

Área: Tecnologia de Alimentos

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
EUCALIPTO (*Eucalyptus cf. Citriodora*) FRENTE A BACTÉRIAS
PATOGENICAS**

**Mariana Dias Antunes*; Guilherme Da Silva Dannenberg; Vânia Zanella Pinto;
Elessandra da Rosa Zavareze; Wladimir Padilha da Silva; Ângela Maria Fiorentini;
Álvaro Renato Guerra Dias**

Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia
Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas/RS.

*E-mail: mariidiasantunes@hotmail.com.br

RESUMO – A contaminação microbiológica de alimentos é um ponto bastante relevante na área de ciência e tecnologia de alimentos, por envolver perdas econômicas, em decorrência da deterioração dos produtos, e ainda por fornecer riscos potenciais à saúde do consumidor, afetando assim também a área de saúde pública. Neste contexto, a indústria de alimentos busca controlar tal problema utilizando métodos de conservação diversos, dentre os quais se destacam, por serem amplamente utilizados, os conservantes químicos sintéticos. No entanto, alguns estudos vêm contestando a eficácia destes compostos, em virtude da capacidade apresentada por algumas bactérias de desenvolverem resistência a antimicrobianos, quando submetidas a doses subletais. Como alternativa aos conservantes tradicionais aparecem os extratos naturais, que podem apresentar atividade antimicrobiana similar e até mesmo superior às substâncias sintéticas, podendo assim ser apresentadas como possíveis substitutos a utilização destes conservantes. Dentro desta proposta o presente estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana de óleo essencial de eucalipto contra as quatro principais bactérias patogênicas relacionadas à contaminação de alimentos. Sendo verificada a inibição de todas as bactérias testadas, gram positivas e gram negativas, pode-se inferir o potencial de aplicação tecnológico deste extrato como substituto aos conservantes sintéticos.

Palavras-chave: Óleo essencial; Atividade antimicrobiana; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella* Typhimurium.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os principais fatores que afetam a segurança dos alimentos tem-se a contaminação microbiológica, responsável por intoxicações e infecções dependendo o tipo de patógeno envolvido. Para eliminar este risco usualmente além de processos físicos, como tratamentos térmicos, são utilizados conservantes para prolongar a vida útil e garantir a segurança ao longo de todo período de armazenamento (BAJPAI et al., 2012).

Atualmente existe a necessidade de que novas substâncias com atividade antimicrobiana sejam encontradas, gerando alternativas para a substituição, ou redução das concentrações aplicadas, dos conservantes convencionais (ROBY et al., 2013), visto que estudos tem evidenciado a capacidade de algumas bactérias adquirirem resistência aos antimicrobianos tradicionais quando submetidos a doses subletais destes (HAWSER et al., 2011). Além da possibilidade de perda da eficácia, inerente do surgimento de bactérias resistentes, existe ainda indícios na literatura científica de que à ingestão frequente, ou de concentrações elevadas, de alguns antimicrobianos sintéticos podem conferir riscos toxicológicos e carcinogênicos ao consumidor (MPOUNTOUKAS et al., 2008; GUILLARD et al., 2009).

Dentro deste contexto, alguns extratos naturais provenientes de plantas tem apresentado atividade antimicrobiana contra linhagens de patógenos resistentes a antibióticos (VANACLOCHA & CANIGUERAL, 2003). Visando a aplicação em alimentos, destaca-se dentre estes extratos os óleos essenciais, que são reconhecidos com GRAS (Generally Recognized as Safe) em função de sua obtenção envolver apenas o processo de hidrodestilação, sem utilização de solventes orgânicos (CASTILLO et al., 2014).

Os óleos essenciais são sintetizados pelo metabolismo secundário dos vegetais com o propósito de conferir resistência a condições adversas como variações climáticas, ataques de insetos e micro-organismos. Para tal, são constituídos por um grande número de moléculas biologicamente ativas, que são responsáveis pela ação antimicrobiana destes extratos (KAVOOSI; ROWSHAN, 2013).

