



**FAPAC - FACULDADE PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS
INSTITUTO TOCANTINENSE PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS PORTO LTDA
CURSO DE MEDICINA**

**BEATRIZ MOREIRA MOTTA DE FREITAS
FERNANDA ARAÚJO MARIN**

**AÇÃO ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Melaleuca alternifolia* SOB
Streptococcus pyogenes, CAUSADORA DA ERISPELA**

**PORTO NACIONAL-TO
2020**

**BEATRIZ MOREIRA MOTTA DE FREITAS
FERNANDA ARAÚJO MARIN**

**AÇÃO ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Melaleuca alternifolia* SOB
Streptococcus pyogenes, CAUSADORA DA ERISPELA**

Projeto de pesquisa submetido ao Curso de Medicina da FAPAC - Faculdade Presidente Antônio Carlos, ITPAC Porto Nacional, como requisito parcial para aprovação da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso I.

Orientador(a): Ma. Taynara Augusta Fernandes

Co-orientador: Dr. Marcus Vinícius Moreira Barbosa

**PORTO NACIONAL-TO
2020**

**BEATRIZ MOREIRA MOTTA DE FREITAS
FERNANDA ARAÚJO MARIN**

**AÇÃO ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Melaleuca alternifolia* SOB
Streptococcus pyogenes, CAUSADORA DA ERISPELA**

Projeto de pesquisa submetido ao Curso de Medicina da FAPAC- Faculdade Presidente Antônio Carlos ITPAC Porto Nacional, como requisito parcial para aprovação da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso I.

Aprovado em: ____/____/____

Professor: (Taynara Augusta Fernandes)
Instituto Presidente Antônio Carlos

Professor: (Inserir o nome do Examinador 01)
Instituto Presidente Antônio Carlos

Professor: (Inserir o nome do Examinador 02)
Instituto Presidente Antônio Carlos

**PORTO NACIONAL-TO
2020**

RESUMO

Introdução: a Erisipela é uma infecção cutânea que gera uma condição inflamatória, é uma importante causa de morbidade e internações, com manifestações clínicas características e associadas a bactéria *Streptococcus pyogenes*, acometendo com maior frequência os membros inferiores. A bactéria adentra o organismo, geralmente, por portas de entrada na pele, como por exemplo, ferimentos cutâneos. Indivíduos imunocomprometidos, obesos, ou aqueles com problemas de circulação estão mais susceptíveis a essa infecção. Recentemente diferentes países têm investido seus recursos para pesquisa de medicamentos naturais para tratamento de doenças.

Objetivo: verificar a ação antibacteriana do óleo essencial da planta *Melaleuca* sob bactéria *Streptococcus pyogenes*, principal bactéria causadora da Erisipela.

Metodologia: o teste será realizado por meio de ensaios *in vitro*. **Resultado esperado:** espera-se que o óleo essencial da planta *Melaleuca* tenha efetividade bacteriostática na bactéria *Streptococcus pyogenes*.

Palavras-chave: Bacteriostática. Erisipela. *Streptococcus pyogenes*.

ABSTRACT

Introduction: Erysipelas is a skin infection that generates an inflammatory condition, it is an important cause of morbidity and hospitalizations, with characteristic and clinical manifestations associated with the bacterium *Streptococcus pyogenes*, affecting the lower limbs more frequently. The bacteria enter the organism, generally, through skin entrance doors, such as, skin wounds. Immunocompromised, obese, or impaired circulation individuals are more susceptible to this infection. Recently, different countries have invested their resources in researching natural medicines to treat diseases. **Aim:** to verify the antibacterial action of the essential oil of the Melaleuca plant under *Streptococcus pyogenes*, which is the main bacteria that causes Erysipelas. **Methodology:** the test will be carried out through *in vitro* tests. **Expected result:** it is expected that the essential oil of the Melaleuca plant have bacteriostatic effectiveness in the *Streptococcus pyogenes*.

Keywords: Bacteriostatic. Erysipelas. *Streptococcus pyogenes*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	07
1.1	PROBLEMA DA PESQUISA.....	07
1.2	HIPÓTESE.....	08
1.3	JUSTIFICATIVA.....	08
2	OBJETIVOS.....	09
2.1	OBJETIVO GERAL.....	09
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	09
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
3.1	ERISPELA.....	10
3.2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	11
3.3	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	14
4	METODOLOGIA.....	17
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	17
4.2	LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	17
4.3	POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	17
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	17
4.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	17
4.6	VARIÁVEIS.....	17
4.7	COLETA, APLICAÇÃO, ANÁLISE E APRESENTAÇÃO DE DADOS.....	17
5	DELINIAMENTO DA PESQUISA.....	18
6	ASPECTOS ÉTICOS.....	19
6.1	RISCOS.....	19
6.2	BENEFÍCIOS.....	19
6.3	CRITÉRIOS PARA SUSPENDER OU ENCERRAR A PESQUISA.....	19
7	DESFECHO.....	20
7.1	DESFECHO PRIMÁRIO.....	20
7.2	DESFECHO SECUNDÁRIO.....	20
8	CRONOGRAMA.....	21

