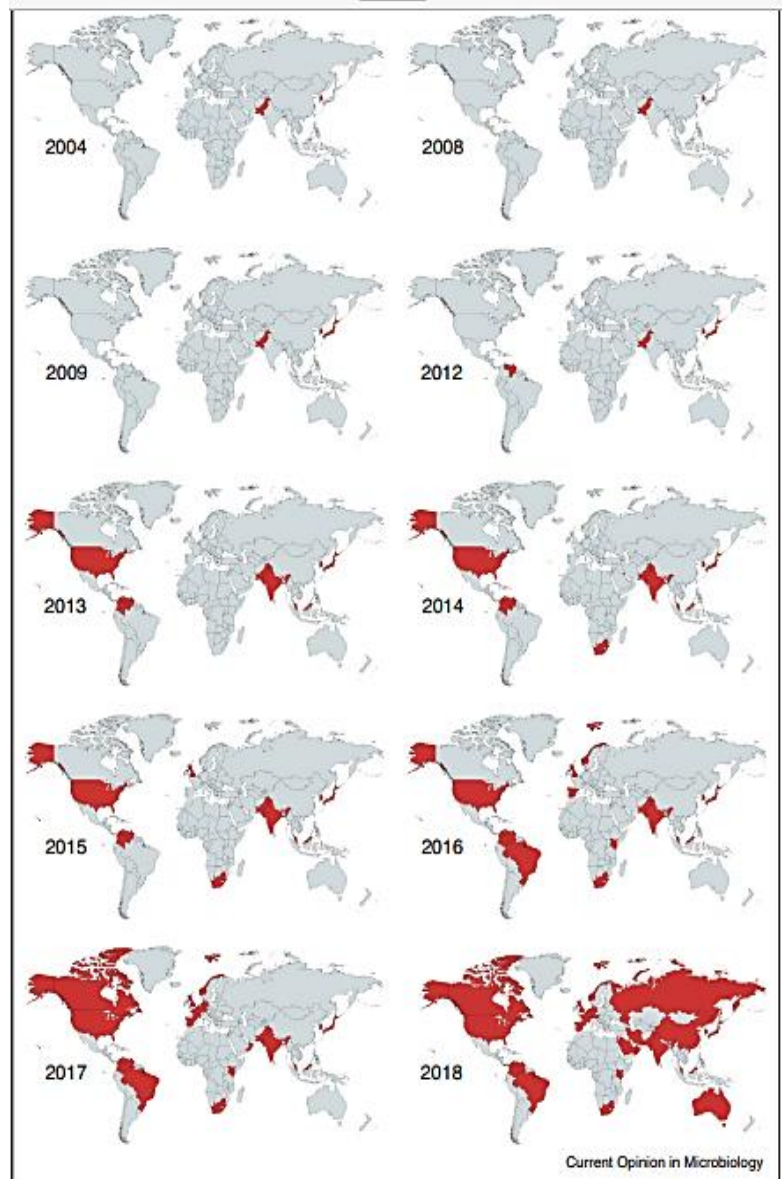
	CRA	ORE	TOM	MEL	MEN	EUC	ALE	FLU	CLO
<i>C. neofarmans</i> ATCC 90112	Fungistático	Fungicida	Fungicida	Fungistático	Fungistático	Fungicida	X	Fungistático	Fungistático
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Fungicida	Fungicida	Fungicida	Fungistático	Fungicida	Fungicida	X	Fungistático	Fungicida
<i>C. auris</i> CDC 811903	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungistático	Fungicida

**Nota:** (X) não realizado; (CRA) cravo; (ORE) orégano; (TOM) tomilho; (MEL) melaleuca; (MEN) menta; (EUC) eucalipto; (ALE) alecrim; (FLU) fluconazol; (CLO) clorexidina.

O óleo essencial de alecrim não inibiu as linhagens de *C. albicans* ATCC 10231 e *C. neofarmans* ATCC 90112.

A *Candida auris* foi descoberta em 2009 no Japão, mas, acredita-se que já existia antes de 2009, erroneamente identificada como *Candida haemulonii*, desde o surgimento causou um surto surgindo em todo o globo (Figura 10) (CHOWDHARY; SHARMA; MEIS, 2017).

**Figura 10.** Linha do tempo mostrando a expansão mundial da detecção de *C. auris*.



**Fonte:** RHODES; Fisher, 2019.

A *C. auris* é facilmente transmissível e é responsável por vários surtos nasocomiais, apresenta alta capacidade de persistir no hospedeiro humano e em superfícies inanimadas (WELSH *et al.*, 2017). A *C. auris* está associada a ambientes de terapia intensiva, especialmente em pacientes com cateter venoso central e cateter urinário de longo prazo apresentando potencial formação de biofilme (ESCANDON *et al.*, 2019). Ela tem sido associada a várias

infecções fúngicas invasivas como pericardite e infecção do trato respiratório e urinário. Apresenta resistência ao fluconazol e outras drogas antifúngicas azólicas. Diante disso, tem sido amplamente reconhecida como resistente a múltiplas drogas (MDR) (KATHURIA *et al.*, 2015; LOCKHART *et al.*, 2017). Embora a maioria dos isolados globais que foram testados quanto a suscetibilidade ao fluconazol tenham sido resistentes, há uma minoria significativa de isolados que são suscetíveis (ARENDRUP *et al.*, 2017). Estudos mais recentes identificaram um número significativo de isolados suscetíveis ao fluconazol isto pode significar que a resistência pode ser perdida ou aparecem novos clones (ABASTABAR *et al.*, 2019; KWON *et al.*, 2019).

O genoma de *C. auris* apresenta mais de 5.000 genes codificadores de proteínas, e expressa vários fatores de virulência (LOCKHART *et al.*, 2017; RHODES *et al.*, 2018). Munoz *et al.*, 2018 realizou RNA seq e descobriu que expansões de famílias inteiras de genes estavam ligados a resistência a drogas e virulência, fato que também foi descrito para *C. albicans*. Mutações em ERG11 foram associadas ao desenvolvimento de resistência ao fluconazol, esse gene foi isolado tanto em *C. auris* como em *C. albicans* (LOCKHART *et al.*, 2017; RHODES *et al.*, 2018). O aumento do número de cópias de ERG11 foi também sugerido como um mecanismo de resistência tanto para *C. albicans* quanto para *C. neoformans* (SELMECKI *et al.*, 2008; SIONOV *et al.*, 2010). Um outro estudo mostrou mutações em Y132F e K143 R, genes também relacionados a resistência ao fluconazol (HEALEY *et al.*, 2018).

