

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Listeria monocytogenes***

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

RESUMO: Nos dias atuais, com a tendência do mercado em utilizar produtos naturais, destacam-se os agentes antimicrobianos naturais, extraídos de plantas como os óleos essenciais, também conhecidos por óleos voláteis, etéreos ou essências, obtidos de partes de plantas pela hidrodestilação ou outros métodos. Diversos estudos têm sido realizados com óleos essenciais das mais diversas plantas, e sua atividade antimicrobiana frente a microrganismos patogênicos 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 *Ocimum basilicum* (Manjeriço), sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117. A extração dos óleos foi realizada empregando-se o método de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado. O óleo essencial de *S. aromaticum* foi o que obteve melhor resposta antimicrobiana dentre todos os óleos testados, com um MIC de 0,78%. O óleo de *O. vulgare* apresentou atividade antimicrobiana com um MIC de 3,12%. O óleo de *O. basilicum* foi o menos efetivo sobre *L. monocytogenes*, com concentração mínima inibitória de 25%. Dessa forma, os óleos essenciais referidos neste estudo, foram promissores quanto à atividade antimicrobiana sobre o microrganismo patogênico e deteriorador *Listeria monocytogenes*. O presente trabalho sugere estudos futuros quanto à potencialidade antimicrobiana destes óleos essenciais sobre outras linhagens de microrganismos patogênicos e deterioradores.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, óleo essencial, *Listeria monocytogenes*

INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, com a tendência do mercado em utilizar produtos naturais, destacam-se os agentes antimicrobianos naturais, extraídos de plantas como os óleos essenciais, também conhecidos por óleos voláteis, etéreos ou essências, obtidos de partes de plantas pela hidrodestilação ou outros métodos. Estes são misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, cujas principais características são a volatilidade e o aroma intenso (Santos, 2008).

A utilização de óleos essenciais para conservação de alimentos e controle fitossanitário vem sendo muito estudada, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e microrganismos causadores de grandes prejuízos às indústrias alimentícias (Sasidharan et al., 2008).

Diversos estudos estão sendo realizados com óleos essenciais das mais variadas plantas, e sua atividade antimicrobiana sobre microrganismos patogênicos e deterioradores, têm sido comprovada (Pereira et al., 2008; Gutierrez et al., 2008).

Estima-se que milhares de pessoas tenham problemas com produtos alimentícios contaminados. Desse modo o uso de aditivos que visam reduzir ou eliminar a contaminação de alimentos por agentes patogênicos e deterioradores tem possibilitado importantes avanços relacionados à saúde pública.

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 Adjunta, DCA/UFLA, rhpicoli@dca.ufla.br

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 *Ocimum basilicum* (Manjeriço), sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117.

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 *Listeria monocytogenes* ATCC 19117. 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 *L. monocytogenes*, 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; 25,0 e 50,0, 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 *L. monocytogenes* em pelo menos 7 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 um MIC de 0,78%. O óleo de *O. vulgare* apresentou atividade antimicrobiana com um MIC de 3,12%. O óleo de *O. basilicum* foi o menos efetivo sobre *L. monocytogenes*, com concentração mínima inibitória de 25%.

TABELA 1. Diâmetro médio dos halos de inibição, formados em função das diferentes concentrações de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum*, sobre *Listeria monocytogenes*.

| Concentrações % (v/v) | Óleo Essencial | | |
|--------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | <i>Syzygium aromaticum</i> | <i>Origanum vulgare</i> | <i>Ocimum basilicum</i> |
| 0,39 | 0,00 ± 0,00 ^a | 0,00 ± 0,00 ^a | 0,00 ± 0,00 ^a |
| 0,78 | 4,30 ± 0,00 ^a | 0,00 ± 0,00 ^b | 0,00 ± 0,00 ^b |
| 1,56 | 4,83 ± 0,28 ^a | 0,00 ± 0,00 ^b | 0,00 ± 0,00 ^b |
| 3,12 | 5,13 ± 0,25 ^a | 4,66 ± 0,61 ^b | 0,00 ± 0,00 ^c |
| 6,25 | 6,10 ± 0,30 ^a | 5,76 ± 0,20 ^b | 0,00 ± 0,00 ^c |
| 12,50 | 6,43 ± 0,97 ^a | 7,06 ± 0,11 ^b | 0,00 ± 0,00 ^c |
| 25,00 | 6,83 ± 0,55 ^a | 7,83 ± 0,80 ^b | 4,30 ± 0,20 ^c |
| 50,00 | 6,33 ± 0,20 ^a | 8,40 ± 0,79 ^b | 4,40 ± 0,00 ^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.

A bactéria utilizada neste estudo, *L. monocytogenes*, é Gram positiva, o que pode facilitar a ação dos óleos, ou seja, há maior incorporação do aditivo na parede celular (Harpaz et al., 2003). Em estudo usando o mesmo teste realizado *in vitro*, Dorman & Deans (2000) utilizaram óleos essenciais de cravo da Índia, orégano, gerânio e pimenta, para avaliar suas atividades sobre 25 espécies de bactérias Gram positivas e negativas. Esses autores observaram que bactérias Gram positivas realmente eram mais suscetíveis aos óleos essenciais estudados do que as Gram negativas.

O óleo extraído da espécie *S. aromaticum* apresentou significativa atividade antimicrobiana sobre as culturas reveladoras, apresentando halos inibitórios maiores em “slots” com concentrações menos diluídas. Craveiro (1981) atribui as excelentes propriedades do cravo da Índia ao eugenol, componente majoritário encontrado em 80-90% do óleo essencial desta planta.

O eugenol, principal constituinte químico dos óleos essenciais da espécie *S. aromaticum* (Oussalah et al., 2007), exibe comprovadas atividades como antimicrobiano, anti-inflamatório, anestésico, anti-séptico, antioxidante e repelente (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

CONCLUSÃO:

Os resultados obtidos demonstram boa atividade antimicrobiana dos óleos essenciais testados sobre a bactéria patogênica *L. monocytogenes*. O óleo essencial de *S. aromaticum* foi o mais efetivo na inibição dos microrganismos, seguido pelos óleos de *O. vulgare* e, por último, *O. basilicum*. Dessa forma, os óleos essenciais referidos neste estudo, foram promissores quanto à atividade antimicrobiana sobre o microrganismo patogênico e deteriorador *Listeria monocytogenes*. 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

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.

DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v.5, p.165–180, 1987.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, Feb. 2000.

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.

GOBBO-NETO L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

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.

HARPAZ, S.; GLATMAN, L.; DRABKIN, V.; GELMAN, A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of fresh water reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**. Ames, v. 66, n. 3, p. 410-417, Mar. 2003.

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.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimutium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

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.

SASIDHARAN S.; ZURAINI Z.; YOGA LATHA L.; SNGETHA S.; SURYANI S. Antimicrobial activities of *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC extracts. **Foodborne Pathogens Disease** v.5, p.303-309, 2008.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; SASIDHARAN, S.; ZURAINI, Z.; YOGA, L. L.; SNGETHA, S., SURYANI, S. Antimicrobial activities of *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC extracts. **Foodborne Pathogens Disease**, v. 5, p. 303-309, 2008.