9	ORÇAMENTO.....	22
	REFERÊNCIAS.....	23
	APÊNDICE A – TERMO DE COMPROMISSO SOBRE O INÍCIO DA PESQUISA – DECLARAÇÃO ORIENTADOR	26
	APÊNDICE B – TERMO DE COMPROMISSO DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE.....	28

1 INTRODUÇÃO

A erisipela é uma infecção cutânea aguda de etiologia essencialmente estreptocócica, que atinge a derme e o panículo adiposo da pele, com grande envolvimento dos vasos linfáticos. É uma celulite superficial, que se caracteriza por placas eritematosas acompanhadas de dor, edema, febre, anorexia, calafrios, leucocitose e outros sintomas gerais. Tal patologia, acomete principalmente os membros inferiores, seguidos da face e membros superiores (SILVA *et al.*, 2013).

Habitualmente, a principal porta de entrada da bactéria *Streptococcus pyogenes* (principal causadora da erisipela), é através de ferimentos cutâneos mal higienizados, úlceras venosas crônicas, traumas, micoses superficiais e picadas de insetos. Por meio desta porta de entrada, bactérias penetram na pele, atingindo as camadas cutâneas inferiores e se espalhando facilmente e com muita velocidade. Pessoas com baixa condição imunológica, diabéticos, obesos e com má circulação estão mais susceptíveis a contrair a infecção (SBD, 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população mundial utilizam a medicina alternativa, principalmente medicamentos fitoterápicos, para suprir a ausência de atendimento médico primário (ELIZABETSKY, 1997). Nesse sentido, o principal produto da *Melaleuca alternifolia*, o óleo essencial (TTO – *Tea Tree Oil*), possui uma grande importância medicinal por ter comprovada ação bactericida e antifúngica contra diversos patógenos humanos, sendo utilizado em formulações tópicas (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

Atualmente, o tratamento com óleo essencial é empregado como agente antimicrobiano ou preventivo em escala farmacêutica ou cosmética e a indicação vai desde a utilização em lesões, queimaduras, picadas de inseto, gel para espinhas, cremes vaginais, cremes para a pele até dentifrícios (COX; MANN; MARKHAM, 2001).

1.1 PROBLEMA DE PESQUISA

Avaliar se uso do óleo essencial da planta *Melaleuca alternifolia* é efetivo no controle *in vitro* de *Streptococcus pyogenes*, a bactéria causadora de erisipela.

1.2 HIPÓTESE

O óleo essencial da planta *Melaleuca alternifolia* apresenta propriedades bactericidas e bacteriostáticas, controlando o crescimento *in vitro* de *Streptococcus pyogenes*.

1.3 JUSTIFICATIVA

Devido à alta incidência dos casos de erisipela no estado de Tocantins, a baixa adesão aos tratamentos existentes e aos vários benefícios que os óleos essenciais possuem sobre a pele, desenvolveu-se essa pesquisa, a fim de obter maior adesão terapêutica, com tratamento eficaz e de fácil acesso à população, de modo a atingir todos os níveis sociais.

Tal pesquisa, é de suma importância, visto que o uso de especiarias, principalmente os óleos essenciais já eram utilizados no tratamento de doenças cutâneas desde antigamente e trouxeram bons resultados. Além disso, é necessário alertar à população sobre medidas preventivas e buscar criar modalidades terapêuticas de fácil acesso a respeito da doença. Bem como, evitar gastos do governo com medicamentos de alto custo e de pouca eficácia e não demandar tantos recursos da saúde no tratamento hospitalar, sendo que com as medidas preventivas adequadas e adesão ao tratamento, é possível ter efetividade e resolução do diagnóstico em âmbito domiciliar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar propriedade antibacteriana do óleo essencial da *Melaleuca altermifolia* sob *Streptococcus pyogenes*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar cultivo *in vitro* do microrganismo a ser estudado;

Efetuar teste de sensibilidade da bactéria *Streptococcus Pyogenes* ao óleo essencial da *Melaleuca altermifolia*;

Avaliar a ação de diferentes concentrações do óleo essencial sob o microrganismo em questão.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ERISPELA