A *C. auris* tem sido motivo de grande preocupação, pois é a primeira espécie de levedura que pode desenvolver rapidamente resistência a múltiplas drogas durante o tratamento e pode manter essa resistência por muitas gerações clonais (LOCKHART, 2019).

A resistência a antifúngicos tornou-se um problema clínico sério. Para a prevenção e tratamento de um número crescente de pacientes *imunocomprometidos* faz-se necessário o uso extensivo de drogas antifúngicas e isso leva ao surgimento de linhagens fúngicas resistentes, como exemplo temos a *C. auris*. Denomina-se isso como resistência primária que ocorre devido a uma evolução gradual e especialização de linhagens fúngicas (REVIE *et al.*, 2018; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017).

O *C. neoformans* é um patógeno fúngico que começa seu estilo de vida infeccioso nos pulmões. As infecções começam por inalação de células ou esporos. O *C. neoformans* pode disseminar-se para qualquer órgão do corpo com predileção pelo sistema nervoso central e é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica para causar meningite (DENHAM; BROWN, 2018). *C. albicans*, *A. fumigatus* e *C. neoformans* são os principais agentes causadores das formas de doenças mais ameaçadoras à vida e são responsáveis por mais de 1 milhão de mortes

em todo o mundo (BONGOMIN *et al.*, 2017). O *C. neoformans* é naturalmente resistente a antifúngicos azólicos, exemplo fluconazol e também apresenta resistência à equinocandinas (ALSPAUGH, 2015; COELHO; CASADEVALL, 2016).

### 4.3 SINERGISMO

Analisando os resultados da Tabela 12, observa-se que os valores da CIM das combinações dos óleos de cravo, orégano e tomilho foram bem menores quando comparados aos valores obtidos quando os óleos foram testados isoladamente.

O maior valor da CIM foi da combinação cravo/tomilho de 6,25 µL/mL, mesmo assim sendo a metade do valor da CIM obtido com os óleos testados isoladamente frente a *S. epidermidis* (Tabela 4 – pag. 36).

**Tabela 12.** Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais combinados frente às bactérias (em µL/mL).

	<b>CRA/ORE</b>	<b>CRA/TOM</b>	<b>TOM/ORE</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,781	3,125	1,562
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	3,125	6,25	3,125
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,562	0,781	1,562
<i>E. coli</i> EW239	1,562	3,125	3,125

Nota: (CRA) cravo; (ORE) orégano; (TOM) tomilho.

Quanto a concentração bactericida mínima, a combinação de cravo/orégano apresentou efeito bactericida frente a três das quatro linhagens testadas, tendo efeito bacteriostático apenas frente a *S. aureus*, como pode ser constatado na Tabela 13. A combinação tomilho/orégano apresentou atividade bactericida em duas das quatro linhagens testadas e a combinação cravo/tomilho em apenas uma linhagem.

**Tabela 13.** Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais combinados frente às bactérias.

	<b>CRA/ORE</b>	<b>CRA/TOM</b>	<b>TOM/ORE</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	Bactericida	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida
<i>E. coli</i> EW239	Bactericida	Bactericida	Bactericida

Nota: (CRA) cravo; (ORE) orégano; (TOM) tomilho.

A Tabela 14, mostra que a avaliação do índice de concentração inibitória fracionada, só não apresentou resultado positivo frente a bactéria *E. coli* EW239 (indiferente) na combinação do tomilho/orégano.

**Tabela 14.** Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF).

	<b>CRA/ORE</b>	<b>CRA/TOM</b>	<b>TOM/ORE</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Sinérgica- 0,156	Sinérgica- 0,375	Sinérgica- 0,375
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	Aditiva- 0,75	Aditiva- 1	Aditiva - 0,75
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Sinérgica- 0,375	Sinérgica- 0,125	Sinérgica - 0,375
<i>E. coli</i> EW239	Aditiva- 0,625	Sinérgica- 0,50	Indiferente - 1,25

Nota: (CRA) cravo; (ORE) orégano; (TOM) tomilho.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DO SINERGISMO DA *S. marcescens* ATCC 13880.

A Tabela 15, mostra a eficácia dos óleos de cravo, orégano e tomilho frente a *S. marcescens* ATCC 13880, o que pode ser comprovado com os valores baixos da CIM e da ação bactericida de todos eles.

**Tabela 15.** Determinação da CIM e da CBM dos óleos essenciais frente a *S. marcescens* ATCC 13880 (em  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para os óleos e % para a clorexidina).

	<b>CRAVO</b>	<b>ORÉGANO</b>	<b>TOMILHO</b>	<b>GENTAMICINA</b>	<b>CLOREXIDINA</b>
<b>CIM</b>	1,56	3,125	6,25	0,78	$1,9 \cdot 10^{-4}$
<b>CBM</b>	Bactericida	Bactericida	Bactericida	Bactericida	Bactericida

A avaliação da CIM no sinergismo está sendo mostrada na Tabela 16. Na Tabela 17 temos os valores do ICIF. O valor da CIM para a combinação do cravo e orégano foi o menor entre as três combinações. A CBM apresentou atividade bactericida para todas as combinações.

**Tabela 16.** Determinação da CIM e da CBM dos óleos essenciais combinados frente a *S. marcescens* ATCC 13880 (em  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ).

	<b>CRA/ORE</b>	<b>CRA/TOM</b>	<b>TOM/ORE</b>
<b>CIM</b>	0,78	3,125	1,56
<b>CBM</b>	Bactericida	Bactericida	Bactericida

Nota: (CRA) cravo; (ORE) orégano; (TOM) tomilho.

O ICIF foi melhor para a combinação do cravo com o orégano e tomilho e orégano.

