



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BACHARELADO)

CAMILA BUENO RODRIGUES

**UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIMICROBIANOS
NATURAIS EM PÓS-COLHEITA DE FRUTOS**

São Carlos

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BACHARELADO)

**ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIMICROBIANOS NATURAIS EM PÓS-
COLHEITA DE FRUTOS**

Trabalho apresentado na Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, Campus São Carlos, como requisito para obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Cristina Paiva de Sousa

Co-orientador: Marcos David Ferreira

São Carlos (SP),

2022

Aos meus pais, que batalharam muito para que eu tivesse a melhor formação possível. À minha avó Rosa, por ter me inspirado a escolher a UFSCar. À todas as minhas professoras e professores, que foram de fundamental importância na construção da minha vida profissional.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, por todos os investimentos que me permitiram chegar até aqui, sempre me encorajando a tomar minhas próprias decisões e a seguir meus sonhos. Ao meu irmão, Enzo, por sempre dar um jeito de abrir sorrisos e tornar a vida mais leve. À minha irmã, por ser meu maior porto seguro. À minha avó Rosa, por ser minha maior inspiração. À minha avó Cidinha, por todas as rezas, comemorações e amor, e ao meu avô Luíz, por todas as risadas e ensinamentos. Às minhas tias Alessandra, Keily e Kiki por serem grandes inspirações e me ensinarem tanto. Às minhas irmãs de coração, Stephannie e Raquel, por crescerem comigo e me ensinarem que família também se escolhe. Vocês foram a minha base essencial, para que eu conseguisse chegar aonde estou hoje.

Também agradeço à família de coração que a graduação me deu: Alex, Bruna, Eduardo, Gabriela, Giovana, Lavínia e Thales. Sem vocês eu não seria nem metade da pessoa que sou hoje. Ao meu namorado e melhor amigo, Mateus, que sempre torceu por mim, que me inspira e me cuida tanto. E por último, mas não menos importante, à minha cachorra Pandy, que sempre esteve presente dando doses de amor tão necessárias em tantos momentos.

“É preciso ter esperança, mas ter esperança do verbo esperar; porque tem gente que tem esperança do verbo esperar. E esperança do verbo esperar não é esperança, é espera. Esperançar é se levantar, esperançar é ir atrás, esperançar é construir, esperançar é não desistir! Esperançar é levar adiante, esperançar é juntar-se com outros para fazer de outro modo.”

Paulo Freire

Resumo

Os óleos essenciais (OEs) exibem atividade antimicrobiana e por essa característica têm sido propostos como agentes fungicidas e bactericidas naturais. Neste contexto, o presente estudo teve como finalidade avaliar o potencial de OEs como antimicrobianos naturais e no controle de microrganismos potencialmente deteriorantes de alimentos. Os OEs de Hortelã verde (*Mentha spicata*), Palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e o de óleo de cravo (*Eugenia caryophyllus*) foram obtidos comercialmente e avaliados para atividade antimicrobiana contra o fungo *Penicillium* spp., a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* e a Gram negativa *Escherichia coli*. Os resultados indicam o potencial de uso dos OEs testados para controle fúngico e também bacteriano. O OE de cravo da Índia e de Palmarosa se destacaram, com altas propriedades antifúngicas (inibição do crescimento a partir de 250µL e 750µL, respectivamente) e também antibacterianas, com o OE de cravo da Índia como único com atividade bacteriostática, contra *S. aureus*. Referente ao OE de Hortelã-verde mais ensaios com *Penicillium* spp. se fazem necessários e foi também o OE que apresentou as maiores CIMs e CBMs (0,781 para *E.coli* e 3,125 para *S.aureus*).

Palavras-chave: Óleos essenciais, atividade antimicrobiana, pós-colheita, fungos e bactérias.

