

SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM ALIMENTOS A ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS MEDICINAIS E CONDIMENTARES.

Alessandra Farias Millezi

Instituto Federal Catarinense, Câmpus Concórdia – SC

Diogo Francisco Rossoni

Universidade Federal de Maringá, Maringá – PR

Igor Auad Cano

Programa de Mestrado em Engenharia Química da USP, São Paulo – SP

Roberta Hilsdorf Piccoli ✉

Universidade Federal de Lavras, Lavras– MG

✉ rhpiccoli@dca.ufla.br

RESUMO

Os óleos essenciais (OEs), também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são produtos do metabolismo secundário dos vegetais. Tanto os óleos como os seus componentes são utilizados como produtos nas indústrias de alimentos, pois possuem comprovada atividade antimicrobiana. As Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) desses óleos para diversas bactérias devem ser determinadas. As CMI variam de acordo com o óleo utilizado, dos compostos majoritários e da fisiologia da bactéria em estudo. Neste trabalho, os OEs das plantas *Melaleuca alternifolia*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Cymbopogon martini* foram testados quanto à atividade antimicrobiana (através da CMI) contra as bactérias patogênicas

Escherichia coli e *Staphylococcus aureus*. Neste estudo, verificamos que *E. coli* e *S. aureus* foram sensíveis aos três OEs em todas as concentrações. Os resultados *in vitro* sugerem que os três OEs possuem potencial para utilização, como uma alternativa aos antimicrobianos e conservantes sintéticos.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Antimicrobianos naturais. Alimentos.

ABSTRACT

Essential oils (EOs) also known as volatile or ethereal oils, are products of plants secondary metabolism. Both oils as their products are used as components in food industries, as they have proven

antimicrobial activity. The Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of these oils for various bacteria must be determined. The MIC will vary depending on the oil used, the major compounds and physiology of the bacteria under study. In this work, the *Melaleuca alternifolia* plant EO, *Cinnamomum zeylanicum* and *Cymbopogon martini* were tested for antimicrobial activity (by MIC) against pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In this study, we found that *E. coli* and *S. aureus* were sensitive to the three EOs in all concentrations. *In vitro* results suggest that the three EOs are potentially useful as an alternative to synthetic preservatives and antimicrobials.

Keywords: *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Natural antimicrobial. Food.

INTRODUÇÃO

Óleos essenciais (OEs) são produtos voláteis presentes em vários órgãos vegetais (partes aéreas, cascas, troncos, raízes, frutos, flores, sementes e resinas) e estão relacionados ao metabolismo secundário das plantas exercendo diversas funções importantes à sobrevivência vegetal, como por exemplo na defesa contra micro-organismos (LIMA et al., 2006), antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra o ataque de herbívoros (SIMÕES e SPITZER, 2004). O mercado mundial de OEs gira em torno de US\$ 1,8 bilhão, sendo a participação do Brasil de apenas 0,1%, deste 80% refere-se ao comércio de óleo essencial de laranja, cujo principais consumidores estão incluídos nos setores de higiene pessoal, perfumaria e cosmética.

As propriedades antimicrobianas dos OEs de plantas condimentares e medicinais têm despertado interesse pela perspectiva de constituírem uma alternativa quanto à utilização de aditivos químicos em alimentos. Nos últimos anos tem sido relatado que alguns OEs são capazes de inibir bactérias de origem alimentar e prolongar a vida de prateleira de alimentos processados (SMITH-PALMER et al. 1998). A atividade antibacteriana vai depender do tipo, composição e concentração da espécie ou do OE, a composição do substrato, o processamento e condições de estocagem e tipo do micro-organismo em questão (BERTINI et al., 2005). Eles apresentam ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (PEREIRA 2008, MILLEZI et al., 2012a; MILLEZI et al. 2013), fungos (HASHEM et al., 2010), leveduras (PRASHAR et al., 2003) e também contra biofilmes bacterianos (MILLEZI et al., 2013a, MILLEZI et al., 2012b).