A Erisipela é uma doença que causa a infecção da pele, podendo atingir principalmente a derme, hipoderme, e os tecidos celulares subcutâneos. Vale lembrar que a pele, de acordo com a Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD, 2017) é composta por três camadas; Epiderme, Derme e Hipoderme. Sendo a Epiderme caracterizada por ser a camada mais externa da pele, tem como principal função, ser a barreira protetora do corpo. A Derme contém todos os elementos fundamentais para constituir as funções da pele, tais como artérias, veias, nervos, terminações nervosas, folículo piloso, glândula sebácea, glândula sudorípara, músculo eretor do pelo, ou seja, apresenta papel importante na produção de pelos (como auxílio para a regulação térmica), hidratação, nutrição, sensibilidade e termorregulação. A Hipoderme é um importante reservatório de energia e de gordura, protegendo também de choques mecânicos. Essa condição inflamatória é uma infecção dermo hipodérmica aguda, sem aspecto necrosante e geralmente causada por *Streptococcus pyogenes*, uma bactéria potencialmente patogênica, gram positiva, que além da erisipela pode causar outras doenças, como faringite, escarlatina, celulite e impetigo (BERNARDES *et al.*, 2002)

Erisipela representa uma forma superficial da celulite, atinge também o plexo linfático e a gordura subcutânea. É caracterizada por placas eritematosas acompanhadas de dor e edema, com bordos elevados, pode ser que dessas placas faixas eritematosas apresente lifagite, que é a origem de faixas eritematosas ao longo dos trajetos dos vasos linfáticos. Além da lesão cutânea, o paciente pode apresentar como sintomas gerais febre, calafrios e anorexia, e também leucocitose no hemograma devido ao quadro inflamatório. A transmissão é feita através da penetração do estreptococo na pele por lesões de descontinuidade na epiderme, funcionando como “porta de entrada” para o vetor, os membros inferiores são as regiões corporais mais atingidas. Dermatomicoses interdigitais e Úlceras de perna podem funcionar como “porta de entrada” nos membros inferiores. Os quadros de celulite e erisipela representam uma importante causa de morbidade e internações hospitalares, entretanto a celulite denota uma inflamação mais profunda e sem obrigatoriedade de uma causa infecciosa. Como semelhança no quadro clínico e sintomático das doenças, pode apresentar febre, comprometimento do estado

geral, bacteremia e abscessos locais. Mesmo que a maioria dessas condições estejam mais relacionadas com o *S. pyogenes* (FICA CUBILLOS, 2003).

A apresentação clínica da erisipela é característica do *Streptococcus pyogenes*, sendo então, menos frequente com estreptococos dos grupos B, C e G. Com linfedema e lesões cutâneas locais, importantes fatores de risco. Elevação da antistreptolisina O é indicativa de infecção estreptocócica, mas só é observada em 40% dos casos. O tratamento pode ser feito com o uso de Penicilina, caso o paciente apresente alguma intolerância ao medicamento, pode substituí-lo pela Eritromicina. Associando com repouso, e elevação do membro afetado, e tratamento do fator desencadeante. Em alguns casos, onde a doença tem mais tempo de evolução e maior gravidade, pode ser necessária a abordagem cirúrgica, com drenagem e remoção das áreas mais afetadas, geralmente necróticas e com secreção purulenta. (FICA CUBILLOS, 2003).

O diagnóstico é essencialmente clínico, entretanto, em alguns casos, pode-se recorrer à biópsia e exames laboratoriais. Não tem preferência de faixa etária, mas o pico é entre 60 e 80 anos, depois dos membros inferiores, os locais mais acometidos são: face e membros superiores, o sexo feminino é mais acometido, e na maioria dos casos o paciente tem uma porta de entrada bem definida, como por exemplo: traumas, úlceras, picadas de insetos, feridas não tratadas de maneira adequada ou micoses superficiais. As complicações mais comuns são: erisipela bolhosa necrotizante, tromboflebite superficial, abscesso e tromboflebite profunda (BERNARDES *et al.*, 2002).

3.2 *Streptococcus pyogenes*

O agente etiológico mais comum da erisipela é o *Streptococcus pyogenes* ou estreptococo beta-hemolítico, que é uma bactéria gram-positiva do grupo A de Lancefield pertencente à família *Streptococcaceae*. (SCALABRIN *et al.*, 2003). A espécie *Streptococcus Pyogenes* caracteriza-se por bactérias anaeróbias facultativas com catalase-negativa. As células têm a forma de cocos menores que 2,0 micrometros de diâmetro e geralmente apresentam-se agrupadas em pares ou cadeias. Reproduzem-se a uma temperatura de 37°C e são inibidos por altas concentrações de glicose. A estrutura da parede celular dos estreptococos do grupo A é composta de unidades repetidas de N-

acetil glicosamina e ácido N-acetil murâmico (peptidoglicano padrão). Em cultura de agar sangue causam beta-hemólise, halo claro a volta de suas colônias de hemólise.

