

ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS POR ARRASTE A VAPOR

MICROBIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OBTAINED BY STEAM DRAG

ANGELA APARECIDA DA SILVA¹, LUCIMARA BERGAMO^{2*}, LÍRIA PAULA DE CAMARGO³, CAMILA FERNANDES³, DIENIFER MUSSATO³, DANIELE CANAZART³, BENÍCIO ALVES DE ABREU FILHO⁴

1. Mestranda em Ciência de Alimentos – UEM; 2. Doutora em Ciências pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) e Professora Adjunta da Faculdade Ingá; 3. Biólogas pela Fundação Centro Universitário de Mandaguari-FAFIMAN/UNIMAN; 4. Professor Associado do Departamento de Ciências Básicas da Saúde – UEM.

* Rua Esmeralda, 698, Jardim Real, Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87083-040. lucimarabergpan@hotmail.com

Recebido em 06/11/2014. Aceito para publicação em 25/11/2014

RESUMO

Os óleos essenciais são bons agentes antibacterianos, por isso torna-se necessário pesquisas que avaliem metodologias práticas e fáceis para extração de tais substâncias, bem como sua ação frente às bactérias que possam causar danos e/ou prejuízos ao homem. Objetivou-se neste trabalho, portanto, usar a destilação por arraste a vapor para extrair alguns óleos essenciais e, posteriormente testar sua eficiência antibacteriana frente à *Escherichia coli* ATCC 25922 (susceptível a oxaciclina e penicilina) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (beta-lactamase negativa). O método de extração utilizado foi o arraste a vapor e os óleos extraídos foram o de *Syzygium aromaticum* (botões do cravo-da-índia), *Zingiber officinale* (rizoma gengibre), *Citrus aurantifolia* (casca do limão taiti) e *Eucalyptus globulus* Labill (folhas do eucalipto). Os testes de avaliação microbiológica dos óleos essenciais foram realizados através de ensaios do disco-difusão. A partir dos resultados preliminares colhidos na primeira etapa da avaliação antibacteriana dos óleos essenciais, foi possível selecionar o que obteve melhores resultados, sendo assim avaliadas, através do ensaio da microdiluição seriada, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os resultados para ambos ensaios mostraram-se satisfatórios, indicando a eficácia dos óleos essenciais aqui avaliados. Concluiu-se que os óleos essenciais extraídos possuem potencial efeito antibacteriano.

PALAVRAS-CHAVE: Agente antibacteriano, óleos essenciais, susceptibilidade bacteriana, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Essential The banana is a fruit well accepted by the population; however, Brazil still loses much of this food after harvesting. One way to prevent losses is to use raw banana. Besides being a cheap food is also highly nutritious. Represents an energy source due to the presence of carbohydrates besides being a source of vitamins and minerals. However, both are present in greater quantity when the fruit is still green. One of the ways to use the raw fruit is producing a biomass through cooking bananas with the peels. The cooked fruit pulp consists of a paste that thickener acts as excellent and does not alter the taste of food, but enriched with minerals,

vitamins and fibers, also a source of resistant starch. Resistant starch is not digested by the digestive process and thus presents some actions beneficial to the body, among them we can mention: effects on glycemic response; fiber source; colonic fermentation by bifid bacteria; production of short chain fatty acids (SCFA); increased stool; prevention of intestinal colon cancer among others.

KEYWORDS: Antibacterial agent, essential oils, bacterial susceptibility, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias são organismos unicelulares de grande importância nos processos evolutivos da vida no planeta. Existem muitos processos que seriam inviáveis ou até mesmo impossíveis de ocorrer sem o auxílio destes microrganismos. Entre os benefícios relacionados aos micro-organismos podem ser citados as bactérias presentes no intestino dos mamíferos que desempenham funções em processos metabólicos de substâncias essenciais^{1,2,3}, e aquelas que são utilizadas em processos industriais como na produção de derivados lácteos e de alimentos fermentados⁴. Podemos encontrar ainda o uso de bactérias na medicina^{5,6} (produção de antibióticos e bacteriocinas), na área ambiental^{7,8}, na biotecnologia⁹ (alimentos transgênicos). Enfim, podemos encontrar diversas aplicações benéficas para estes micro-organismos.