O óleo essencial de canela (*C.*

zeylanicum Blume - Lauraceae) é utilizado como flavorizante, aromatizante e conservante natural de alimentos. Estudos mostraram a capacidade de inibir o crescimento de fungos (LIMA et al., 2006) e de bactérias (MATAN et al., 2006). O eugenol normalmente é identificado como composto que apresenta maior percentual (60%) (LIMA et al., 2005).

Melaleuca alternifolia é empregada em grande parte por suas propriedades antimicrobianas, seu OE é incorporado como ingrediente ativo em muitas formulações tópicas usadas para tratar infecções cutâneas. A maioria das bactérias é susceptível ao OE de *M. alternifolia* em concentrações de 1,0% ou menos, MICs acima de 2% foram relatados para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (BANES-MARSHALL et al., 2001).

A palmarosa (*C. martini*) é uma gramínea cujo óleo essencial contém um importante componente, o geraniol, de largo uso na indústria de produtos aromáticos (SOUZA et al., 1976). Duarte et al, (2007) testaram diversos OES contra bactéria Gram positivas e Gram negativas, sendo o OE de *C. martini* o mais eficiente, principalmente contra *P. aeruginosa*.

Diversas bactérias causam problemas de ordem econômica e de saúde pública devido à contaminação dos alimentos. *Escherichia coli* é um dos mais versáteis encontrados na natureza; sendo, em consequência da frequente precariedade das condições higienicossanitárias da produção de alimentos, que sua presença se dá principalmente por contato com material fecal ou contato com superfícies contaminadas (NASCIMENTO & STAMFORD, 2000).

Staphylococcus aureus está presente em humanos e animais, na mucosa naso-faríngea, onde forma parte da microbiota normal. Organismos presentes no nariz podem contaminar

facilmente a pele e, assim, portadores nasais podem ser portadores cutâneos. Millezi et al. (2007) verificaram níveis de $1,5 \times 10^3$ UFC/mão em manipuladores de alimentos de uma indústria de processamento de carnes, após a higienização das mãos. Este fato é preocupante já que o micro-organismo é reconhecido como um importante agente patogênico, por sua capacidade de produzir toxinfecções alimentares (JORGENSEN et al., 2005).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *C. martini* e *M. alternifolia* determinando a concentração mínima inibitória (CMI) sobre *S. aureus* e *E. coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, na Universidade de Lavras, Lavras – MG.

Os OEs de *C. zeylanicum*, *C. martini* e *M. alternifolia* foram adquiridos da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda, (Vargem Grande, SP), extraídos das folhas de plantas por hidrodestilação e de acordo com a empresa, contendo os compostos majoritário o eugenol (86%), geraniol (86%) e terpine-4-ol (48%), respectivamente.

Micro-organismos utilizados, padronização do inóculo e estocagem

Os micro-organismos utilizados foram *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* 25923. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento, relacionando-se absorbância a 600 nm e UFC mL⁻¹. Durante a realização de todo experimento, a cepa foi estocada em meio de congelamento (por 100 mL de água destilada: 15 mL de glicerol; 0,5 g de peptona

bacteriológica, 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; pH 7,3) e estocada a -12°C. A cepa foi reativada pela transferência de alíquotas do meio de congelamento para tubos de ensaio contendo caldo tripton de soja (TSB), sendo realizados dois repiques consecutivos com incubação a 37 °C, por 24 horas. Após a reativação, uma alçada da cultura foi retirada e transferida para frasco Erlenmeyer contendo 200 mL de TSB e incubado a 37 °C. As leituras de absorbância foram realizadas periodicamente, até obterem-se 10⁸UFC mL⁻¹.