**Tabela 17.** Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) da *S. marcescens* ATCC 13880

	<b>CRA/ORE</b>	<b>CRA/TOM</b>	<b>TOM/ORE</b>
<b>ICIF</b>	ADITIVO (0,75)	INDIFERENTE (2,5)	ADITIVO (0,75)

**Nota:** (CRA) cravo; (ORE) orégano; (TOM) tomilho.

Portanto, os resultados dos testes realizados com a *S. marcescens* mostraram uma boa atividade antibacteriana da combinação dos óleos de cravo e orégano e dessa forma foram incorporados na formulação do sabonete em teste.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VIVO*

A Tabela 18 mostra os pré-valores (logaritmos da contagem de colônias de *S. marcescens* presentes nas mãos dos voluntários antes da higienização), pós-valores (logaritmos da contagem de colônias de *S. marcescens* presentes nas mãos dos voluntários após a higienização); fator de redução logarítmica por voluntário, as médias e os valores do desvio padrão.

O sabonete com os óleos essenciais apresentou o maior valor do fator de redução logarítmica (4,55), enquanto que os outros produtos analisados apresentaram os seguintes valores: base: 3,20, Protex<sup>®</sup> DUOPROTECT: 3,65 e o Riohex<sup>®</sup>2% 4,17.

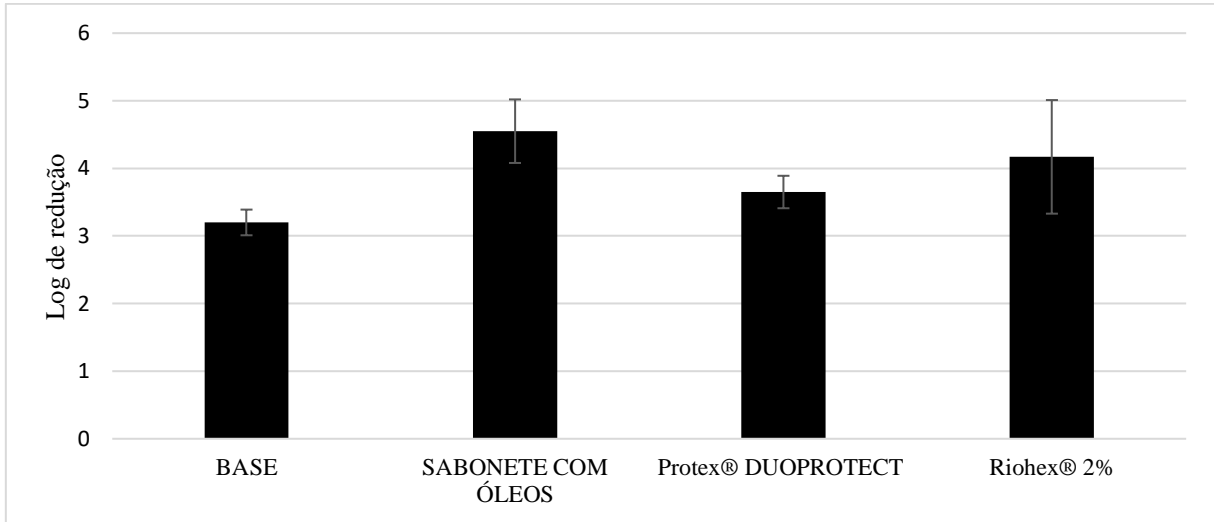
O desvio padrão obtido está dentro do esperado com exceção ao Riohex<sup>®</sup>2% que apresentou um valor acima do considerado aceitável.

**Tabela 18.** Valores dos logaritmos referentes aos pré e pós-valores e o fator de redução logarítmica para cada um dos procedimentos de higienização, as médias desses valores e o desvio padrão.

Participante	BASE			SABONETE COM ÓLEOS			Protex® DUOPROTECT			Riohex®2%		
	Log Pré	Log Pós	Log Redução	Log Pré	Log Pós	Log Redução	Log Pré	Log Pós	Log Redução	Log Pré	Log Pós	Log Redução
1	7,78	4,27	3,50	7,32	2,26	5,06	7,78	3,73	4,05	7,77	3,98	3,80
2	7,78	4,56	3,22	7,57	3,25	4,32	7,78	4,10	3,68	7,77	2,26	5,51
3	7,78	4,78	3,00	7,63	2,59	5,05	7,73	4,29	3,44	7,77	4,44	3,33
4	7,78	4,62	3,16	7,74	3,54	4,20	7,74	4,21	3,53	7,78	3,40	4,38
5	7,78	4,64	3,14	7,78	3,66	4,12	7,75	4,21	3,54	7,78	3,93	3,85
Média	7,78	4,57	<b>3,20</b>	7,61	3,06	<b>4,55</b>	7,76	4,11	<b>3,65</b>	5,69	3,60	<b>4,17</b>
Desvio Padrão	0,00	0,19	<b>0,19</b>	0,18	0,61	<b>0,47</b>	0,02	0,22	<b>0,24</b>	0,01	0,84	<b>0,84</b>

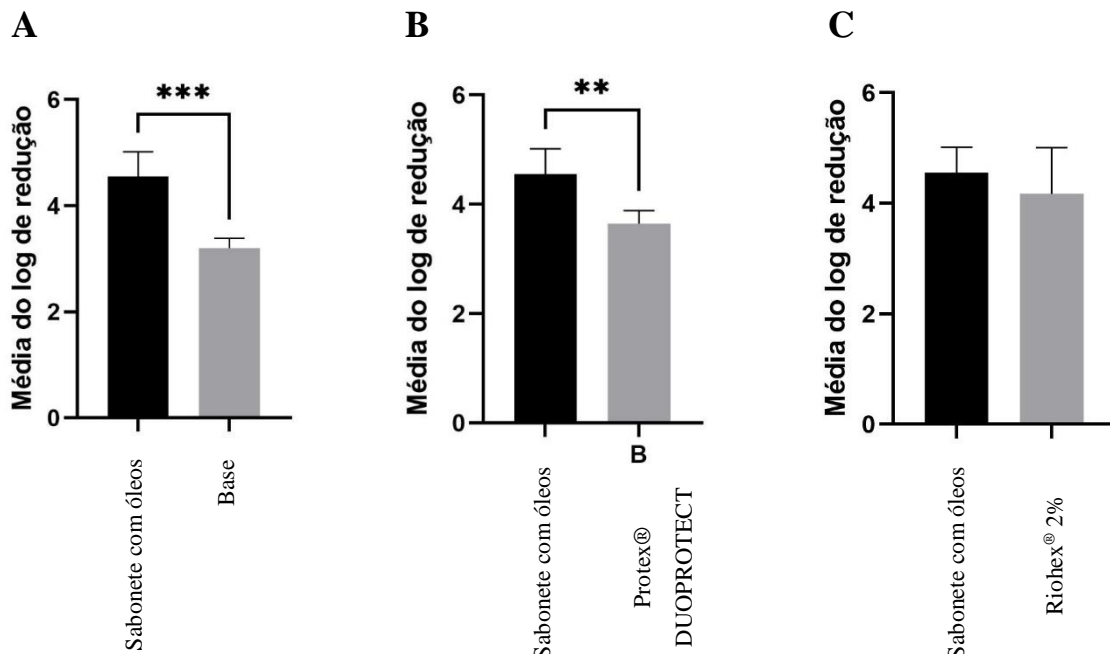
A Figura 11 representa a comparação do fator de redução logarítmica entre os quatro procedimentos de higienização das mãos realizados. Verifica-se que entre os 4 produtos testados, o maior valor do fator de redução logarítmica foi do sabonete com os óleos essenciais.