No entanto, existem espécies de bactérias que podem trazer danos a saúde^{10,11} (humana e animal), além daquelas que danificam produtos alimentícios, deixando-os impróprio para o consumo^{12,13}. Muitas vezes, o controle do crescimento bacteriano torna-se inviável ou até mesmo impossível. Este fato muitas vezes está relacionado à capacidade que os micro-organismos possuem em adquirir resistência as mais variadas formas de tratamento, tanto físico como químico. Conforme a NCCLS¹⁴, a resistência bacteriana pode estar relacionada à produção de enzimas que inativam as drogas, a alterações do sítio-alvo das drogas e a alterações da absorção ou do efluxo das drogas.

Outro fator que vem contribuindo para o aumento da resistência bacteriana é a utilização indiscriminada de agentes antimicrobianos que favorecem a seleção dos mais bem adaptados, dificultando assim, o controle do crescimento e desenvolvimento microbiano¹⁵. Por este motivo existem muitas pesquisas que buscam fontes alternativas que possam auxiliar na prevenção ou eliminação destes agentes patogênicos e/ou deteriorante.

Os óleos essenciais (OEs) podem ser utilizados no combate ao crescimento e desenvolvimento dos micro-organismos. No entanto, um grande número de OEs apresenta ação *in vitro* contra os micro-organismos, mas em menor proporção nos alimentos¹⁶.

Outro fato que favorece o aumento de pesquisas voltadas na utilização de OEs como agente antimicrobiano, é a mudança de comportamento dos consumidores, que buscam cada vez mais, por produtos de origem naturais e/ou com o mínimo possível de aditivos e conservantes.

Os OEs são ésteres orgânicos de origem vegetal com função de proteção contra agentes que possam prejudicar seu próprio desenvolvimento. Portanto, são utilizados pelos vegetais como função de defesa contra pragas e patógenos, podem ser extraídos das folhas, cascas, flores, frutos, brotos e sementes¹⁷. São utilizados por muito tempo por possuírem aromas e sabores agradáveis.

As atividades dos OEs podem estar relacionadas aos seus constituintes químicos como os fenóis, alcoóis, aldeídos, cetonas, éteres, hidrocarbonetos¹⁷, terpenóides, ácidos, ésteres, em algumas vezes podem ser encontrado compostos contendo nitrogênio e enxofre, cumarinas e homólogos de fenilpropanóides¹⁸. Estas associações e variedades de grupos funcionais podem exercer função sinérgica entre os constituintes dos OEs.

Devido a sua volatilidade podem ser utilizados como agente desinfetante no ar, além de possuir grande potencial de aplicação em processos alimentares por ter ação antimicrobiana e antioxidante¹⁸.

Esta pesquisa teve como objetivo, portanto, empregar a metodologia por arraste a vapor na extração dos OEs de *Syzygium aromaticum* (botões do cravo-da-índia), *Zingiber officinale* (rizoma gengibre), *Citrus aurantifolia* (casca do limão taiti) e *Eucalyptus globulus* Labill (folhas do eucalipto), assim como avaliar a ação antibacteriana dos mesmos frente à *Escherichia coli* ATCC 25922 (susceptível a oxaciclina e penicilina) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (beta-lactamase negativa).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Extração dos óleos essenciais

Os OEs *Syzygium aromaticum* (botões do cravo-da-índia), *Zingiber officinale* (rizoma gengibre), *Citrus aurantifolia* (casca do limão taiti) e *Eucalyptus globulus* Labill (folhas do eucalipto) foram extraídos no

Laboratório de Bioquímica da Faculdade Fundação Centro Universitário de Mandaguari-Uninam/Fafiman.

A metodologia utilizada neste trabalho para extração dos OEs foi semelhante à empregada por Behbahani¹⁹ *et al.*, no qual utilizaram a técnica da hidrodestilação. A destilação por arraste a vapor dos OEs foram realizadas em equipamentos/aparelhagens demonstrados na figura 1, sendo este o método mais utilizado na extração dos OEs comerciais¹⁶, por ser uma metodologia simples.

O primeiro balão (1) serviu como gerador de vapor, que está conectado a um segundo balão (2) de destilação onde estão contidas as amostras para a extração do OE. Conectado ao segundo balão, encontra-se um condensador (3) e a este um frasco coletor da amostra (4).