Devido a sua diversidade, a classificação desses microrganismos exige diferentes processos de identificação laboratorial, sendo eles: padrão hemolítico (hemólise β - completa, α - parcial ou γ -sem hemólise), composição antigênica (classificação de Lancefield) e propriedades bioquímicas (SANTOS, 1999). O padrão hemolítico é usado para distinguir-se os *Streptococcus* de acordo com a hemólise de cada espécie, podendo denominar-se: **Alfa-hemólise (α)**: é caracterizada por uma hemólise parcial, associada com a perda parcial de hemoglobina pelas hemácias, ocorrendo uma zona cinza-esverdeada no meio de cultura ao redor da colônia. *Streptococcus pneumoniae* caracteriza-se por produzir este tipo de hemólise.

Beta-hemólise (β): é caracterizada pela lise completa das hemácias que rodeiam a colônia, ocorrendo uma zona transparente (zona de lise total) ao redor da colônia. Os estreptococos com esta característica são denominados beta-hemolíticos (*Streptococcus pyogenes*). **Gama-hemólise (γ)**: é caracterizada pela ausência de hemólise (*Streptococcus agalactiae*) Cepas desses microrganismos não hemolíticos, ou d-hemolíticos, não causam modificação no meio de ágar sangue de carneiro (ANVISA, 2008). O critério de Lancefield é utilizado para classificação dos estreptococos, onde esses são classificados de acordo com a característica antigênica de polissacarídeos da parede celular, sendo divididos em 21 grupos identificados por letras que vão de A a H e de K a T (PELCZAR JUNIOR; CHAN; KRIEG, 2005).

O *S. pyogenes* é reconhecido mundialmente como uma espécie bacteriana que está frequentemente associada a infecções primárias da faringe, amígdalas, infecções cutâneas como erisipela, impetigo contagioso e dos tecidos moles como endocardite e meningite. Tal agente patogênico pode causar patologias mais graves, mediadas por toxinas, que é o caso da escarlatina e síndrome do choque tóxico. Além disso, a infecções provocadas por *S. pyogenes* podem causar sequelas que incluem a febre reumática, glomerulonefrite e eritema nodoso. Além disso, o *Streptococcus* beta-hemolítico do grupo A possui vários fatores de virulência (FV), que permitem desencadear grande número de infecções. Tais fatores são a proteína M, o ácido lipoteicóico, enzimas e toxinas (SILVA *et al.*, 2016).

A proteína M é um dos principais FV que torna o *Streptococcus pyogenes* um microrganismo muito perigoso e com uma taxa de mortalidade e morbidade considerável. Essa proteína é de superfície, constituída por um grupo polissacárido, uma região conservada e uma região hipervariável, que lhe confere um elevado grau de especificidade. Possui características que conferem resistência ao calor e a pH ácido, também é responsável por promover a fixação às células epiteliais humanas, aumentando assim a resistência à fagocitose (CRISPIM; LACERDA, 2014).

O ácido lipoteicoico é o principal constituinte das fímbrias do *S. pyogenes*. As fímbrias são apêndices delgados, em formato de pelos que são projetados para parte externa da parede celular e possui a função de adesão da bactéria à célula do epitélio do hospedeiro, posteriormente ocorrendo a passagem do material genético. Esse mecanismo é importante para início da colonização do patógeno e considerado um fator de virulência. O *Streptococcus pyogenes* produz uma ampla variedade de substâncias extracelulares, principalmente proteínas com ação tóxica, enzimática ou com outras atividades biológicas. Tais produtos, comumente estimulam a formação de anticorpos específicos durante a infecção; anticorpos esses utilizados para testes sorológicos. A toxina que mais contribui para a virulência do estreptococo é a toxina eritrogênica que pode produzir três tipos de exotoxinas pirogênicas (SANTOS, 1999).

A transmissão desse patógeno em algumas doenças ocorre por gotículas transmitidas no ar como no caso da faringite. Já nas infecções cutâneas é necessário existir uma lesão prévia do epitélio para que ocorra a colonização da bactéria. Segundo Trell *et al.* (2019) o diagnóstico no caso da erisipela é clínico e não existe um procedimento de amostragem bacteriológica estabelecido para ajudar os médicos a determinar a etiologia das erisipelas.