**Figura 11.** Valores da média do fator de redução logarítmica e o do desvio padrão da base, sabonete com os óleos, Protex® DUOPROTECT e do Riohex®2%.



Quando realizado os testes estatísticos aplicando o teste t, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa do sabonete com os óleos essenciais frente a base ( $p < 0,0003$ ) e frente ao Protex® DUOPROTECT ( $p < 0,0049$ ), comprovando assim o melhor desempenho do sabonete. Quando comparado o sabonete com óleos essenciais com o Riohex®2% não houve diferença estatística (Figura 12), provavelmente devido ao valor alto do desvio padrão apresentado no experimento com o Riohex®2%.

**Figura 12.** Análise comparativa da eficácia do sabonete com óleos essenciais com os controles utilizados. Sabonete com óleos essenciais vs base (A), sabonete com óleos essenciais vs Protex® DUOPROTECT (B) e sabonete com óleos essenciais vs Riohex®2%. Teste t. \*\* $p < 0,0049$ ; \*\*\* $p < 0,0003$ .



Pode-se então concluir, que os dados estatísticos resultantes do teste t realizado, comprovam o melhor desempenho do sabonete com os óleos essenciais quando comparado a base e ao Protex<sup>®</sup> DUOPROTECT. O comparativo com a base comprova que a diferença nos resultados ocorreu devido a adição dos óleos essenciais de cravo e orégano.

A escolha do Protex<sup>®</sup> DUOPROTECT e do Riohex<sup>®</sup>2% foi baseada no fato que esses produtos são utilizados frequentemente para antissepsia das mãos, o primeiro usado pela população em geral e o segundo no segmento dos profissionais de saúde. A formulação do Protex<sup>®</sup> DUOPROTECT, como pode ser observado no item 3.6, é de composição natural sem a presença de composto sintético, o que vem ao encontro dessa tendência de mercado. Os produtos sintéticos podem apresentar maior chance de se tornarem resistentes e ocasionarem reações adversas (GNATTA *et al.*, 2013; HALDEN, 2014) que os produtos à base de componentes naturais. O Riohex<sup>®</sup>2% é um agente antisséptico sintético o qual apresenta resistência frente a alguns micro-organismos (POOLE, 2002; CHAPMAN, 2003; BUXSER, 2021; NDE *et al.*, 2009).

Importante relatar a presença de 4 ingredientes com ação antimicrobiana na composição do Protex<sup>®</sup> DUOPROTECT, limoneno, linalool, extrato de *Camelia sinensis* e óleo de semente de linhaça.

O limoneno é um terpeno encontrado nos óleos essenciais de frutas cítricas (limão, laranja e tangerina). Ele é usado como ativo de sabor e fragrância em sabonetes, perfumes e goma de mascar. Apresenta atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e dificulta a formação de biofilme (GUPTA; JEYAKUMAR, LAWRENCE, 2021; HAN; CHEN, SUN, 2021).

O linalool é um álcool monoterpênico presente em óleos essenciais de muitas plantas, como *Thymus vulgaris*. Ele é usado em produtos farmacêuticos, cosméticos e ativos alimentares. Possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, anticancerígena e antibacteriana (LIU *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2021; HE *et al.*, 2022).

O extrato de *Camellia sinensis* contém polifenóis, polissacarídeos, aminoácidos e vitaminas. Apresenta atividade antibacteriana e antifúngica (GUPTA; KUMAR, 2017; KHAN *et al.*, 2020).

O óleo de semente de linhaça contém compostos fenólicos, ácido fenólico, flavonoides, lignanos e taninos. Apresenta atividade antibacteriana e antifúngica (FADZIR *et al.*, 2018; KEYKHASALAR; TABRIZI, ARDALAN, 2020).

O sabonete com óleos essenciais com a presença apenas do óleo de cravo e orégano, mostrou-se mais eficaz nos resultados do teste *in vivo*. Isso se explica devido a presença do

Eugenol e Carvacrol que são dois compostos com reconhecida ação antimicrobiana. A presença dessas substâncias em altas concentrações, como pode ser comprovado através dos resultados do teste de cromatografia relatado abaixo (Tabela 19), confere aos óleos de cravo e orégano sua forte atividade antimicrobiana. Os resultados dos testes realizados *in vitro*, os quais foram realizados antes do teste *in vivo*, já haviam mostrado a eficácia antimicrobiana desses óleos, principalmente quanto aos resultados frente as linhagens multirresistentes e as isoladas que foram testadas (*E. coli* EW222, *E. coli* EW239, *P. aeruginosa* EW15, *A. fumigatus* LMC 9015.01 e *C. auris* CDC 811.903).

#### 4.6 AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA

A avaliação cromatográfica foi realizada apenas com os óleos de cravo, orégano e tomilho, pois foram esses que apresentaram melhores atividades antibacteriana e antifúngica, portanto os escolhidos para a avaliação sinérgica.

De acordo com a cromatografia, o óleo de cravo apresentou 84,36% de eugenol em sua composição e o orégano 72,63% de carvacrol (Tabela 19).