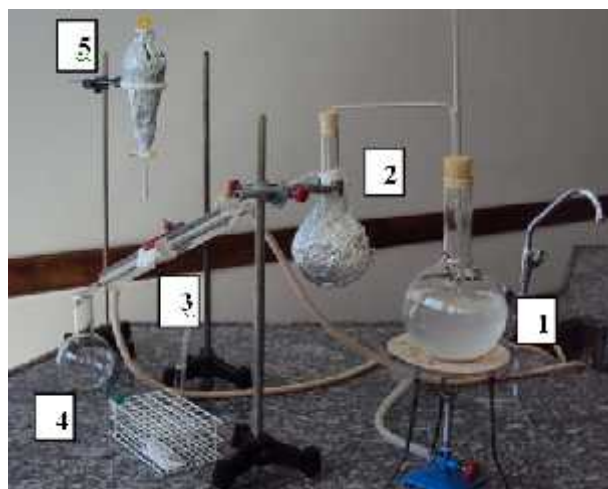


Figura 1. Aparelhagem/Etapas da destilação por arraste a vapor usada na extração dos óleos essenciais

Inicialmente, foi colocado no balão gerador de vapor, um volume de água correspondente a aproximadamente 60% de sua capacidade (600 mL) com pequenos pedaços de porcelana/vidro (para evitar a ebulição tumultuosa), observando o tubo de segurança para controle do excesso de pressão.

Em seguida, foi transferida a amostra com 10% de água no balão de destilação (coberto com papel alumínio) para evitar uma condensação excessiva do vapor que entra em contato com a água ali contida.

O aquecimento do balão gerador de vapor foi controlado de modo que, a taxa de gotejamento do destilado permanecesse entre aproximadamente 1 gota a cada 5 segundos. A destilação foi continuada até que todo material orgânico volátil fosse arrastado, isto é, até que se destilasse apenas água. Para se assegurar que o destilado apresentava apenas uma fase, coletou-se uma alíquota em um tubo de ensaio e, observando-se a presença das fases, caso fosse observada duas fases, prosseguia-se com a destilação.

Após recolhimento do extrato contendo o OE no frasco coletor, o mesmo foi transferido para um funil de separação ou decantação (Figura 1- etapa 5), onde pro-

cedeu-se a separação das duas fases, orgânica e aquosa.

Para facilitar a separação da mistura heterogênea, acrescentou-se a ela éter etílico que interage com o óleo devido as suas propriedades físico-químicas, aumentando a diferença das fases (água e óleo). Por fim, através de um funil de decantação, foram separadas as misturas, e realizada a evaporação do solvente, restando apenas o OE desejado. A fase orgânica foi transferida para recipientes fechados e vedados contra a luz, onde foi devidamente identificada e armazenada sob baixa temperatura até as análises, evitando-se assim modificações em sua composição¹⁶.

Meio de cultura

Para os ensaios de susceptibilidade antimicrobiana, utilizou-se o meio de cultura Agar Mueller Hinton (Difco) e Caldo Mueller Hinton (Difco) conforme estabelecido pela CLSI²⁰, sendo estes adquiridos comercialmente e preparados conforme normas do fabricante.

O Agar Mueller Hinton, logo após seu preparo foi esterilizado em autoclave a 121 °C/15 minutos e resfriado em banho-maria até chegar à temperatura de 50 °C. Logo após seu resfriamento, foi vertido assepticamente em placas de Petri. O Caldo Mueller Hinton foi preparado e vazado em tubos de ensaio e esterilizados em autoclave a 121 °C/15 minutos. Os dois meios de cultura passaram pelo controle de esterilidade a 37 °C/24 horas. Após estas etapas foram armazenados em ambiente refrigerado a 2-5 °C para uso posterior.

Preparação do inóculo e suspensão bacteriana

Nos ensaios de susceptibilidade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 (susceptível a oxaciclina e penicilina) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (beta-lactamase negativa) adquiridas no banco de micro-organismos do laboratório de microbiologia.