Os microrganismos deram uma contribuição muito importante para a ciência, pois foi a partir deles que se desenvolveu os primeiros fármacos para a cura de várias doenças. Para sobreviver, as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência aos antibióticos. Atualmente as bactérias se tornaram resistentes a maioria dos fármacos que foram desenvolvidos pela indústria farmacêutica. Tal resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas

sintéticas já conhecidas. A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem durante seu processo de divisão celular e resultam de erros de cópia na sequência de bases do DNA cromossômico ou pela importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível (CRISPIM; LACERDA, 2014).

Esse fenômeno tornou-se preocupante uma vez que essa resistência limita a eficácia dos medicamentos antimicrobianos atuais e promove o aumento de patógenos multirresistentes. Assim, se faz necessário desenvolver outros fármacos que combatam as novas doenças causadas por bactérias que estão em evolução. Com isso, a validação do uso terapêutico de plantas medicinais se faz importante, uma vez que a população de classe mais baixa de alguns países faz o uso de medicamentos fitoterápicos devido os altos custos dos fármacos sintéticos (ASCHWANDEN, 2001). Além disso, uso de terapias alternativas é uma herança cultural que está presente até hoje em todas as culturas, pois antes do surgimento dos medicamentos sintéticos, as plantas medicinais já eram usadas para curar várias doenças.

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

No decorrer dos últimos anos, pesquisas em diferentes países foram efetuadas com o objetivo de provar a efetividade antimicrobiana de produtos naturais. O que tornou provável que os fitoquímicos encontrados nestes tenham papel no arsenal de agentes antimicrobianos. Por meio dos extratos vegetais obtidos de plantas medicinais são verificados metabólitos secundários em abundância, os quais são conhecidos por conter em sua composição substâncias com propriedades antimicrobianas (MICHELIN *et al.*, 2005). No começo do século 21, os vários acontecimentos de infecções bacterianas resistentes a drogas tornaram-se comum e a necessidade de pesquisas para desenvolver novos medicamentos com atividade antimicrobiana se espalhou para novas áreas. Produtos naturais de plantas são interessantes alternativas para resolver este problema, já que muitos extratos vegetais e seus constituintes fitoquímicos são conhecidos por terem atividades antimicrobianas (SILVA; SOUZA; ESPINHEIRA, 2019).

A formação de compostos obtidos das árvores e plantas, é feita através de vias metabólicas. Tais compostos são resultado da junção de vários fatores interferentes no crescimento da planta, como luz, temperatura, intensidade luminosa, água, tipo de

solo, tipo de relevo, além dos fatores genéticos próprios da planta. Esses compostos possuem importantes funções nos vegetais, já que são constituídos de substâncias que agem na preservação da integridade das plantas. (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Os óleos essenciais voláteis ou etéreos são compostos encontrados em várias plantas e possuem como características básicas o cheiro e o sabor. Algumas substâncias presentes nos óleos essenciais tem alto valor comercial, neste caso, essas substâncias podem ser isoladas do óleo ou mesmo sintetizadas em laboratório, A partir dos séculos XVI e XVII, devido ao nível de tecnologia, maior conhecimento, exploração de suas propriedades e divulgação, a comercialização destes óleos se tornou mais popular pelo mundo. Não se deve esquecer que as especiarias, muitas delas ervas aromáticas de grande valor econômico, eram produtos valiosos na Europa São insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos, sendo extraídos por técnicas simples como arraste de vapor. (TRANCOSO, 2013)

As atividades biológicas dos óleos essenciais são resultados de interações com a fisiologia humana, permitindo a inclusão em formulações medicamentosas pelo fundamento medicinal. Os óleos essenciais têm muitas atividades farmacodinâmicas, decorrentes de grande variedade e diversidade das suas composições químicas. Podem ser usados diretamente ou incluídos em formulações medicamentosas, tais substâncias são especialmente solicitadas pelos efeitos atuantes sobre o sistema digestivo / gastrointestinal, e no aparelho respiratório pela propriedade da atividade analgésica e anti-inflamatória ou por efeitos inespecíficos, por muitas vezes na pele e/ou em tecidos expostos (CAVALEIRO, 2007)

A planta *Melaleuca* é um gênero botânico originado na Austrália e nativa de Ilhas do Oceano Índico, da família *Myrtaceae*, possui 100 espécies diferentes. É conhecida popularmente como “árvore de chá”, seu desenvolvimento tem mais afinidade para áreas próximas de rio e de pântanos. Em relação ao tamanho, as árvores podem atingir até 7 metros de altura, com casca fina e suas folhas pontiagudas e longas. A *Melaleuca* possui propriedades aromáticas e medicinais, seu óleo essencial (metabólito secundário) extraído das folhas (rico em mono e sesquiterpenos) é amplamente utilizado em âmbito farmacêutico e medicinal, em decorrência de sua comprovada ação

antifúngica e bactericida contra patógenos humanos, sendo usado de forma tópica (GIONGO *et al.*, 2017).