**Tabela 19.** Resultado da análise por CG-MS dos óleos essenciais de cravo, orégano e tomilho.

Substância identificada	KI	Cravo (%)	Orégano (%)	Tomilho (%)
triciclono	926	-	-	2,42
p-cimeno	1011	-	5,90	24,51
1,8-cineol	1020	-	1,80	1,49
trans-ocimeno	1048	-	2,41	4,49
terpinoleno	1085	-	1,95	5,25
camphor	1120	-	0,62	1,61
neoisotujol	1142	-	-	0,54
neotujol	1150	-	0,97	1,30
terpinen-4-ol	1162	-	0,54	0,91
tujanol <3>	1174	-	0,57	-
timol	1279	-	2,29	49
carvacrol	1287	-	72,63	2,83
eugenol	1336	84,36	-	-
trans-cariofileno	1413	9,33	2,64	-
humuleno	1446	1,46	-	-
óxido de cariofileno	1566	0,93	0,46	0,89

Na literatura científica há descrição que os óleos de orégano e cravo apresentam alta porcentagem de compostos fenólicos, como carvacrol e eugenol respectivamente. A presença

majoritária dos seguintes compostos nos óleos essenciais é diretamente proporcional ao seu efeito antimicrobiano: eugenol, timol, carvacrol, aldeído cinâmico e p-cimeno (SAKKAS; PAPADOPOMLOU, 2017; PUŠKÁROVÁ, 2017). Andrea *et al.*, 2017 realizou um estudo onde testou os óleos de orégano, tomilho, cravo, lavanda, sálvia e arbovitae em 5 linhagens de fungos e 9 linhagens de bactérias, sendo 6 patogênicas. Descreveu em sua conclusão que o óleo de orégano apresentou a maior atividade antifúngica e que orégano e cravo apresentaram forte atividade antibacteriana contra todas as linhagens testadas.

De acordo com a cromatografia realizada com os óleos, verificamos que os artigos citados acima confirmam os resultados da boa atividade antibacteriana e antifúngica que os óleos de cravo e orégano apresentaram (Tabela 19). O óleo de cravo apresentou 84,36% de eugenol em sua composição e o orégano 72,63% de carvacrol.

## 5 CONCLUSÃO

Quanto a atividade antibacteriana, os óleos de cravo, orégano, e tomilho apresentaram os melhores resultados da CIM, sendo mais efetivos que os óleos de eucalipto, menta, alecrim. O óleo de melaleuca não apresentou atividade antibacteriana.

Quanto a atividade antifúngica, os mesmos óleos: cravo, orégano e tomilho apresentaram os melhores resultados da CIM, sendo mais efetivos que os óleos de eucalipto, menta e melaleuca, tanto frente aos fungos filamentosos quanto aos leveduriformes. O óleo de alecrim não apresentou atividade antifúngica.

No teste do sinergismo a combinação dos óleos essenciais que apresentou os melhores resultados foi cravo com orégano, portanto a formulação do sabonete líquido foi elaborada com a presença desses dois óleos essenciais.

Na avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo*, o sabonete com os óleos essenciais foi mais efetivo quando comparado a base e ao Protex<sup>®</sup> DUOPROTECT. Quando comparado ao Riohex<sup>®</sup>2%, não foi observado diferença estatística.

## REFERÊNCIAS

ABASTABAR, Mahdi *et al.* Candida auris otomycosis in Iran and review of recent literature. **Mycoses**, v. 62, n. 2, p. 101-105, 2019.

ADAMS, RP 2007. ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, IL: Allured Pub Corp. fingerprinting of hydrodistilled oil, enriched fractions, and isolated compounds obtained from *Cryptocarya massoy* (Oken) Kosterm. Bark. **Chem Biodivers**, v. 13, p. 66-76, 2007.

ALSPAUGH, J. Andrew. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 55-58, 2015.

ANDREYEVA, I. N.; OGORODNIKOVA, T. I. Pigmentation of *Serratia marcescens* and spectral properties of prodigiosin. **Microbiology**, v. 84, p. 28-33, 2015.

ARDA, Oktay; GÖKSÜGÜR, Nadir; TÜZÜN, Yalçın. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clinics in dermatology**, v. 32, n. 1, p. 3-13, 2014.

ARENDRUP, Maiken Cavling *et al.* Comparison of EUCAST and CLSI reference microdilution MICs of eight antifungal compounds for *Candida auris* and associated tentative epidemiological cutoff values. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. e00485-17, 2017.

BARBOSA, Aldermara Silva *et al.* Diminuição da Susceptibilidade à Clorexidina: revisão Sistemática. **Journal of Infection Control**, v. 8, n. 1, 2019.

BARBOUR, Elie K. *et al.* Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 1-7, 2004.

BHAGWAT, Ashlesha; PADALIA, Unnati. Optimization of prodigiosin biosynthesis by *Serratia marcescens* using unconventional bioresources. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, p. 1-9, 2020.

BONGOMIN, Felix *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases - estimate precision. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

BOUCHER, Helen W. *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009.

BOYCE, John M.; PITTET, Didier. Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 23, n. S12, p. S3-S40, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (PNPCIRAS)**, 2021 a 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Segurança do Paciente em Serviços de Saúde: Higienização das Mãos** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2009. 105p. < Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/seguranca\\_paciente\\_servicos\\_saude\\_higienizacao\\_maos.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/seguranca_paciente_servicos_saude_higienizacao_maos.pdf)>.

BRAZ, Vânia Santos et al. Genotypic diversity and presence of  $\beta$ -lactamase encoding genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian soils. **Applied Soil Ecology**, v. 129, p. 94-97, 2018.

BRUNO, K. F. *et al.* Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A**, v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.

BSI Standard Publication. (2013). Chemical disinfectants and antiseptics- Hygienic handrub Test method and requirements (phase 2/step 2). **BS EN 1500:2013**.

BUXSER, Stephen. Has resistance to chlorhexidine increased among clinically-relevant bacteria? A systematic review of time course and subpopulation data. **PloS one**, v. 16, n. 8, p. e0256336, 2021.

CHAPMAN, John S. Biocide resistance mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 2, p. 133-138, 2003.

CHOWDHARY, Anuradha; SHARMA, Cheshta; MEIS, Jacques F. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLOS pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006290, 2017.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 11th ed. CLSI standard M07. **Wayne, PA**: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd ed. CLSI standard M38. **Wayne, PA**: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4 th ed. CLSI standard M27. **Wayne, PA**: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

COELHO, Carolina; CASADEVALL, Arturo. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. **Cellular microbiology**, v. 18, n. 6, p. 792-799, 2016.