Para o ensaio utilizando a metodologia do disco-difusão, o inóculo bacteriano foi padronizado e preparado conforme CLSI²⁰. Foram transferidas de 3 a 4 colônias em solução salina estéril na concentração de 0,85 %, até adquirir visualmente a turvação padrão 0,5 de McFarland que contém, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Para o ensaio da microdiluição em microplaca seguiu-se as normas estabelecidas pela NCCLS¹⁴. A turvação do inóculo padronizado conforme escala 0,5 de McFarland foi diluído em Caldo Mueller Hinton na proporção 1:10, em seguida acrescentado nos poços da microplaca, onde permaneceu na concentração final de 10^4 UFC/mL.

Todas as suspensões foram preparadas assepticamente e aproximadamente 15 minutos antes de sua utilização.

Avaliação dos óleos essenciais como agente antimicrobiano

Os óleos essenciais (OEs) de *Syzygium aromaticum* (botões do cravo-da-índia), *Zingiber officinale* (rizoma gengibre), *Citrus aurantifolia* (casca do limão taiti) e *Eucalyptus globulus* Labill (folhas do eucalipto), foram primeiramente avaliados pela técnica do disco-difusão, obtendo-se assim, o composto com melhor ação antimicrobiana. A partir deste resultado, o OE pré-selecionado, foi avaliado através da metodologia da microdiluição em microplaca de 96 poços (TPP[®]).

No primeiro ensaio, os OEs *in natura* foram aplicados em discos de papel filtro estéril de 6 mm de diâmetro, sendo adicionado em cada disco um volume de 5 µL para cada OE a ser avaliado. Os discos foram utilizados nos ensaios da avaliação da susceptibilidade microbiana pela técnica de disco-difusão.

Com auxílio de um "swab" estéril embebido na suspensão do inóculo, as bactérias foram semeadas homogênea e uniformemente por toda a placa de Petri. Após este procedimento, foram adicionados sobre a placa de Petri 4 discos de papel filtro espalhados uniformemente, contendo os OEs avaliados. As placas foram incubadas a 37 °C/24 horas para observação da presença dos halos de inibição, para avaliação da ação dos OEs como agente antimicrobiano.

Foi utilizado como controle positivo o antibiótico cloranfenicol (CLO) 30 µg/disco. Todos ensaios foram realizados em triplicata. Os diâmetros dos halos de inibição foram interpretados conforme critérios padronizados pela CLSI²¹.

A presença do halo de inibição indica a sensibilidade da bactéria frente à droga avaliada, é o local em que não houve crescimento bacteriano ao redor do papel filtro (Figura 2). O halo foi medido com paquímetro, na escala de milímetros (mm) verificando-se assim a ação do OE frente à bactéria analisada.

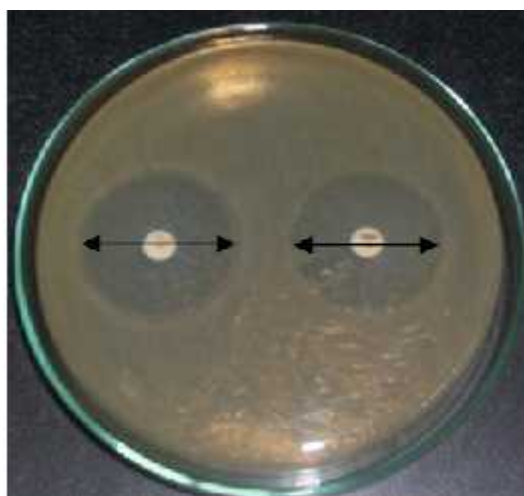


Figura 2. Halo de inibição (↔) utilizando a técnica do disco-difusão.

A partir dos resultados obtidos anteriormente na técnica do disco-difusão, foi selecionado o OE que obteve melhor resultado como agente antimicrobiano, sendo assim, utilizado no ensaio da avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM), através da metodologia da microdiluição em microplaca de 96 poços (TPP®). Esta técnica possibilita identificar qual a concentração mínima necessária do OE capaz de inibir o crescimento (CIM) ou de matar (CBM) o micro-organismo em estudo²².

