

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE ÓLEOS
ESSENCIAIS SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

ALESSANDRA PEREIRA SANT'ANNA SALIMENA¹, ALEXANDRE CRISTIANO SANTOS
JÚNIOR², DIOGO FRANCISCO ROSSONI³, MARIA DAS GRAÇAS CARDOSO⁴, ROBERTA
HILSDORF PICCOLI⁵

RESUMO: As plantas apresentam diversas vias metabólicas secundárias que levam à formação de compostos, cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou mesmo espécies. Diversos estudos têm sido realizados com óleos essenciais das mais diversas plantas, e sua atividade antimicrobiana frente a microrganismos patógenos e deterioradores, tem sido comprovada. O presente estudo objetivou determinar *in vitro* a Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* (Cravo da Índia), *Origanum vulgare* (Orégano) e *Salvia officinalis* (Sálvia), sobre *Staphylococcus* ATCC 25923. A extração dos óleos foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando aparelho de Cleverger modificado. A metodologia empregada para análise da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi realizada pelo método de difusão cavidade ágar. O óleo essencial de *S. aromaticum* foi o que obteve melhor resposta antimicrobiana dentre todos os óleos testados, com MIC de 1,56%. O óleo de *O. vulgare* apresentou atividade antibacteriana com MIC de 3,12%. O óleo de *S. officinalis* foi o menos efetivo (12,5%) sobre *S. aureus*.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, óleo essencial, *Staphylococcus aureus*

INTRODUÇÃO

As plantas apresentam diversas vias metabólicas secundárias que levam à formação de compostos, cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou mesmo espécies. O conjunto de compostos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a formação e eliminação desses compostos durante seu crescimento, sendo esse equilíbrio influenciado por fatores genéticos (que são fixos) e ambientais como luz, temperatura, tipo de solo e água, os quais são variáveis. Compostos secundários são constituídos de substâncias que agem na preservação da integridade das plantas e podem ser separados de acordo com as estruturas químicas em vários grupos, dentre eles os óleos essenciais (Cardoso et. al., 2000).

Diversos estudos têm sido realizados com óleos essenciais das mais diversas plantas, e sua atividade antimicrobiana frente a microrganismos patógenos e deterioradores, tem sido comprovada (Pereira et. al., 2008, Gutierrez et. al., 2008).

Os óleos essenciais danificam vários sistemas enzimáticos, inclusive envolvidos na produção de energia celular na síntese de compostos estruturais. A presença destes interfere também com o mecanismo de reparo necessário para a divisão celular. Sugere-se, ainda, que o tratamento térmico cause danos ou lesões na membrana citoplasmática, permitindo que os componentes antimicrobianos dos óleos migrem mais rapidamente para o interior da célula, alterando o metabolismo normal (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008).

O presente estudo objetivou determinar *in vitro* a Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* (Cravo da Índia), *Origanum vulgare* (Orégano) e *Salvia officinalis* (Sálvia), sobre *Staphylococcus* ATCC 25923.

1. Mestranda em Microbiologia Agrícola, DBI/UFLA, alessandrasalimena@yahoo.com.br

2. Mestrando em Ciência dos Alimentos, DCA/UFLA, junincs@ufla.br

3. Mestrando em Estatística e Experimentação Agropecuária, DEX/UFLA, diogo.rossoni@gmail.com

4. Professora Associada, DQI/UFLA, mcardoso@ufla.br

5. Professora Adjunto, DCA/UFLA, rhpicoli@dca.ufla.br

METODOLOGIA

Locais de execução do experimento

A análise referente à extração dos óleos essenciais dos materiais vegetais foi realizada no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química (DQI). A avaliação do efeito antimicrobiano dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA). Ambos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Extração dos óleos essenciais

A extração dos óleos foi realizada empregando-se o método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado. Os espécimes vegetais, após imersão em água, foram submetidos ao aquecimento, mantidos sob ebulição por um período de 2 horas. Posteriormente, foi coletado o hidrolato (água + óleo), o qual foi submetido à centrifugação em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36xG por 5 minutos, afim de se obter a separação da fase orgânica e aquosa. Os óleos foram armazenados em frascos de vidro envoltos por papel alumínio e acondicionados ao abrigo de luz, sob temperatura de 7°C durante todo o experimento.

Microrganismo utilizado e padronização do inóculo

O microrganismo foi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A bactéria foi cultivada em microtubos contendo caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) e incubada, por 24 horas, a 37°C. Após o cultivo, 1 mL da cultura foi transferido para microtubos estéreis e centrifugado. Posteriormente retirou-se o sobrenadante e o conteúdo foi recoberto com meio de congelamento e acondicionado em temperatura de -18°C.

A padronização foi realizada por meio da elaboração de curva de crescimento. O desenvolvimento do microrganismo, em meio de cultivo caldo TSB foi monitorado por espectrometria através da evolução da densidade ótica a 600 nm e contagem direta em placas contendo TSA (*Tryptic Soy Agar*). Este procedimento garantiu o controle do número de unidades formadoras de colônia (UFC) no inóculo da cultura reveladora.

Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A metodologia empregada para análise da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi a difusão em cavidade feita em ágar, segundo Mendonça (2004), com algumas modificações. Inicialmente uma fina camada de ágar foi adicionada às placas, e após a solidificação, esferas de vidro (estéreis) com 3 mm de diâmetro foram posicionadas sobre o meio sólido. Alíquotas precisas (3,0 mL) da cultura de *S. aureus*, crescida e previamente padronizada com auxílio da curva de crescimento, foram transferidas para Erlenmeyers contendo 200 mL de ágar TSA a uma temperatura de 37°C obtendo-se uma concentração de 10⁷ UFC/mL na cultura reveladora assim este conteúdo semi-sólido contaminado foi então depositado sobre a camada solidificada. Após a solidificação, as esferas foram retiradas com auxílio de pinças estéreis, para formação dos “micropoços” ou *slots* onde os óleos diluídos em DMSO (Dimetil sulfóxido) nas seguintes concentrações expressas em %(v/v): 0; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50, foram depositados. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e, após esse período, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição formados.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 9 x 3 (concentrações x óleos essenciais), com três repetições.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2003).

RESULTADOS

Como pode ser analisado pelos dados da Tabela 1, observa-se a formação de halo inibitório sobre *S. aureus* em pelo menos 6 das 9 concentrações testadas, o que evidencia a ação antimicrobiana destes óleos. No geral, verifica-se que as maiores concentrações de óleo levaram à formação de halos inibitórios também maiores e isto provavelmente, resultou da maior concentração do princípio ativo.

O óleo essencial de *S. aromaticum* foi o que obteve melhor resposta antimicrobiana dentre todos os óleos testados, com MIC de 1,56%. O óleo de *O. vulgare* apresentou atividade antimicrobiana com MIC de 3,12%. O óleo de *S. officinalis* foi o menos efetivo (12,5%) sobre *S. aureus*.

Craveiro (1981) atribui as excelentes propriedades do *S. aromaticum* ao eugenol, componente majoritário encontrado em 80-90% do óleo essencial desta planta. O eugenol provoca inibição na produção de amilase e proteases pela célula, bem como sua deterioração e lise.

TABELA 1. Diâmetro médio dos halos de inibição, formados em função das diferentes concentrações dos óleos essenciais das espécies vegetais, sobre *Staphylococcus aureus*.

Concentrações % (v/v)	Óleos Essenciais		
	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Salvia officinalis</i>
0,39	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
0,78	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
1,56	4,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
3,12	5,33 ± 0,57 ^a	3,33 ± 2,88 ^b	0,00 ± 0,00 ^c
6,25	6,33 ± 0,57 ^a	5,66 ± 0,57 ^b	0,00 ± 0,00 ^c
12,50	7,66 ± 1,15 ^a	8,00 ± 1,00 ^b	4,33 ± 3,78 ^c
25,00	8,00 ± 1,00 ^a	10,00 ± 0,00 ^b	5,66 ± 0,57 ^c
50,00	9,66 ± 1,52 ^a	11,33 ± 1,15 ^b	6,66 ± 0,57 ^c

*Resultados expressos pela média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm) ± o desvio padrão. Médias seguidas de diferentes letras na mesma linha diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O óleo de *S. aromaticum* quando testado em vários meios de cultivo, demonstrou propriedades antimicrobianas e mostrou inibir o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *S. aureus*, acreditando-se que sua elevada atividade biocida ocorra pela presença de eugenol, componente majoritário deste óleo (Beuchat, 2000).

Resultados semelhantes, foram encontrados por estudos realizados com *S. aureus*, Farag et al. (1989), Smith-Palmer et al. (1998) e Hammer et al. (1999), no qual obtiveram boa inibição *in vitro* deste microrganismo pelo óleo essencial de cravo da Índia. Pereira et al. (2008), em seu trabalho avaliaram os óleos essenciais de *O. vulgare* e *S. aromaticum* e concluíram que estes também apresentaram efeito inibitório sobre as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram boa atividade antibacteriana dos óleos essenciais testados sobre a bactéria patogênica *S. aureus*. O óleo essencial de *S. aromaticum* foi o mais efetivo na inibição dos microrganismos, seguido pelos óleos de *O. vulgare* e, por último, *S. officinalis*. Dessa forma, os óleos essenciais referidos neste estudo, foram promissores quanto à atividade antimicrobiana sobre o microrganismo patogênico e deteriorador *Staphylococcus aureus*. O presente trabalho sugere estudos futuros quanto à potencialidade antimicrobiana destes óleos essenciais sobre outras linhagens de microrganismos patogênicos e deterioradores.

Instituições de fomento: **FAPEMIG, CNPq e CAPES**

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 46, n. 2, p. 446–475, sep. 2008.

BEUCHAT, L. R. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. In C. L. Wilson & S. Droby (Eds.), **Microbial food contamination** (pp. 149–169). Boca Raton, FL: CRC Press, 2000.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**. v.94, p.223– 253, 2004.

CARDOSO, M. das G.; GAVILANES, M. L.; MARQUES, M. C. S.; SHAN, A. Y. K. V.; SANTOS, B. R.; OLIVEIRA, A. C. B. de; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, A. P. S. **Óleos essenciais**. Lavras: Universidade Federal de Lavras - Pró-Reitoria de Extensão, 2000. 42 p.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: edições UFC, 1981. 210 p.

FARAG, R. S.; DAW, Z. Y.; ABO-RAYA, S. H. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflotoxins in a sunthetic medium. **Journal Food Science**, Chicago, n. 1, v. 54, p. 74-76, Jan/Feb. 1989.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**. –Sistema de análise de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos Versão 4.6. Lavras: DEX/UFLA, 2003. Software

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology** v.124, p.91-97, 2008

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, n. 6, v. 86, p. 985-990, June 1999.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 72 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G., SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**., Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun., 2008.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Food Microbiology**, Oxford, n. 2, v. 26, p. 118-122, Feb 1998.