CRUZ, Tatiana Areas *et al.* Antimicrobial and synergistic activity of essential oils facing isolated bacteria from surgical staff's. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 5, 2019.

DENHAM, Steven T.; BROWN, Jessica CS. Mechanisms of pulmonary escape and dissemination by *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 25, 2018.

DENTON, G. W. Chlorhexidine. In: Block, S. S. Disinfection, sterilization, and preservation. 5th ed. Philadelphia: **Lippincott Williams & Wilkins**, 2001. p. 321-336

ESCANDÓN, Patricia et al. Molecular epidemiology of *Candida auris* in Colombia reveals a highly related, countrywide colonization with regional patterns in amphotericin B resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 1, p. 15-21, 2019.

EUROPEAN Centre for Disease Prevention and Control/European Medicines Agency. ECDC/EMA joint technical report: the bacterial challenge: time to react.: **European centre for disease prevention and control & European medicines agency**, Stockholm, Sweden & London, United Kingdom, 2009.

FADZIR, Ummu Afifah *et al.* *Linum usitatissimum* as an antimicrobial agent and a potential natural healer: A review. **Archives of Orofacial Science**, v. 13, n. 2, 2018.

FALAGAS, Matthew E.; KOLETZI, Patra K.; BLIZIOTIS, Ioannis A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of medical microbiology**, v. 55, n. 12, p. 1619-1629, 2006.

FDA – Food and Drug Administration. Safety and Effectiveness of Consumer Antiseptics. Topical Antimicrobial Drug Products for Over-the-Counter Human Use. **Federal Register**, v. 81, n. 172, p. 61106–61130, 2016a. Disponível em: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2016-09-06/pdf/2016-21337.pdf>. Acesso em: 28 dez. 2018.

FERNANDES, Antonio Tadeu; FERNANDES, Maria Olívia Vaz; RIBEIRO FILHO, Nelson. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. In: **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. 2000. p. 1795-1795.

FIORENTINO, Flávia Angélica Másquio. Desenvolvimento e controle de qualidade de formulação cosmética contendo digluconato de clorexidina. 2009. 197 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2009.

FRACAROLLI, Isabela Fernanda Larios; OLIVEIRA, Samuel Andrade de; MARZIALE, Maria Helena Palucci. Colonização bacteriana e resistência antimicrobiana em trabalhadores de saúde: revisão integrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 651-657, dez. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0194201700086>.

FURLAN, João Pedro Rueda; SAVAZZI, Eduardo Angelino; STEHLING, Eliana Guedes. Widespread high-risk clones of multidrug-resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* B2-ST131 and F-ST648 in public aquatic environments. **International journal of antimicrobial agents**, v. 56, n. 1, p. 106040, 2020.

GARCÍA-SALINAS, Sara et al. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1399, 2018.

GNATTA, Juliana Rizzo et al. Comparison of hand hygiene antimicrobial efficacy: *Melaleuca alternifolia* essential oil versus triclosan. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 21, p. 1212-1219, 2013.

GRANATO, P. A. Pathogenic and indigenous microorganisms of humans. **Manual of clinical microbiology**, v. 1, p. 44-54, 2003.

GUO, Fengyu *et al.* Antimicrobial activity and proposed action mechanism of linalool against *Pseudomonas fluorescens*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 562094, 2021.

GUPTA, Divya; KUMAR, Mukesh. Evaluation of *in vitro* antimicrobial potential and GC–MS analysis of *Camellia sinensis* and *Terminalia arjuna*. **Biotechnology Reports**, v. 13, p. 19-25, 2017.

GUPTA, Akshi; JEYAKUMAR, Ebenezer; LAWRENCE, Rubina. Journey of limonene as an antimicrobial agent. **Journal of Pure & Applied Microbiology**, v. 15, n. 3, 2021.

HALDEN, R.U. On the Need and Speed of Regulating Triclosan and Triclocarban in the United States, **Environ Sci Technol** 48(7):3603- 3611, 2014

HAN, Yingjie; CHEN, Wenxue; SUN, Zhichang. Antimicrobial activity and mechanism of limonene against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Safety**, v. 41, n. 5, p. e12918, 2021.

HE, Rongrong *et al.* Antimicrobial mechanism of linalool against *Brochothrix thermosphacta* and its application on chilled beef. **Food Research International**, v. 157, p. 111407, 2022.

HEALEY, Kelley R. et al. Limited ERG11 mutations identified in isolates of *Candida auris* directly contribute to reduced azole susceptibility. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. 10.1128/aac. 01427-18, 2018.

KAMPF, Günter; KRAMER, Axel. Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 863-893, 2004.

KARPANEN, Tarja J. et al. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 1031-1036, 2008.

KATHURIA, Shallu et al. Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1823-1830, 2015.

KEYKHASALAR, Roghaye; TABRIZI, Masoud Homayouni; ARDALAN, Pouran. Antioxidant property and bactericidal activity of *Linum usitatissimum* seed essential oil nanoemulsion (LSEO-NE) on *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Infection**, v. 7, n. 2, 2020.

KHAN, Abdulhameed *et al.* Biosynthesis and antibacterial activity of MgO-NPs produced from *Camellia-sinensis* leaves extract. **Materials Research Express**, v. 8, n. 1, p. 015402, 2020.

KIFFER, Carlos RV et al. Exploratory model for estimating occupation-day costs associated to Hospital Related Infections based on data from national prevalence project: IRAS Brasil Project. **Journal of Infection Control**, v. 4, n. 1, p. 30-33, 2015.

KWON, Yong Jun *et al.* Candida auris clinical isolates from South Korea: identification, antifungal susceptibility, and genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 4, p. e01624-18, 2019.

KRAMER, Axel et al. Limited efficacy of alcohol-based hand gels. **The Lancet**, v. 359, n. 9316, p. 1489-1490, 2002.

LEPAK, Alexander J. *et al.* Pharmacodynamic optimization for treatment of invasive Candida auris infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. e00791-17, 2017.

LANTERNIER, Fanny *et al.*, Deep dermatophytosis and inherited CARD9 deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 18, p. 1704-1714, 2013.

LOCKHART, Shawn R. et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant Candida auris on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 134-140, 2017.