O óleo essencial da planta melaleuca está presente dentre os fármacos aromáticos inscritos na Farmacopeia Portuguesa VIII. Tem como descrição ser destilado com arrastamento de vapor das folhas e dos caules terminais, e tem como *Taxon* de origem: *Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betch) Cheel e outros taxa. Ação bactericida é caracterizada pela destruição da bactéria, por meio dos mecanismos de destruição da parede celular, inibição da síntese proteica, da síntese do ácido fólico, e posterior eliminação da bactéria (CAVALEIRO, 2007)

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

A presente pesquisa possui caráter experimental, do tipo ensaio laboratorial *in vitro*.

4.2 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Este projeto de pesquisa será executado no laboratório de microbiologia da Faculdade Presidente Antônio Carlos – FAPAC em Porto Nacional - TO, no período de agosto a dezembro de 2020.

4.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Não se enquadra.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Não se enquadra.

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Não se enquadra.

4.6 VARIÁVEIS

Halo de inibição por concentração.

4.7 INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS, ESTRATÉGIAS DE APLICAÇÃO, ANÁLISE E APRESENTAÇÃO DOS DADOS

Os dados serão tabulados em planilhas eletrônicas *Microsoft Excel*, será realizada uma análise de variância a fim de detectar diferenças estatísticas entre as concentrações do óleo essencial, os resultados serão apresentados em forma de tabelas e gráficos.

5 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Inicialmente, as bactérias padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *S. pyogenes* serão cultivadas em agar nutriente. Para os ensaios de suscetibilidade a antimicrobianos, serão utilizadas as bactérias previamente cultivadas. Serão utilizadas placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton para semeadura das bactérias por swabs. Para o preparo da suspensão bacteriana serão transferidas de três a cinco colônias do microrganismo para dois tubos de ensaio com solução salina estéril, ajustando-se a turbidez do inóculo com padrão de 0,5 da escala de McFarland, correspondendo à aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Os ensaios da atividade antibacteriana serão realizados pelo método de difusão em disco de papel de filtro, utilizando-se o método de Kirby & Bauer (NARDELI *et al.*, 2014), com alterações. Em papéis filtro cilíndricos esterilizados, de 6 mm de diâmetro, serão embebidos 10 µL do óleo 100%, 75% e 50%, e os discos serão aplicados sobre os meios de cultura contendo as bactérias semeadas. Os meios de cultura serão mantidos em estufa por 24 horas a 36,5 °C. Para controle positivo de sensibilidade, serão utilizados os antimicrobianos Penicilina e Amoxicilina. Como controle negativo será utilizada solução fisiológica estéril. Após a incubação, será realizada a leitura dos resultados, através da medição do diâmetro dos halos de inibição. Os testes serão realizados em triplicata, expressas em termos do diâmetro (mm) da zona de inibição do crescimento bacteriano.

6 ASPECTOS ÉTICOS

6.1 RISCOS

Não se enquadra

6.2 BENEFÍCIOS

Não se enquadra

6.3 CRITÉRIOS PARA SUSPENDER OU ENCERRAR A PESQUISA

Não se enquadra

7 DESFECHO

7.1 DESFECHO PRIMÁRIO

Na presente pesquisa, espera-se identificar se o óleo essencial da planta *Melaleuca* apresenta efeitos bactericida e/ou bacteriostático sob a bactéria *Streptococcus pyogenes*.

7.2 DESFECHOS SECUNDÁRIOS

A partir dessa pesquisa, espera-se que a bactéria *Streptococcus Pyogenes* seja *sensível* ao óleo essencial da planta *Melaleuca altermifolia*, comprovando assim, seu efeito antibacteriano principalmente na doença causadora de erisipela. Além disso, os autores dessa pesquisa acreditam que esse estudo servirá como base para novas pesquisas e descobertas sobre os benefícios que o óleo essencial poderá ter sobre o tratamento de várias doenças, como também será uma nova opção terapêutica de fácil acesso à população. Desse modo, tal projeto será publicado em revistas científicas com intuito que esse estudo seja mais aprofundado e tenha continuidade por mais pesquisadores, visto que essa pesquisa está em uma fase inicial e que poderá trazer muitos benefícios tanto para área medica quanto para a saúde da população.