Para os ensaios da microdiluição em microplaca foi realizada uma diluição do OE em dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% e em seguida misturado ao meio de cultura próprio para preparação da solução do agente antibacteriano²³. Em seguida, foram acrescentados 100 µL do meio de cultura (Caldo Mueller Hinton) em todos os poços. No primeiro poço colocou-se 100 µL da solução do agente antibacteriano preparado anteriormente, e a partir dele iniciaram-se as microdiluições seriadas na proporção 1:2. No final das microdiluições, foram acrescentados 5 µL do inóculo bacteriano preparado anteriormente.

Após o preparo das microdiluições, a placa foi incubada a temperatura de 37 °C por 24 horas. Os poços sem turvação, observados a olho nu, indicaram que a concentração utilizada foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, no qual obtivemos o resultado da CIM (Figura 3).



Figura 3. Microdiluição seriada em microplacas de 96 poços (TPP®) para realização da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

A partir dos poços límpidos foi realizado o microcultivo em placa de Petri com Agar Mueller Hinton e incubados a 37 °C por 24 horas. Neste ensaio podemos avaliar a capacidade do crescimento bacteriano na ausência do OE avaliado.

A ausência do crescimento bacteriano após incubação indica que a concentração utilizada do OE foi capaz de matar a bactéria, chegando-se assim a CBM. Paralelamente, foi realizado o controle positivo, com ausência da substância avaliada para averiguar a taxa de inibição bacteriana nas diferentes concentrações. Todos os

ensaios foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração dos OEs obteve resultados positivos quanto à metodologia empregada neste ensaio (Tabela 1). A amostra que apresentou maior rendimento foram os botões de *S. aromaticum* com 15,93 µL/g. Para o OE de *E. globulus*, *C. aurantifolia* e *Z. officinale*, o rendimento da extração foi 0,53/0,27/0,13 µL/g, respectivamente.

Os OEs possuem princípios bioativos que podem ser utilizados como agente antimicrobiano²⁴ em tratamentos contra micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos^{18,19}. Sua ação pode ter relação com os compostos fenólicos existente em sua composição e em menor proporção com os constituintes de menor concentração, no entanto, as variedades de grupos funcionais podem exercer ação sinérgica entre seus constituintes^{16,17}.

Tabela 1. Quantidade de matéria-prima utilizada na extração, volume de óleo essencial obtido e rendimento da extração

Vegetal	Quantidade Matéria-Prima (g)	Volume da Extração (µL)	Rendimento Extração (µL/g)
<i>Citrus aurantifolia</i>	595	160	0,27
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	374	200	0,53
<i>Syzygium aromaticum</i>	226	3600	15,93
<i>Zingiber officinale</i>	540	70	0,13

Os resultados expressos são valores obtidos das análises em triplicatas.

De acordo com o Código de Regulamentação 21 CRF182.20²⁶, os óleos essenciais, oleorresinas (sem solventes) e extratos naturais (incluindo destilados) são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS - Generally Recognized as Safe) para o uso. Portanto, podem ser utilizados em produtos alimentícios.

Nesta pesquisa, para o ensaio da susceptibilidade antimicrobiana utilizando a técnica do disco-difusão, o OE que apresentou melhores resultados frente aos micro-organismos avaliados foi o *S. aromaticum* em relação aos OEs de *Z. officinale*, *C. aurantifolia* e *E. globulus* Labill (Tabela 2 e figura 4). O halo de inibição para as bactérias *S. aureus* e *E. coli* apresentaram um diâmetro de 18 mm e 16 mm, respectivamente. No trabalho realizado por Moreira²² et al. o OE de *S. aromaticum* avaliado pela técnica da diluição em ágar, apresentou boa ação em diferentes cepas de *E. coli*.

Comparada a atividade antibacteriana do OE de *S. aromaticum* com os controles positivos (antibióticos padrões) cloranfenicol (30 µg/disco), ampicilina (10 µg/disco) e imipenem (10 µg/disco), houve uma atividade equivalente a 55,17%/76,19%/50% frente à *E. coli*

e 62,07%/52,94%/33,96% frente à *S. aureus*, respectivamente (Tabela 2).

Existem muitas pesquisas com o OE de *S. aromaticum*, mostrando aplicações em tratamentos contra giardíase²⁶, candidíase²⁷ e redução de patógenos de origem alimentar²².