Determinação da concentração mínima inibitória

A concentração mínima inibitória dos OEs foi determinada através da técnica de Disco-Difusão conforme NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003) com modificações. (5µL). Os óleos essenciais foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo-se as concentrações de 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µL mL⁻¹. O volume de 5µL de cada OE foi dispensado sobre discos de papel filtro com 6 mm de diâmetro, que foram

colocados sobre Agar Tripton de Soja (TSA) inoculado em concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹ *E. coli*, em placas de Petri e incubadas a 37 °C, por 24 horas. O controle negativo foi preparado usando somente o solvente (DMSO). Os halos de inibição foram medidos com paquímetro digital.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversas pesquisas publicadas relatam a atividade antimicrobiana de OEs (MILLEZI et al., 2013a, MILLEZI et al., 2013b, PEREIRA et al., 2008). Bactérias patogênicas como *E. coli* e *S. aureus* além de causarem doenças, são responsáveis por grandes perdas financeiras em contaminação de alimentos. É importante a busca por novas estratégias, como o uso de antimicrobianos naturais, os OEs, na composição de sanitizantes utilizados nas indústrias de processamento de alimentos, entretanto, para isso, os OEs devem demonstrar atividade contra os micro-organismos em questão.

Neste estudo, verificou-se que *E. coli* e *S. aureus* foram sensíveis aos

três OEs em todas as concentrações. Na Tabela 1 podem-se observar os valores de halos inibitórios para *S. aureus* em função da atividade dos OEs.

Somente nas maiores concentrações (25 e 50%) houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os OEs, sendo que o óleo de *M. alternifolia* foi mais eficiente que o óleo de *C. zeylanicum* na concentração de 25% e também mais eficiente que o óleo de *C. martini* na concentração de 50% (Tabela 1). *Staphylococcus aureus* foi mais sensível ao OE de *M. alternifolia*, na maior concentração, na qual houve formação de halo inibitório de 13,19 mm (Figura 1). Millesi et al. (2013b) relataram sensibilidade de *S. aureus* a óleos essenciais, sendo que a bactéria maior sensibilidade ao OE de *C. limonia* a partir da concentração de 10% esse óleo mostrou-se mais eficiente que os outros, já o óleo de *S. montana* teve atividade antimicrobiana somente a partir da concentração de 5%. No presente estudo, verificou-se que nas menores concentrações, 1,5% e 2,5% os valores de halos inibitórios

Tabela 1 - Sensibilidade (halos de inibição em mm) de *Staphylococcus aureus* aos OEs de *C. zeylanicum*, *M. alternifolia* e *C. martini* em diferentes concentrações.

Bactéria	<i>Staphylococcus aureus</i>		
Concentrações (%)	<i>C. zeylanicum</i>	<i>M. alternifolia</i>	<i>C. martini</i>
1,5	1,5 ^a	0,81 ^a	2,26 ^a
2,5	2,17 ^a	1,29 ^a	3,06 ^a
5,0	4,8 ^a	2,95 ^a	3,73 ^a
10,0	5,01 ^a	3,29 ^a	4,49 ^a
15,0	5,17 ^a	4,97 ^a	6,24 ^a
25,0	4,39 ^b	8,56 ^a	6,43 ^{ab}
50,0	5,28 ^b	13,19 ^a	4,38 ^b

^{a, b, c} Teste Tukey a 95% de significância para diferença de médias das zonas de inibição (mensuradas em milímetros), médias seguidas de mesma letra não diferem entre si significativamente na mesma linha.

foram maiores para o OE de *C. martini*, apesar de não haver diferença estatística significativa em relação os outros dois OEs.

Outros autores, relataram sensibilidade de *E. coli* e *S. aureus* a diferentes OEs, Pereira et al. (2008) e Duarte et al. (2007) consideram que os constituintes majoritários dos óleos essenciais de plantas do gênero *Cymbopogon*, os monoterpenos geraniol e neral, são responsáveis pela ação antibacteriana. O OE *C. zeylanicum* também foi descrito recentemente como potente antimicrobiano, podendo ser usado para a preservação de alimentos (FLINT et al, 2001). O OE de *C. zeylanicum* possui cerca de 100 diferentes componentes, incluindo o eugenol, que geralmente é o componente majoritário desse óleo (WANG et al., 2009).

