

**AValiação da Atividade Antimicrobiana *in vitro* dos Óleos Essenciais
Thymus vulgaris, *Piper nigrum* L. e *Citrus limon* (L.) *Burm.f.* Sobre *Staphylococcus aureus***

ALEXANDRE CRISTIANO SANTOS JÚNIOR¹, ALESSANDRA PEREIRA SANT'ANNA
SALIMENA², ROBERTA HILSDORF PICCOLI³,

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (Tomilho), *Piper nigrum* L. (Pimenta do Reino) e *Citrus limon* (L.) *Burm.f.* (Limão Siciliano), sobre *Staphylococcus aureus*. A metodologia para análise da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi a de Difusão em Disco, através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (MICs) pela formação de halos inibitórios. As análises foram realizadas em triplicata e estatística dos dados com auxílio do programa SISVAR. O óleo essencial de Tomilho obteve uma boa resposta antimicrobiana, ou seja, formação de halos inibitórios em todas as concentrações utilizadas, dentre os três óleos testados, apresentando MIC de 0,39%, já os óleos de Pimenta do Reino e Limão Siciliano não foram efetivos contra o *S.aureus* por não apresentarem formação de halos inibitórios em nenhuma concentrações utilizadas. Dessa forma, o óleo essencial de Tomilho é um antimicrobiano promissor no combate ao *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chaves: Óleos essenciais, Atividade antimicrobiana, *Staphylococcus aureus*

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas originadas do metabolismo secundário vegetal, obtidos por processos físicos adequados (Simões & Spitzer, 2004). Diversos estudos têm demonstrado e comprovado que os óleos essenciais das mais diversas plantas apresentam atividade antimicrobiana sobre vários microrganismos patogênicos e deterioradores (Pereira et. al., 2008; Gutierrez et. al., 2008). Dentre esses microrganismos, merecem atenção especial as bactérias do gênero *Staphylococcus*, em que tem sido testado *in vitro* o potencial antimicrobiano de vários óleos essenciais extraídos de matéria vegetal, e estes vem apresentando resultados de destaque, como hábil agente de inibição de bactérias e fungos contaminantes de alimentos (López et al., 2005, Trajano et al., 2009).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo verificar a atividade antimicrobiana e determinar a concentração mínima inibitória (MIC) dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (Tomilho), *Piper nigrum* L. (Pimenta do Reino) e *Citrus limon* (L.) *Burm.f.* (Limão Siciliano) sobre *Staphylococcus aureus*.

¹ Mestrando em Ciência dos Alimentos, DCA/ UFLA, junincsj@yahoo.com.br

² Mestranda em Microbiologia Agrícola, DBI/UFLA, alessandrasalimena@yahoo.com.br

³ Professora Adjunto, DCA/UFLA, rhpicoli@ufla.br

MATERIAL E MÉTODOS

A bactéria utilizada neste estudo foi *S. aureus* ATCC 25923. A metodologia para análise da atividade antimicrobiana dos OEs foi Difusão em Disco (NCCLS, 2000). A cepa de *S. aureus* foi reativada em meio TSB (Tryptic Soy Broth) e cultivada até atingir a concentração de 10^8 UFC/mL sendo monitorada por espectrometria a 600 nm e contagem direta em placas. Ágar TSA (Tryptic Soy Agar) contaminado com a concentração de 10^8 UFC/mL, foi depositado em placas de petri estéreis, e após a solidificação discos de papel estéreis com 6 mm de diâmetro foram posicionados sobre o meio. Os OEs de *Thymus vulgaris* (Tomilho), *Piper nigrum* L. (Pimenta do Reino) e *Citrus limon* (L.) Burm.f. (Limão Siciliano) foram diluídos em etanol nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39%, e 5 µl de cada concentração foi depositado sobre os discos de papel. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e em seguida foi aferido o diâmetro (mm) dos halos inibitórios formados, sendo possível indicar a suscetibilidade do *S. aureus* aos OEs testados e determinação da Concentração Mínima Inibitória (MICs).