LOCKHART, Shawn R. Candida auris and multidrug resistance: defining the new normal. **Fungal Genetics and Biology**, v. 131, p. 103243, 2019.

LIU, Xue *et al.* Antibacterial activity and mechanism of linalool against Pseudomonas aeruginosa. **Microbial Pathogenesis**, v. 141, p. 103980, 2020.

MACDONALD, A. et al. Performance feedback of hand hygiene, using alcohol gel as the skin decontaminant, reduces the number of inpatients newly affected by MRSA and antibiotic costs. **Journal of hospital infection**, v. 56, n. 1, p. 56-63, 2004.

MAGIORAKOS, A.-P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MAN, Adrian *et al.* Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study. **Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 15, 2019.

MUÑOZ, José F. *et al.* Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in Candida auris and related emerging species. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 5346, 2018.

NDE, Chantal W. *et al.* Global transcriptomic response of Pseudomonas aeruginosa to chlorhexidine diacetate. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 21, p. 8406-8415, 2009.

POOLE, Keith. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **Journal of applied microbiology**, v. 92, n. s1, p. 55S-64S, 2002.

PUŠKÁROVÁ, Andrea *et al.* The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

REVIE, Nicole M. *et al.* Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 70-76, 2018.

RHODES, Johanna *et al.* Genomic epidemiology of the UK outbreak of the emerging human fungal pathogen *Candida auris*. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2018.

ROBBINS, Nicole; CAPLAN, Tavia; COWEN, Leah E. Molecular evolution of antifungal drug resistance. **Annual review of microbiology**, v. 71, p. 753-775, 2017.

SAM, Qi Hui *et al.* Immunomodulation as therapy for fungal infection: are we closer? **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1612, 2018.

SAKKAS, Hercules; PAPADOPOULOU, Chrissanthy. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. **Journal of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 429-438, 28 mar. 2017. Korean Society for Microbiology and Biotechnology.

SANTOS, Neusa de Queiroz. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 13, p. 64-70, 2004.

SCHERER, R. *et al.* Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 11, p. 442-449, 2009.

SELMECKI, Anna *et al.* An isochromosome confers drug resistance *in vivo* by amplification of two genes, ERG11 and TAC1. **Molecular microbiology**, v. 68, n. 3, p. 624-641, 2008.

DA SILVA, Lusinalva Leonardo *et al.* Atividades terapêuticas do óleo essencial de melaleuca (*melaleuca alternifolia*) Uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of health review**, v. 2, n. 6, p. 6011-6021, 2019.

SIONOV, Edward *et al.* *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000848, 2010.

SIVIERI, Katia *et al.* Microbiota da pele: novos desafios. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 50, n. 1, p. 93-112, 2021.

SNYDER, Elizabeth Hodges; O'CONNOR, George A. Risk assessment of land-applied biosolids-borne triclocarban (TCC). **Science of the total environment**, v. 442, p. 437-444, 2013.

STORR, Julie *et al.* Core components for effective infection prevention and control programmes: new WHO evidence-based recommendations. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 6, p. 1-18, 2017.

TARIQ, Saika *et al.* A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 134, p. 103580, 2019.

TOHOLKA, Ryan; NIXON, Rosemary. Allergic contact dermatitis to chlorhexidine. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 54, n. 4, p. 303-306, 2013.

TRAMPUZ, Andrej; WIDMER, Andreas F. Hand hygiene: a frequently missed lifesaving opportunity during patient care. In: **Mayo clinic proceedings**. Elsevier, 2004. p. 109-116.

VALDIVIESO-UGARTE, Magdalena *et al.* Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2786, 2019.

WEATHERLY, Lisa M.; GOSSE, Julie A. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 20, n. 8, p. 447-469, 2017.

WELSH, Rory M. *et al.* Survival, persistence, and isolation of the emerging multidrug-resistant pathogenic yeast *Candida auris* on a plastic health care surface. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2996-3005, 2017.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) **Global Patient Safety Challenge 2005-2006: Clean care is safer care**. Geneva: WHO Press, 2006. 205 p.

WIŃSKA, Katarzyna *et al.* Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2130, 2019.

YAP, Polly Soo Xi *et al.* Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The open microbiology journal**, v. 8, p. 6, 2014.

YUEH, Mei-Fei; TUKEY, Robert H. Triclosan: a widespread environmental toxicant with many biological effects. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 56, p. 251-272, 2016.

ZHENG, Hailin *et al.* Whole-genome resequencing of *Trichophyton rubrum* provides insights into population differentiation and drug resistance. **Mycopathologia**, v. 185, p. 103-112, 2020.

## ANEXO A – Procedimento padrão de lavagem de mãos.

Machine Translated by Google

BS EN 1500:2013  
EN 1500:2013 (E)

### Anexo A (normativo)

#### Procedimento padrão de esfregar as mãos

Siga os passos 1 a 6



Passo 1  
palma a palma



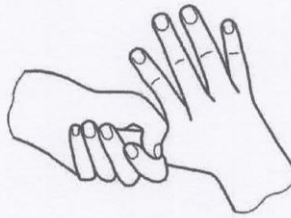
Passo 2  
Palma direita sobre o dorso esquerdo e palma esquerda sobre o dorso direito (cinco vezes)



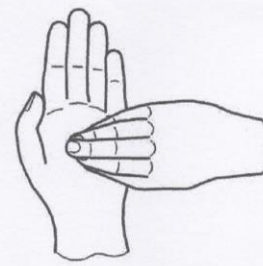
etapa 3  
Palma a palma com os dedos entrelaçados (cinco vezes)



Passo 4  
Dorso dos dedos nas palmas opostas com os dedos entrelaçados (cinco vezes)



Passo 5  
Fricção rotacional do polegar direito na palma da mão esquerda e vice-versa (cinco vezes)



Passo 6  
Fricção rotacional, para trás e para frente com os dedos da mão direita entrelaçados na palma da mão esquerda e vice-versa (cinco vezes)

**ANEXO B – Esclarecimentos ao sujeito da pesquisa.****ANEXO B****“ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA”**

**1. NOME DA PESQUISA: “ELABORAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO ANTIMICROBIANA DE AMPLO ESPECTRO CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS PARA HIGIENIZAÇÃO DE MÃOS”**

**2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:**  
Profa Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto

**3. PATROCINADOR QUE APÓIA FINANCEIRAMENTE A PESQUISA:**

Unidade de Biotecnologia (UNAERP)