Há recentemente também a perspectiva de uso dos componentes majoritários isolados de cada OE, pois alguns autores atribuem a atividade biológica a tais componentes. Por outro lado, há pesquisadores que defendem o uso OE em sua composição

completa, argumentando que o efeito antimicrobiano é devido ao sinergismo dos constituintes presentes no OE. Budzynska et al. (2011) relataram atividade antibacteriana do OE de *M. alternifolia* e seu composto majoritário terpinen-4-ol contra *S. aureus*. Millezi et al. (2014) utilizaram OE e compostos majoritários isolados contra bactérias planctônicas, relatam maior sensibilidade das bactérias quando usados os OEs.

Contra *E. coli* também obteve-se atividade antimicrobiana. Na Tabela 2 são demonstrados os valores de halos inibitórios dos OEs sobre *E. coli*

Os valores de halos inibitórios foram variáveis, sendo que nas concentrações de 1,5% até 10% os OEs de *C. martini* e *C. zeylanicum* formaram halos significativamente maiores que o OE de *M. alternifolia*. Na concentração de 15% o OE de *C. Martini* formou halos significativamente maiores que os outros dois OEs, entretanto, nas concentrações de 25% e 50% houve redução na atividade desse OE, ocorrendo menores valores de halos de inibição (figura 2).

Na concentração de 50% o OE de *M. alternifolia* foi significativamente melhor formando maior halo inibitórios que os OE de *C. martini* e *C. zeylanicum*.

Millezi et al. (2014) relataram que eugenol e geraniol reduziram mais de 90% de células planctônicas de *E. coli*. Devido à natureza hidrofóbica e fenólica, eugenol, composto majoritário do óleo de *C. zeylanicum*, interage com a camada fosfolipídica da membrana citoplasmática e também com as proteínas da membrana bacteriana, causando o vazamento do material celular, tais como íons, ATP e ácidos nucleicos (BURT, 2004).

A sensibilidade das bactérias frente dos óleos de *C. martini* e *M. alternifolia* às altas quantidades de geraniol e terpinen-4-ol, respectivamente. O mecanismo de ação desses compostos baseia-se principalmente em efeitos tóxicos na membrana celular, como a dissipação da força próton motiva, comprometendo a função no que diz respeito à permeabilidade seletiva (SIKKEMA et al., 1995).

Figura 1 - Zonas de inibição (mm) em função das concentrações de diferentes óleos essenciais sobre *Staphylococcus aureus*. Valores médios $\pm$ Desvio padrão (barras).

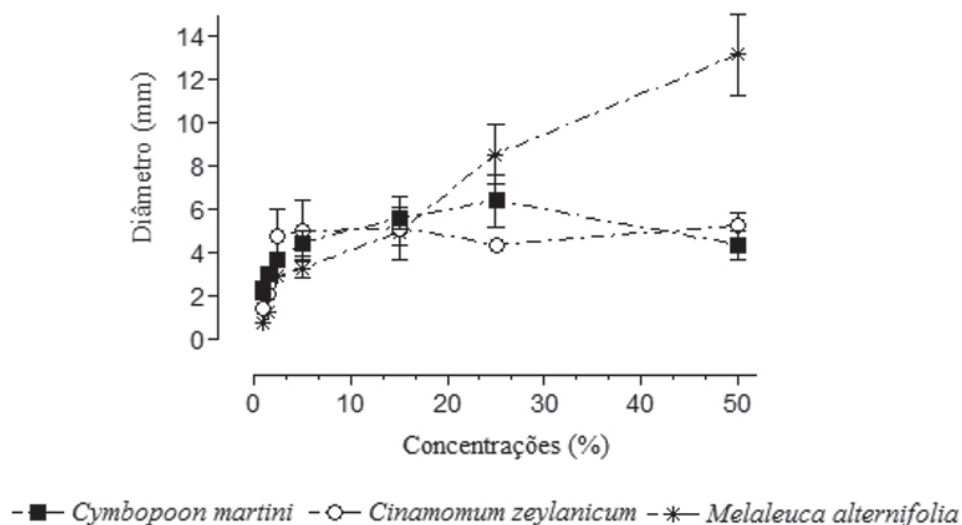
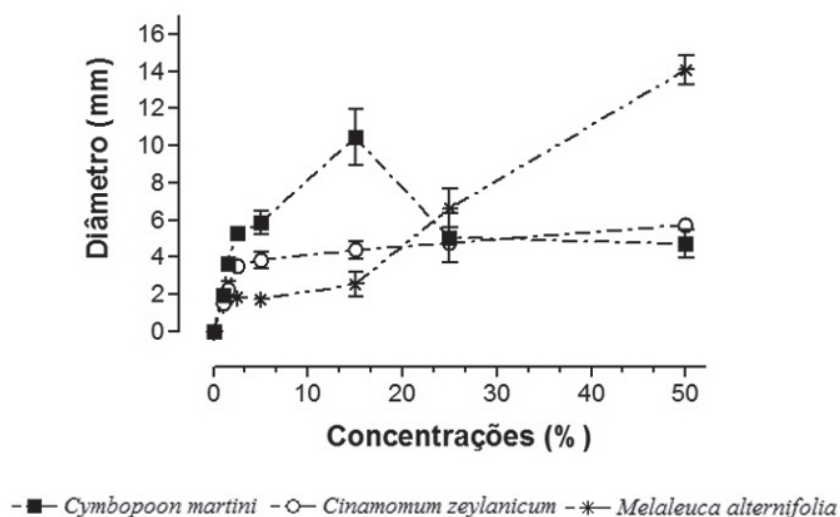