As análises foram realizadas em triplicata e estatística dos dados com auxílio do programa SISVAR (Ferreira, 2000). Análise de variância das médias das concentrações dos diferentes óleos foi realizada e submetidas a teste comparativo, Tukey a (0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diâmetro médio dos halos inibitórios dos três óleos testados está apresentado na Tabela 1. A formação de halos inibitórios sobre o *S. aureus* foi observado apenas em um dos três óleos testados.

TABELA 1 Diâmetro médio dos halos de inibição, formados em função das diferentes concentrações de óleo essencial de *T. vulgaris* (Tomilho), *P. nigrum* L. (Pimenta do Reino) e *C. limon* (L.) Burm.f. (Limão Siciliano), sobre *S. aureus*.

Concentrações % (v/v)	Óleo Essencial		
	Tomilho	Pimenta do Reino	Limão Siciliano
0,39	8,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
0,78	8,66 ± 0,57 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
1,56	8,66 ± 0,57 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
3,12	10,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
6,25	12,00 ± 1,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
12,50	17,00 ± 1,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
25,00	30,00 ± 1,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
50,00	38,00 ± 1,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b

*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 essencial de Tomilho foi o único que obteve resposta antimicrobiana, ou seja formação de halos inibitórios em todas as concentrações dentre os três óleos testados, com MIC de 0,39%, já OEs de Pimenta do Reino e Limão Siciliano não foram efetivos contra o *S. aureus*, por não apresentarem formação de halos inibitórios em nenhuma concentrações utilizadas.

Devido ao grande número de componentes, óleos essenciais parecem não ter objetivos específicos na célula (Carson et al., 2002). Como lipofílicos típicos, passam através da parede celular e da membrana citoplasmática, desestabilizando estruturas como camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios, tornando esta membrana mais permeável. Em bactérias, esta permeabilização das membranas está associada com perda de íons e à redução do potencial de membrana, levando a um colapso da bomba de prótons e depleção do pool de ATP (Ultee et al., 2000, 2002; Di Pasqua et al., 2006; Turina et al., 2006). Estes danos à parede celular e na membrana podem levar ao vazamento de macromoléculas e à lise celular (Cox et al., 2000, Lambert et al., 2001; Oussalah et al., 2006). Além disso, os óleos essenciais podem induzir a coagulação do citoplasma e provocarem danos aos lipídios e proteínas intracelulares (Ultee et al., 2002; Burt, 2004).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram uma atividade antimicrobiana somente do óleo essencial de Tomilho sobre *Staphylococcus aureus*. Os óleos essenciais de Pimenta do Reino e Limão Siciliano não foram efetivos. Dessa forma, o óleo essencial de Tomilho é um antimicrobiano promissor no combate ao *Staphylococcus aureus*.

AGRADECIMENTOS

A financiadores do projeto: CAPES, FAPEMIG e CNPq

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **Int. J. Food Microbiol.** 94, 223–253. 2004.

CARSON, C.F., MEE, B.J., RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electronmicroscopy. **Antimicrob. Agents Chemother.** 46, 1914–1920. 2002.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARHAM, J. L. The mode of antibacterial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J Appl Microbiol** 170-175. 2000.

DI PASQUA, R., HOSKINS, N., BETTS, G., MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **J. Agric. Food Chem.** 54, 2745– 2749. 2006.

FERREIRA, D. F. SISVAR. Lavras: UFLA, 2000.

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.

LAMBERT, R. J.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J Appl Microbiol** 91: 453-462. 2001.

LÓPEZ, P. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.17, p. 6939-6946, 2005.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 2000.

OUSSALAH, M., CAILLET, S., LACROIX, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** 69, 1046–1055.2006.

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.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 467-495.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R.; Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 29(3): 542-545, jul.-set. 2009.

TURINA, A.V., NOLAN, M.V., ZYGADLO, J.A., PERILLO, M.A Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophys. Chem.**122, 101–113. . 2006.

ULTEE, A., KETS, E.P., ALBERDA, M., HOEKSTRA, F.A., SMID, E.J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Arch. Microbiol.** 174, 233–238. 2000.

ULTEE, A., BENNIK, M.H., MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl. Environ.Microbiol.** 68, 1561–1568. 2002.