Para inferir a possibilidade de utilização industrial de um óleo essencial, um fator importante a ser levado em consideração é a disponibilidade da matéria prima, que deve ser consideravelmente boa para contrapor o baixo rendimento apresentado por estes extratos. Um vegetal bastante adaptado e cultivado no Brasil é o *Eucalyptus citriodora*, o qual foi primeiramente introduzido com outras espécies de eucalipto com o objetivo de produzir madeira. Hoje, esta espécie é cultivada em especial para extração do seu óleo essencial, pois possibilita a um baixo custo, a obtenção de um produto com características de ampla aplicação. Além disso, essa planta se adapta bem a solos com baixa fertilidade e regenera-se muito bem por brotações das cepas (UFERSA, 2015)

Este trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus cf. Citriodora*) frente a bactérias patogênicas de relevância em alimentos, visando inferir seu potencial de aplicação tecnológica como antimicrobiano em alimentos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), realizando a extração do óleo essencial no Laboratório de Processamento Agroindustrial, e as análises microbiológicas no laboratório de Microbiologia de Alimentos.

2.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

A matéria prima utilizada para a extração do óleo essencial foram folhas de eucalipto, coletadas no mês de Junho de 2015 de árvores adultas classificadas como pertencentes à espécie *Eucalyptus cf. citriodora*, localizadas na região sul do Rio Grande do Sul, na cidade de Canguçu (latitude: 31° 23' 44''/longitude: 52° 41' 11'').

2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Para o processo de extração do óleo essencial as folhas de eucalipto foram congeladas e trituradas, objetivando um aumento da superfície de contato que resulta em um maior rendimento do processo. O método utilizado foi o de hidrodestilação em equipamento clewenger seguindo as especificações definidas por Dannenberg (2014).

Em um balão com capacidade para 2L foram adicionados 300g das folhas de eucalipto trituradas e 1L de água destilada, o balão foi então conectado ao equipamento clewenger e aquecido até temperatura de ebulição (100°C) por uma manta de aquecimento durante 2h.

Após sua obtenção o óleo essencial de eucalipto foi desidratado por filtração em funil com Sulfato de sódio (Na₂SO₄), e armazenado a -20°C (±2) em frasco de vidro âmbar devidamente vedado com parafilme, até o momento das análises.

2.3 BACTÉRIAS TESTADAS

Para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de eucalipto foram utilizadas quatro bactérias patogênicas (Tabela 1) frequentemente relacionadas com contaminação microbiológica de alimentos, sendo duas gram positivas e duas gram negativas, tendo assim exemplares dos dois tipos de parede celular apresentados pelas bactérias.

Tabela 1. Bactérias utilizadas no experimento.

Bactéria	Cepa	Gram
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	Positiva
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Positiva
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Negativa
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 14028	Negativa

2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de eucalipto foi avaliada pela técnica de disco difusão (CLSI, 2012). As bactérias foram ativadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI-Oxoid®) por 24h a 37°C, sendo posteriormente suspensas em água peptonada (0,1%) até atingir a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (0,5 McFarland), esta suspensão foi semeada com swabs estéreis na superfície de placas com Agar Mueller-Hinton (MH-Oxoid®). Após esta inoculação, foram dispostos três discos de papel estéril com 6mm de diâmetro em cada placa (triplicata), sobre os quais foi vertido 10µL do óleo essencial em estudo. As placas foram incubadas a 37°C em BOD, e após 24h foi verificado a presença de halos de inibição ao redor dos discos, sendo estes aferidos com paquímetro digital (king.tools®). Os resultados foram expressos em milímetros (mm) pela média aritmética dos valores dos halos obtidos nas repetições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento do óleo essencial de eucalipto foi de 1,7%. Este resultado pode ser considerado elevado quando comparado a outros óleos essenciais, como o de hortelã pimenta que apresenta cerca de 1,4% de rendimento.(GASPARIN, et al., 2014)

O rendimento de extração é uma característica importante que pode limitar o potencial de aplicação tecnológico, e neste sentido o óleo essencial de eucalipto apresentou bons resultados.

Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana do óleo essencial de eucalipto no teste de disco difusão frente a bactérias patogênicas estão apresentados na Tabela 2:

Tabela 2. Halos de inibição conferidos pelo óleo essencial de eucalipto frente as bactérias patogênicas.

Bactéria	Halo de inibição (mm)
<i>Listeria monocytogenes</i>	21,52 ± 0,41
<i>Staphylococcus aureus</i>	32,71 ± 3,19
<i>Escherichia coli</i>	14,37 ± 0,64
<i>Salmonella Typhimurium</i>	12,59 ± 0,36

O óleo essencial de eucalipto promoveu a inibição do crescimento de todas as bactérias testadas, tanto as gram positivas quanto as gram negativas, o que demonstra um amplo espectro de ação antimicrobiana deste extrato.