Tabela 2 - Sensibilidade (halos de inibição em mm) de *Escherichia coli* aos OEs *C. zeylanicum*, *M. alternifolia* e *C. martini* em diferentes concentrações.

Bactéria	<i>Escherichia coli</i>		
Concentrações (%)	<i>C. zeylanicum</i>	<i>M. alternifolia</i>	<i>C. martini</i>
1,5	1,25 ^a	1,47 ^a	1,97 ^a
2,5	2,26 ^{ab}	1,85 ^a	3,65 ^b
5,0	3,55 ^b	1,85 ^a	5,31 ^b
10,0	3,84 ^b	1,75 ^a	5,84 ^b
15,0	4,4 ^b	2,55 ^a	10,44 ^c
25,0	4,76 ^a	6,64 ^a	5,05 ^a
50,0	5,73 ^a	11,37 ^b	4,71 ^a

a, b, c Teste Tukey a 95% de significância para diferença de médias das zonas de inibição (mensuradas em milímetros), médias seguidas de mesma letra não diferem entre si significativamente na mesma linha.

Figura 2 - Zonas de inibição (mm) em função das concentrações de diferentes óleos essenciais sobre *Escherichia coli*. Valores médios ± Desvio padrão (barras).

Deve-se salientar que para efeitos de pesquisa *in vitro* utilizam-se intervalos de concentrações com diferentes valores, englobando baixas e altas concentrações. No caso do presente estudo, variou-se aleatoriamente concentrações de 1,5 % até 50%, contudo, altas concentrações como 25% e 50% tendem a ser inviáveis para uso *in vivo* como aplicação em alimentos ou sanificantes. Assim,

entende-se que o OE mais eficiente é aquele em que as bactérias foram mais sensíveis em menor concentração.

CONCLUSÃO

As bactérias *E. coli* e *S. aureus* foram sensíveis em todas as concentrações dos OEs de *C. zeylanicum*, *C. martini* e *M. alternifolia*, a CMI foi de

1,5%. Os resultados *in vitro* sugerem que os três OEs possuem potencial para utilização, como uma alternativa aos antimicrobianos e conservantes sintéticos. Sugere-se como continuidade para trabalhos futuros que os mesmos OEs sejam testados contra *E. coli* e *S. aureus* em pesquisas *in vivo*, tais como em alimentos, embalagens ou fazendo parte de formulações de detergentes e sanificantes.

Agradecimentos

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro na execução do projeto.