Tabela 2 - Medida do halo de inibição em milímetro (mm) no teste de susceptibilidade antimicrobiana utilizando metodologia do disco-difusão

AGENTE ANTIMICROBIANO	<i>Escherichia coli</i> (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)
Óleo Essencial		
<i>Zingiber officinale</i>	9	17
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	6	9
<i>Syzygium aromaticum</i>	16	18
<i>Citrus aurantifolia</i>	10	14
Antibiótico		
Cloranfenicol (30 µg)	29	29
Ampicilina (10 µg)	21	34
Imipenem (10 µg)	32	53

Os resultados expressos são valores obtidos das análises em triplicatas.

Com relação ao OE de *Z. officinale*, *S. aureus* apresentou um halo de inibição de 17 mm de diâmetro e a *E. coli* o halo de inibição foi de 9 mm de diâmetro. Comparado ao controle positivo cloranfenicol (30 µg/disco), ampicilina (10 µg/disco) e imipenem (10 µg/disco) o OE de *Z. officinale* apresentou atividade equivalente a 58,62%/50%/32,08% frente à *S. aureus*, respectivamente. Nos resultados obtidos por Mesomo²⁸ et al., através da técnica da diluição em poço na placa de Petri, a zona de inibição para *S. aureus* foi 8,15 mm, não apresentando inibição frente a *E. coli*. Foi observado que o OE de *Z. officinale* tem melhor efeito frente ao coco Gram-positivo *S. aureus*, quando comparado ao bacilo Gram-negativo *E. coli*.

Em relação ao OE do *C. aurantifolia*, para *S. aureus*, o halo de inibição foi de 14 mm de diâmetro e para *E. coli* foi de 10 mm de diâmetro. No entanto, Pathan²⁹ utilizando extrato hidroalcoólico de *C. aurantifolia* não apresentou efeito frente a *E. coli*, enquanto para *S. aureus* o halo de inibição foi de 12 mm.

O OE do *E. globulus* Labill não apresentou bons resultados frente a *S. aureus* e a *E. coli* comparando ao controle, apresentando um halo de inibição de 9 mm e 6 mm de diâmetro, respectivamente. Apesar de o OE de *E. globulus* Labill não ter apresentado bons resultados nesta ensaio, existem muitas pesquisas que mostram sua eficiência como inseticidas³⁰, fungicida³¹, sendo essa

ação relacionada ao seu constituinte majoritário, o 1,8 cineol.

Conforme Tyagi e Malik³², o OE de *E. globulus*, apresentou um CIM de 4,5 mg/mL e 2,25 mg/mL frente a *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, e também apresentou ação em fungos e leveduras com MICs variando entre 1,13-9,0 mg/mL.