**4. DESCRIÇÃO DAS INFORMAÇÕES QUE DEVERÃO SER, OBRIGATORIAMENTE, PRESTADAS AOS PACIENTES (SUJEITOS DA PESQUISA)**

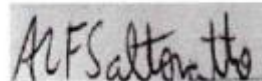
1. A justificativa e o objetivo da pesquisa.
2. Os procedimentos que serão utilizados e o seu propósito, bem como a identificação dos procedimentos que são experimentais.
3. Os desconfortos e riscos existentes para o paciente (sujeito da pesquisa).
4. Os benefícios esperados da pesquisa.
5. Em havendo despesas para o paciente, decorrente de sua participação na pesquisa, informar a ele a forma de como se dará a cobertura dessa despesa, bem como O NOME DA EMPRESA QUE SE RESPONSABILIZOU PELO RESSARCIMENTO.
6. A forma de acompanhamento e da assistência que será dada ao paciente, bem como aos seus responsáveis, se necessário, no caso de menores ou incapazes.
7. A forma de indenização ao paciente, diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, BEM COMO O NOME DA EMPRESA QUE SE RESPONSABILIZOU POR ESSA INDENIZAÇÃO.

**5. AS INFORMAÇÕES PERTINENTES ÀS QUESTÕES ANTERIORMENTE RELACIONADAS, DEVERÃO SER REDIGIDAS, NO CAMPO ABAIXO, RESERVADO PARA ESTE FIM, EM TERMOS SIMPLES E CONHECIDOS PELOS SUJEITOS DA PESQUISA, DE FORMA A LHEIS PERMITIR ENTENDER, COM CLAREZA E EXATIDÃO, AS RAZOES DA PESQUISA, SEUS RISCOS E**

BENEFÍCIOS, E DECIDIR, LIVREMENTE, QUANTO A SUA ANUÊNCIA OU NÃO EM PARTICIPAR DO PROJETO.

Este trabalho de pesquisa tem a finalidade de desenvolver uma formulação de um sabonete líquido a base de óleos essenciais de plantas para higienização das mãos que apresenta amplo espectro antimicrobiano. Você participará de uma aula expositiva e prática para aprendizado da técnica correta de lavagem de mãos. Todo material e o procedimento será supervisionado pela pesquisadora Ana Paula Merino para minimizar qualquer risco ao participante, que pode a qualquer momento solicitar maiores detalhes sobre o projeto de pesquisa e tem liberdade para desistir de participar do projeto. O procedimento consistirá na aplicação de uma cultura de bactérias nos dedos do participante, a seguir este utilizará o sabonete formulado para a lavagem das mãos. A seguir as mãos serão imersas em meio de cultura limpo para posterior contagem do número de colônias de bactérias para comprovação da eficácia do produto. O mesmo procedimento deverá ser repetido com a formulação do sabonete sem a presença dos óleos essenciais das plantas (base) e com o produto utilizado normalmente em centro cirúrgico, a clorexidina (como controle). Eventualmente o participante pode sentir uma coceira devido a presença dos óleos essenciais no sabonete, mas os óleos não apresentam toxicidade e são extraídos de plantas comestíveis utilizadas como temperos. Não existe nenhum risco de contaminação bacteriana, pois além da bactéria utilizada não ser patogênica, no final do processo será utilizada a substância padrão com comprovada atividade anti-séptica, a clorexidina. O participante tem o direito de retirar a sua participação da pesquisa a qualquer momento, ou caso possa haver alguma reação adversa ou alérgica ao produto. Assim esta pesquisa contribuirá para o desenvolvimento de uma formulação de amplo espectro antimicrobiano composto de óleos de plantas a fim de a resistência bacteriana aos produtos químicos utilizados atualmente.

Ribeirão Preto, de 2022



Pesquisadora responsável: Profª. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto

Mestranda: Ana Paula Merino Cruz

**ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido.**

**ANEXO C**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu \_\_\_\_\_,  
abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “ ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “**ELABORAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO ANTIMICROBIANA DE AMPLO ESPECTRO CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS PARA HIGIENIZAÇÃO DE MÃOS**” que tem como pesquisador responsável o(a) Profª. Drª. Ana Lúcia Fachin Saltoratto, portadora do RG: 22.236.849-4, residente Av Costabile Romano, 280, apto 801 Bairro Ribeirania, Tel: (16)3603.6728, especialmente no que diz respeito ao objetivo de pesquisa aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e aos benefícios, a forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- 1) A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;
- 2) A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento;
- 3) A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade;
- 4) O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que possa afetar a minha vontade de continuar nele participando;
- 5) O compromisso de que serei devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa;
- 6) O ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da minha participação no projeto vai ser promovido por recursos adquiridos pela pesquisadora.
- 7) Que o ressarcimento de eventuais despesas, bem como indenização, a título de cobertura material, para reparação de danos imediatos ou tardios, decorrentes de

minha participação na pesquisa, serão feitos pela pesquisadora; não cabendo ao a Universidade de Ribeirão Preto, qualquer responsabilidade quantos aos referidos pagamentos.

- 8) A garantia de suspender a participação do voluntario na pesquisa em qualquer momento ou por acaso a formulação possa provocar alguma reação alérgica.
- 9) Os procedimentos de pesquisa seguem o que foi estabelecido nas resoluções 466 (2012) e 510(2016) do CNS e que os participantes receberão a assistência conforme estabelecido nessas resoluções.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Voluntário

-----  
Assinatura da responsável da pesquisa  
PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ANA LÚCIA FACHIN SALTORATTO  
Av Costabile Romano, 280, apto 801 Bairro Ribeirania – Ribeirão Preto/SP  
CEP: 14055-320  
CPF: 178.612.668.00  
RG: 22.236.849-4  
Email: [afachin@unaerp.br](mailto:afachin@unaerp.br)

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Mestranda:  
Ana Paula Merino Cruz  
Av: Ubirajara de Souza Roxo, sem número.  
Condomínio Bosque das Colinas, casa 64  
CEP: 14110-000-Bairro: Royal Park  
Ribeirão Preto -SP-  
CPF: 247375458-64-RG: 18659252-8  
E-mail: [ana.pacruz@sou.unaerp.edu.br](mailto:ana.pacruz@sou.unaerp.edu.br)