REFERÊNCIAS

- BANES-MARSHALL, LP; CAWLEY, CA. PHILLIPS. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against bacterial and *Candida* spp. Isolates from clinical specimens. **Braz J Biomed Sci.** n.58, p.139-145, 2001.
- BERTINI, LM et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Rev Inf.** v.17, n.314, p.80-3, 2005.
- BURT, SA; REINDERS, RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiol.** v.36, p.162-167, 2004.
- DUARTE, MCT et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **J Ethnoph.** v.111, p.197-201, 2007.
- FLINT, S; PALMER, J; BLOEMEN, K; BROOKS, J; CRAWFORD, R. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. **J Applied Microbiol.** v.90, p.151-157, 2001.
- GANESH, CK; ANAND, SK. Significance of microbial biofilms in food industry a review. **Int J Food Microbiol.** v.42, p.9-27, 1998.
- HASHEM, M; MOHARAM, AM; ZAIED, AA; SALEH, FEM. Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. **Crop Protec.** n.29, p.1111-1117, 2010.
- JORGENSEN, HJ; MATHISEN, T; LOVSETH, A; OMOE, K; QVALE, KS; LONGAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiol Let.** v.252, n.2, p.267-272, 2005.
- LIMA, MP et al. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Acta Amaz.** v.35, n.3, p.363-6, 2005.
- MATAN, N et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **Int. J Food Microb.** v.107, n.2, p. 180-5, 2006.
- MILLEZI, AF; TONIAL, TM; ZANELLA, JP; MOSCHEN, EES; AVILA, CAC; KAISER, VL; HOFFMEISTER, S. Avaliação e qualidade microbiológica das mãos de manipuladores e do agente sanitizante na indústria de alimentos. **Rev Anal.** n.28, p.74-79, 2007.
- MILLEZI, AF; CAIXETA, DS; ROSSONI, DF; CARDOSO, MG; PICCOLI, RH. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils thymus vulgaris, cymbopogon citratus and laurus nobilis against five important food-borne pathogens. **Ciênc Tecnol Aliment.** v.32, p.167-172, 2012.
- MILLEZI, FA; PEREIRA, MO; BATISTA, NN; CAMARGOS, N; AUAD, I; CARDOSO, M DAS G; PICCOLI, RH. Susceptibility of mono and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **J Food Safety.** v.32, p.351-359, 2012.
- MILLEZI, AF; CARDOSO, MG; ALVES, E; PICCOLI, RH. Reduction of *Aeromonas hydrophyla* biofilm on stainless steel surface by essential oils. **Braz J Microbiol.** v.44, p.73-80, 2013.
- MILLEZI, FA; BAPTISTA, NN; CAIXETA, DS; ROSSONI, DF; CARDOSO, MG; PICCOLI, RH. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev Bras Plantas Med.** n.15, p.373-379, 2013.
- MILLEZI, AF; PICCOLI, RH; OLIVEIRA, JM; PEREIRA, M. O. Anti-biofilm and antibacterial effect essential oils and their major compounds. **J Essen Oil Bear Plants** (in press). n.20, p.30, 2014.
- NASCIMENTO, M.R.; STAMFORD, T.L.M. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7. **Rev Hig Alimentar,** São Paulo. v.14, n.70, p.32-35, 2000.
- PEREIRA, AA; CARDOSO, MG; RONALDO, LR; MORAIS, AR; GUIMARÃES, LG; SALGADO, APP. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev Ciênc Agrotec.** v.32, n.3, 887-893, 2008.
- PRASHAR, A; HILI, P; VENESS, RG; EVANS, CS. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry.** v.63, p.569-575, 2003.
- SIKKEMA, J; BONT, JAM; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **J Biol Chem.** v.269, 8022-8, 1994.
- SIMÕES, CMO; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; MELLO, JCP; MENTZ, LA; PETROVICK, PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p.467-495.
- SOUZA, JC; MEDINA, DM; LEITÃO FILHO, HF. Estudos preliminares para o melhoramento da palmarosa, **Bragantia.** n.8, v.34, p.35-38, 1976.
- SMITH-PALMER, A; STEWART, J; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microb.** v.18, p.463-470, 2001.