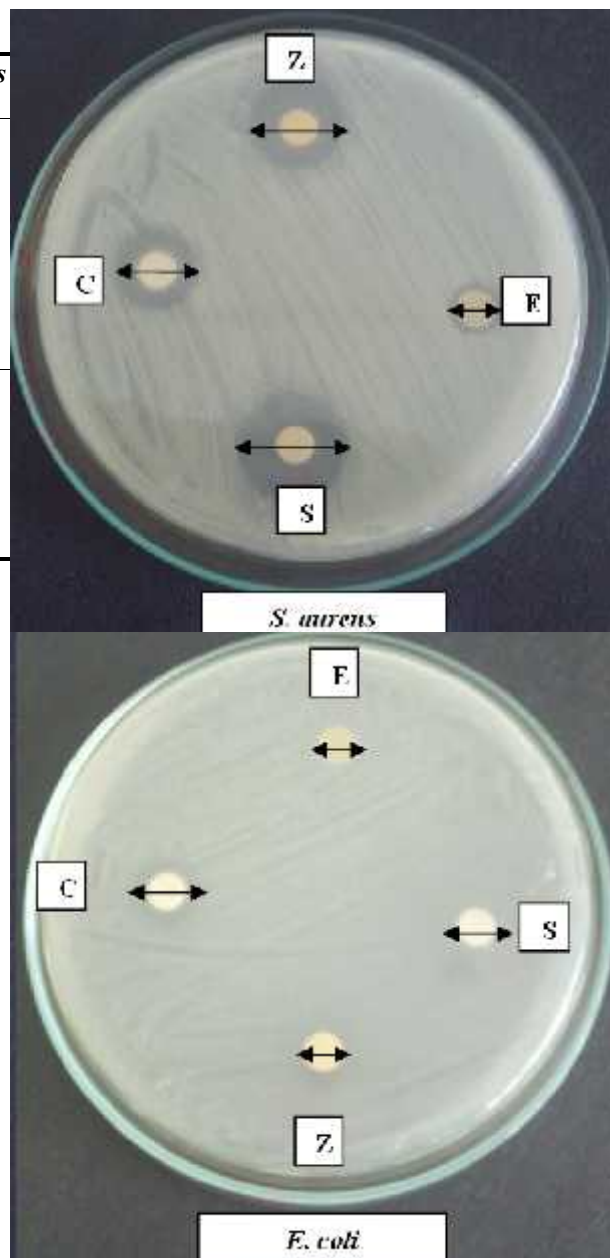


Figura 4. Halo de inibição (↔) observado em placas de Petri contendo culturas dos micro-organismos utilizados no teste de susceptibilidade antimicrobiana utilizando os óleos essenciais de *Zingiber officinale* (Z), *Eucalyptus globulus* Labill (E), *Citrus aurantifolia* (C) e *Syzygium aromaticum* (S).

Pode-se verificar então que todos os OEs avaliados

no ensaio disco-difusão tiveram melhores resultados frente à *S. aureus* comparando à *E. coli*.

Conforme a CLSI/NCCLS³³, a sensibilidade microbiana é referida quando, em tratamentos tradicionais, a droga é capaz de inibir o crescimento bacteriano, já um micro-organismo resistente torna-se mais difícil de ser controlado com utilização de concentrações normalmente indicadas.

O OE do *S. aromaticum* selecionado no ensaio do disco-difusão, foi utilizado no ensaio da microdiluição em microplaca. Os resultados da CIM obtidas neste ensaio, tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus* foi de 550 µg/mL. No entanto, a CBM frente à *E. coli* foi menor em relação a *S. aureus* apresentando CBM de 550 µg/mL e >1000 µg/mL, respectivamente (Tabela 3).

Moreira²² et al. observaram que o OE de *S. aromaticum* apresentaram bons resultados como agente antimicrobiano frente a diferentes cepas de *E. coli*, chegando a concentrações para a CIM e para a CBM de 0,25 mL/100 mL e 0,3 mL/100 mL exercendo, portanto, possui uma ação bactericida e bacteriostática.

Nos ensaios realizados, foi observado que a concentração de 550 µg/mL do OE de *S. aromaticum* foi capaz de inibir, aproximadamente, 4 log de UFC/mL frente a *E. coli*, no entanto, para a *S. aureus* o tratamento só foi eficaz como agente bacteriostático para a mesma concentração.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia)

Micro-organismo	<i>Syzygium aromaticum</i>	
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	550	550
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	550	>1000

Os resultados expressos são valores obtidos das análises em triplicatas. (>): maior que

Através de dados e pesquisas podem ser observados que os OEs exercem ação em vários micro-organismos, possuindo grande potencial de aplicação em diversas áreas incluindo a área alimentar. Uma das vantagens em utilizar OEs como agentes antimicrobianos e aromatizantes em alimentos, deve-se ao fato de serem constituintes naturais, apresentando maior aceitação pelos consumidores²⁵.

4. CONCLUSÃO

A utilização da técnica para extrações dos OEs mostrou-se satisfatória e de fácil obtenção dos óleos para estudos posteriores.

As avaliações da susceptibilidade antimicrobiana, através do ensaio do disco-difusão e da microdiluição