Todas as bactérias apresentaram halos de inibição diferentes entre si, mas os halos obtidos para as bactérias gram positivas, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* são expressivamente maiores que os aferidos para as bactérias gram negativas, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*. Já Silveira et al. (2012)

ao avaliar atividade antimicrobiana de óleo essencial de Citronela (*C. winterianus*) e eucalipto (*E. paniculata*), para as mesmas bactérias gram negativas testadas neste estudo, não observaram nenhum halo de inibição.

Estes resultados corroboram com a grande maioria dos trabalhos realizados com óleos essenciais bem como com a premissa de que as bactérias gram negativas, em função de sua parede celular mais espessa e composta por lipopolisacarídeos (TROMBETTA et al., 2005), são mais resistentes a ação de antimicrobianos quando comparadas as bactérias gram positivas (DUSSAULT; VU; LACROIX, 2014).

4 CONCLUSÃO

Os resultados verificados neste estudo permitem comprovar a atividade antimicrobiana apresentada pelo óleo essencial de eucalipto (*E. cf. citriodora*), visto que inibiu todas as bactérias testadas, bem como demonstrou um amplo espectro de ação, pois apresentou atividade tanto para bactérias gram positivas como para as bactérias gram negativas, além de ter um elevado rendimento de extração. Tais informações permitem inferir que o óleo essencial possui potencial de aplicação tecnológica como antimicrobiano, podendo ser uma alternativa a utilização dos tradicionais conservantes sintéticos.

5 AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa Tecnológica (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), ao Pólo de Inovação Tecnológica em Alimentos (Pólo de Alimentos) e a Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

6 REFERÊNCIAS

BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. **Food Research International**, n. 45, p. 722-734, 2012.

CASTILLO, S. et al. The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 132–136, jan. 2014.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved standard - Eleventh Edition*. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2012

DANNENBERG, G. S.; Potencial bioconservante do óleo essencial de pimenta brasileira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em queijo artificialmente contaminado com *L. monocytogenes*. **Dissertação de Mestrado** (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

DUSSAULT, D.; VU, K. D.; LACROIX, M. In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils , oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. **MESC**, v. 96, n. 1, p. 514–520, 2014.

GASPARIN, P.P.; ALVES, N.C.C.; CHRIST,D.; COELHO, S.R.M. Qualidade de folhas e rendimento de óleo essencial em hortelã pimenta (*Mentha x Piperita L.*) submetida ao processo de secagem em secador de leito fixo. **Rev. Bras. Pl. Med.**, , v. 16, n. 2, p.337-344, Campinas, 2014.

GUILLARD, V.; ISSOUPOV, V.; REDL, A.; GONTARD, N.; Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficial coating. **Innovative food science and emerging technologies**. v.10, p.108-115, 2009.

HAWSER, S. P.; BOUCHILLONB, S. K.; HOBANB, D. J.; DOWZICKYC M.; BABINCHAKC, T. Rising incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin and susceptibility to antibiotics: a global analysis 2004–2009. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 219–224, 2011.

KAVOOSI, G.; ROWSHAN, V. Chemical composition , antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin : Effect of collection time. **FOOD CHEMISTRY**, v. 138, n. 4, p. 2180–2187, 2013.

MPOUNTOUKAS, P.; VANTARAKIS, A.; SIVRIDIS, E.; LIALIARIS, T. Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. **Food Chemistry Toxicol**, v. 46, p. 2390–2393, 2008.

ROBY, M. H. H.; SARHAN, M. A.; SELIM, K. A.; KHALEL, K. L. Antioxidant and Antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare L.*) and chamomile (*Matricaria chamomilla L.*). **Industrial Crops and Products**, n. 44, p. 437– 445, 2013.

SILVEIRA, S. M.; CUNHA, A. Jr.; SCHEUERMANN, G. N.; SECCHI, F. L.; VERRUCK, S.; KROHN, M.; VIEIRA, C. R. W. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 471-80, 2012.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. v. 49, n. 6, p. 2474–2478, 2005.

VANACLOCHA, B.; CANIGUERAL, S.; **Fitoterapia: Vademécum de prescripció**n, 4^a ed., Barcelona: Masson, 2003.