8 CRONOGRAMA

Quadro 1 - Cronograma da pesquisa

2020						2021				
ETAPAS	Fev.	Mar.	Abr.	Mai	Jun.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai o	Jun
Escolha do tema	x									
Pesquisa bibliográfica	x	x	x							
Elaboração do Projeto	x	x	x	x						
Defesa do Projeto					x					
Ensaio laboratorial <i>in vitro</i>						x	x	x		
Encontros com o(a) orientador(a)	x	x	x	x	x		x	x	x	x
Levantamento dos dados								x		
Análise dos Resultados								x	x	
Escrita do Artigo Científico							x	x	x	x
Revisão do Artigo									x	
Defesa do Artigo										x
Submissão do Artigo										x

Fonte: Elaborado pelos autores

9 ORÇAMENTO

Quadro 2 - Orçamento dos recursos gastos com a pesquisa

CATEGORIA: GASTOS COM RECURSOS MATERIAIS			
Itens	Quantidade	Valor Estimado	Informações e Contato
Agar Mueller Hinton Frasco 500 gr Kasvi	1	567,76	For lab express
Streptococcus pyogenes Rosenbach (ATCC® 19615)	1	448,30	Centerlab
Óleo essencial de Melaleuca 15 ml	1	125,00	Doterra
Solução salina tamponada 1L	1	79,12	Spectrun
CATEGORIA: GASTOS COM RECURSOS HUMANOS			
Itens	Quantidade	Valor Unitário R\$	Valor Total R\$
Combustível	10l	4,50	45,00
CATEGORIA: FINANCIAMENTO TOTAL DA PESQUISA			
Categorias			Valor Total R\$
Gastos com recursos materiais			688,00
Gastos com recursos humanos			45,00
Valor Total:			733,00

Fonte: Elaborado pelos autores

Obs.: Todas as despesas previstas serão cobertas por financiamento próprio.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. Boas práticas em microbiologia clínica, módulo 4, Gram – positivos. 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_stre.htm. Acesso em: 08 jun. 2020.
- ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they? **Bulletin of the World Health Organization**, Genebra, v.79, n.7, p.691-692, 2001.
- BERNARDES, C. H. de A. *et al.* Experiência clínica na avaliação de 284 casos de erisipela. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 605-609, set./out. 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962002000500011>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962002000500011&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 22 jun. 2020.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006>. Disponível em: <https://cmr.asm.org/content/cmr/19/1/50.full.pdf>. Acesso em: 27 maio 2020.
- CAVALEIRO, C. Plantas aromáticas e óleos essenciais em farmácia e medicina. In: FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. (ed.). **Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático**, 3. ed. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007. p. 55-62. Disponível em: <http://cbv.fc.ul.pt/PAM/pdfsLivro/CarlosCavaleiro.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2020.
- COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J.L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v.91, p. 492-497, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01406.x>. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2672.2001.01406.x>. Acesso em: 07 jun. 2020.
- CRISPIM, G.J.B.; LACERDA, M.C.R.N. Análise da ação bacteriolítica da *Melaleuca alternifolia* nas principais bactérias de interesse médico. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 67-75, 2014. Disponível em: <https://revista.pgsskroton.com/index.php/ensaioeciencia/article/view/1073>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- ELIZABETSKY, E. Pesquisas em plantas medicinais. **Ciência e Cultura**, v.39, n. 8, p.697-702, 1997.
- FICA CUBILLOS, A. Celulite e erisipela: manejo na atenção primária. **Revista Chilena de Infectologia**, Santiago, v. 20, n. 2, p. 104-110, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003000200004>. Disponível em:

https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182003000200004&lng=es&nrm=iso. Acesso em: 22 jun. 2020.

GIONGO, M. *et al.* Análise do pH e liberação de cálcio da associação entre óleo de *Melaleuca alternifolia* e hidróxido de cálcio. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 46, n. 2, p. 104-108, abr. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1807-2577.07816>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-25772017000200104&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 22 jun. 2020.

MICHELIN, D.C. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 316-320, out./dez. 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400010>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2005000400010&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 22 jun. 2020.

PELCZAR JUNIOR, M.J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 2005.

SANTOS, V. P. Estreptococcias. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], v. 75, n. 1, p. 103-114, 1999. Disponível em: <http://www.jped.com.br/conteudo/99-75-S103/port.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2020.

SBD - Sociedade Brasileira de Dermatologia. Erisipela. 2017. Disponível em: <https://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/erisipela/38/>. Acesso em 18 jun, 2020.

SCALABRIN, R. *et al.* Isolamento de *Streptococcus pyogenes* em indivíduos com faringoamigdalite e teste de susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 69, n. 6, p. 814-818, nov./dez. 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72992003000600014>. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rboto/v69n6/a14v69n6.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2020.