em placa, demonstraram que os OEs podem ser utilizados como agentes antimicrobianos. No entanto, são necessárias mais pesquisas quanto ao seu mecanismo de reação, citotoxicidade e aplicação *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- [1] Chung H, Pamp SJ, Hill JA, Surana NK, Edelman SM, Troy EB, Reading NC, Villablanca EJ, Wang S, Mora JR, Umesaki Y, Mathis D, Benoist C, Relman DA, Kasper DL. Depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*. 2012; 149(7):1578-1593.
- [2] Hooper LV. Bacterial contributions to mammalian gut development. *TRENDS in Microbiology*. 2004; 12(3):129-34.
- [3] Stentz R, Osborne S, Horn N, Li AWH, Hautefort I, Bongaerts R, Rouyer M, Bailey P, Shears SB, Hemmings AM, Brearley CA, Carding SR. A bacterial homolog of a eukaryotic inositol phosphate signaling enzyme mediates cross-kingdom dialog in the mammalian gut. *Cell Reports*. 2014; 6:646-56.
- [4] Prasanna PHP, Grandison AS, Charalampopoulos D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. *Food Research International*. 2014; 55:247-62.
- [5] Procópio REL, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2012; 16(5):466-71.
- [6] Zacharof MP, Lovitt RW. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: a review article. *APCBEE Procedia*. 2012; 2:50-6.
- [7] Clivot H, Pagnout C, Aran D, Devin S, Bauda P, Poupin P, Guérolf F. Changes in soil bacterial communities following liming of acidified forests. *Applied Soil Ecology*. 2012; 59:116-23.
- [8] Wang Q, Wang R, Tian C, Yu Y, Zhang Y, Dai J. Using microbial community functioning as the complementary environmental condition indicator: A case of an iron deposit tailing area. *European Journal of Soil Biology*. 2012; 51:22-9.
- [9] Dunwell JM. Transgenic cereals: current status and future prospects. *Journal of Cereal Science*. 2013: IN PRESS; 1-16.
- [10] Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000; 14:327-35.
- [11] Brooks JW, Roberts EL, Kocher K, Kariyawasam S, Debroy C. Fatal pneumonia caused by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in a juvenile cat recovered from an animal hoarding incident. *Veterinary Microbiology*. 2013; 167:704-7.
- [12] Abdou AM, Higashiguchi S, Aboueleinin AM, Kim M, Ibrahim HR. Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus species*. *Food Control*. 2007; 18:173-8.
- [13] Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability, and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*. 2012; 156:7-17.

- [14] National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4], 2003.
- [15] Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A. Extended-spectrum cephalosporim-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? *Drug Resistance Updates*. 2013; 16:22-45.
- [16] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 94:223-53.
- [17] Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 2010; 21:1199-1218.
- [18] Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 88:308-16.
- [19] Behbahani MH, Ghasemi Y, Khoshnoud MJ, Faridi P, Moradli G, Najafabady NM. Volatile oil composition and antimicrobial activity of two *Thymus* species. *Pharmacognosy Journal*. 2013; 5:77-9.
- [20] Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9, 2006
- [21] Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth. Informational Supplement. M100-S24, 2014.
- [22] Moreira MR, Ponce AG, Valle CE, Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT- Food Science and Technology- Journal- Elsevier*. 2005; 38:565-70.
- [23] Al-Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008; 116:403-6.
- [24] Food and Drug Administration (FDA). Code of Federal Regulations Title 21, volume 3. Revisado as of April 1, 2013.
- [25] Bevilacqua A, Sinigaglia M, Corbo MR. *Alysiclobacillus acidoterrestris*: New methods for inhibiting spore germination. *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 125:103-10.
- [26] Machado M, Dinis AM, Salgueiro L, Custódio JBA, Cavaleiro C, Sousa MC. Anti-giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. *Experimental Parasitology*. 2011; 127:732-9.
- [27]. KHAN, Mohd Sajjad Ahmad; AHMAD, Iqbal. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012; 140:416-23.
- [28] Mesomo MC, Corazza ML, Ndiaya PM, Santa ORD, Cardozo L, Scheer APaula. Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2013; 80:44-9.
- [29] Pathan RK, Gali PR, Pathan P, Gowtham T, Pasupuleti S. *In vitro* antimicrobial activity of *Citrus aurantifolia* and its phytochemical screening. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2012; S328-S331.
- [30] Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S. Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). 2012; 122:212-8.
- [31] Vilela GR, Almeida GS, D'arce MABR, Moraes MHD, Brito JO, Silva MFGF, Silva SC, Piedade SMS, Calori-Domingues MA, Gloria EM. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research*. 2009; 45:108-11.
- [32] Tyagi AK, Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*. 2011; 126:228-35.
- [33] Clinical And Laboratory Standards Institute/Nccls. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M 100-S 15 [ISBN 1-56238-556-9], 2005.