Sumário

Índice Página

| | |
|--|----|
| 1. Introdução e Revisão Bibliográfica | 6 |
| 1.1 Óleos essenciais como agentes antimicrobianos..... | 8 |
| 1.2 Óleos Essenciais de Eugenol, Hortelã-Verde e Palmarosa..... | 9 |
| 1.3 Bactérias - <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> | 10 |
| 1.4 Fungo – <i>Penicillium</i> spp. | 10 |
| 2. Objetivo..... | 11 |
| 3. Material e Métodos | 12 |
| 3.1 Óleos Essenciais | 12 |
| 3.2 Atividade Antibacteriana | 12 |
| 3.3 Atividade Antifúngica | 13 |
| 4. Resultados e Discussão | 13 |
| 4.1 Determinação da Atividade Antibacteriana | 13 |
| 4.2 Determinação da atividade antifúngica..... | 15 |
| 4. Conclusão | 17 |
| 5. Literatura Consultada | 17 |

1. Introdução

Frutas e hortaliças, possuem na pós-colheita, um tempo de vida útil relativamente curto. Tal característica se deve à fisiologia vegetal e às fitopatologias, contribuindo com o desperdício de alimentos. Estima-se que estamos desperdiçando cerca de 1.6 bilhões de toneladas anuais de alimentos, o que corresponde uma perda econômica calculada em 1,2 trilhões de dólares. Esta é uma pauta tão preocupante, que levou a Agenda 2030 do Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas, a adotar como um de seus principais objetivos, a redução do desperdício de alimentos pela metade (EMBRAPA, 2018).

Os microrganismos fitopatogênicos representam uma ameaça global para a produção de alimentos agrícolas, responsáveis por 10% de sua perda. São eles, principalmente, os fungos e as bactérias fitopatogênicos, capazes de afetar uma ampla gama de plantas ao redor do mundo (DAVARI; EZAZI, 2017). Dentre os principais fungos fitopatogênicos, que acometem tanto culturas agrícolas quanto os alimentos na pós-colheita, podemos citar: *Alternaria alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Curvularia hawaiiensis*, *Fusarium oxysporum fsp. lycopersici*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*, *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* (ELSHAFIE et al., 2019; SANTAMARINA et al., 2017). Já dentre os principais gêneros de bactérias fitopatogênicas que prejudicam culturas agrícolas e as ervas daninhas relacionadas, destacam-se: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Pectobacterium*, *Clavibacter* e *Curtobacterium* (PATYKA, 2016).

Algumas culturas agrícolas e certos alimentos na pós-colheita merecem destaque devido as suas altas taxas de perdas por fungos e bactérias. É o caso da maçã (*Malus doméstica*), de grande importância econômica, reconhecida em 2004 como a terceira maior colheita de fruta e produtividade (Food and Agricultural Organization Statistics, 2004). Afetada durante a pós-colheita, principalmente por fungos, como *Penicillium expansum*, *Alternaria* spp. e *Rhizopus stolonifer*, as maçãs apresentam sintomas como bolor azul e podridão mole (LOPEZ et al., 2007). Estes inviabilizam sua comercialização e geram grandes prejuízos. A batata (*Solanum tuberosum*), é também reconhecida mundialmente como a quarta principal cultura agrícola, referente a produção total e área cultivada (DOUCHES et al., 1996). Estima-se que cerca de 22% das batatas cultivadas são perdidas devido a doenças causadas por fungos e bactérias, vírus e outras pestes. Tal porcentagem corresponde a uma perda anual de 65 milhões de toneladas (ROSS, 1986). As bactérias dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya* são as principais responsáveis pelo apodrecimento em batatas, escurecendo e murchando sua superfície.

Outra doença que causa perdas anuais severas, principalmente em pomares, é a

galha. A galha é uma doença crônica que diminui a produtividade de árvores e aumenta sua susceptibilidade à infecção por outros patógenos, além do estresse ambiental. Causada por bactérias do gênero *Agrobacterium*, esta doença leva a um uso excessivo de agrotóxicos, prejudicando tanto a saúde humana quanto o meio ambiente (BLISS et al., 1999). Portanto, torna-se cada vez mais necessário desenvolvimento de novos métodos de combate a essas e outras doenças, que sejam ao mesmo tempo eficazes e seguros para saúde humana e para o meio ambiente.