SILVA, P. *et al.* Investigação de *Streptococcus pyogenes* no Instituto Adolfo Lutz - Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto - São Paulo – Brasil. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, Ribeirão Preto, ano 26, art. 9, p. 1-3, 2016. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial_26/26u_art-10.pdf. Acesso em: 10 jun. 2020.

SILVA, S. R.; SOUZA, F. M.; ESPINHEIRA, M. J. C. L. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial das sementes de *Passiflora edulis Sims* frente às bactérias Gram positivas e Gram negativas. **Revista Multidisciplinar e de Psicologia**, [s.l.], v.13, n. 43, p. 1003-1017, 2019. DOI: <https://doi.org/10.14295/idonline.v13i43.1574>. Disponível em: <https://idonline.emnuvens.com.br/id/article/view/1574>. Acesso em: 17 jun. 2020.

TRANCOSO, M. D. Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. **Revista Práxis**, [s.l.], ano V, n. 9, junho de 2013. Disponível em: <http://web.unifoa.edu.br/praxis/numeros/09/89-96.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2020.

TRELL, K. *et al.* Colonização de *estreptococos β -hemolíticos* em pacientes com erisipela - um estudo prospectivo. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s.l.], n. 38, p.1901–1906, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03625-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10096-019-03625-9.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2020.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a medicina medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, mar./abr. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000200025. Acesso em: 22 jun. 2020.



FAPAC – Faculdade Presidente Antônio Carlos.
INSTITUTO TOCANTINENSE PRES. ANTÔNIO CARLOS PORTO S/A



Rua 02, Qd. 07 – Jardim dos Ypês – Porto Nacional – CEP 77.500-000
CX Postal 124 - Fone: (63) 3363-9600 – CNPJ: 10.261.569/0001 – 64



www.itpacporto.edu.br

APÊNDICE A - TERMO DE COMPROMISSO SOBRE O INÍCIO DA PESQUISA – DECLARAÇÃO ORIENTADOR

PROJETO: _____

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: _____

PESQUISADORA PARTICIPANTE: _____

Eu, Professor (a) _____, pesquisador (a) responsável pela pesquisa acima identificada, com a anuência da IES FAPAC/ITPAC Porto declaro que conheço e cumprirei as normas vigentes expressas na Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, e em suas complementares (Resoluções CNS/MS 240/97, 251/97, 292/99, 340/2004 e 510/2016 e assumo, neste termo o compromisso de:

- 1) Somente iniciar a pesquisa após sua aprovação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FAPAC/ITPAC Porto e, nos casos assim previstos em lei (Resolução CNS/MS 196/96, VIII, 4 e CNS/MS 340/04, item VI), na Comissão Nacional Ética em Pesquisa – CONEP;
- 2) Caso a pesquisa seja interrompida, informar tal fato ao Comitê de Ética e Pesquisa, de forma justificada;
- 3) Na ocorrência de evento adverso grave comunicar imediatamente ao CEP, bem como prestart todas as informações que me foram solicitadas;
- 4) Utilizar os dados e/ou informações coletadas assegurando a confidencialidade e a privacidade dos mesmos.
- 5) Destinar os dados e/ou informações coletadas somente para o projeto ao qual se vinculam. Todo e qualquer outro uso deverá ser objeto de um novo projeto de pesquisa que deverá ser submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa;
- 6) Apresentar relatório final, sobre o desenvolvimento da pesquisa ao CEP.

_____, _____ de _____ de _____.

Prof.

Pesquisador Responsável



FAPAC – Faculdade Presidente Antônio Carlos.
INSTITUTO TOCANTINENSE PRES. ANTÔNIO CARLOS PORTO S/A
Rua 02, Qd. 07 – Jardim dos Ypês – Porto Nacional – CEP 77.500-000
CX Postal 124 - Fone: (63) 3363-9600 – CNPJ: 10.261.569/0001 – 64
www.itpacporto.edu.br

APÊNDICE B - TERMO DE COMPROMISSO DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

PROJETO: _____

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: _____

A FAPAC/ITPAC PORTO declara que está de acordo com a execução do projeto _____, coordenado pelo pesquisador _____, desenvolvido em conjunto com os acadêmicos _____ e assume o compromisso de apoiar o desenvolvimento da referida pesquisa nesta instituição durante a realização da mesma.

Declaramos conhecer e cumprir as resoluções éticas brasileiras, em especial a Resolução 466/20102 do Conselho Nacional de Saúde. Esta instituição está ciente de suas corresponsabilidades como instituição coparticipante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Porto Nacional, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Responsável pela IES

Carimbo