Óleos e extratos de plantas têm servido de base para diversas aplicações na área medicinal, entre elas, a produção de antissépticos tópicos, além de sua utilização para fins alimentícios com a mesma finalidade já dita. Tal realidade tem sido aplicada para diversas investigações científicas, com objetivo de se ter uma confirmação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (Almeida et al., 2006; Arruda et al., 2006; Nunes et al., 2006; Benkeblia, 2004; Rehder et al., 2004; Claffey, 2003; Seymour, 2003; Arweiler et al., 2000; Fine et al., 2000; Pan et al., 2000).

Óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência dos mesmos, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (Siqui et al., 2000), com cerca de 60% dos óleos essenciais com propriedades antifúngicas e 35% exibindo propriedades antibacterianas (Bhavanani; Ballow, 1992).

São conhecidos cerca de 3000 OEs, sendo que 300 deles são comercialmente importantes, destinados principalmente para os mercados de sabores, fragrâncias e uso farmacêutico. Nos vegetais, assumem diversas funções vitais, dentre elas o papel fundamental de defesa contra microrganismos. Seus compostos isolados, incluindo terpenos e terpenóides (1,8-cineol, carvacrol) e compostos aromáticos (cinamaldeído e eugenol), são as principais fontes deste poder antimicrobiano (BURT, 2004; HANIF et al., 2018; SIMON, J. E.; QUINN, J.; MURRAY, 1990).

Os OEs podem ser extraídos a partir de qualquer órgão vegetal, sendo o método mais utilizado para tal, a hidro destilação. O produto da extração pode variar em qualidade, quantidade e composição, de acordo com o clima, a composição do solo, o órgão da planta, a idade e o estágio do ciclo vegetativo. A seguir, serão descritas as atividades dos OEs contra microrganismos.

1.1 Óleos essenciais como agentes antimicrobianos

Os OEs são considerados metabólitos secundários de plantas constituídos de uma mistura complexa de hidrocarbonetos terpênicos, especialmente monoterpenos e sesquiterpenos, e derivados oxigenados, como aldeídos, cetonas, álcoois, lactonas e ésteres

(REHMAN et al., 2007). Entre a ampla gama de substâncias naturais com propriedades antifúngicas extraídas das plantas estes são considerados os mais importantes. Eles compõem uma combinação de metabólitos secundários voláteis que são bioativos, mostram atividade direta contra fitopatógenos e também podem melhorar os mecanismos de defesa da planta contra esses microrganismos (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013).

Esses compostos têm o potencial de inibir um amplo espectro de microrganismos. Geralmente, os componentes ativos inibem os microrganismos através do distúrbio de suas membranas citoplasmáticas, interrompendo a força motora do próton, fluxo de elétrons, transporte ativo e inibindo a síntese proteica (BURT, 2004). Muitos OEs, como cravo, orégano, tomilho, noz moscada, hortelã, o alho, capim limão, manjerição, mostarda ou da canela, entre outros, são classificados como “Geralmente Reconhecidos como Seguros” (GRAS) pelo USFDA (MANSO et al., 2014) e estão ganhando popularidade devido à sua natureza volátil, o que facilita o uso de pequenas concentrações que são seguras para consumo (SIVAKUMAR; BAUTISTA BANOS, 2014).

Estudos relatam as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais aplicados a alimentos diversos, como leite, carne, frutas, hortaliças etc. Óleos essenciais e vários dos seus componentes individuais apresentam atividade contra patógenos de alimentos *in vitro* (BAKKALI et al., 2008; BURT et al., 2004). Sa-Nguanpuag et al. (2011) relatam a capacidade de compostos químicos extraídos do óleo de gengibre inibir o crescimento microbiano em estudos *in vitro* e *in vivo*. Foi observada a inibição de crescimento para *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodoturola* sp, *Samonella newport*, *Samonella enteritidis* e *Fusarium* sp. Todavia, não foi evidenciado efeito inibitório em *Escherichia coli*, *Campylobactor coli* e *Campylobacter jejuni*. Os autores concluíram que o óleo essencial de gengibre pode ser utilizado na redução do crescimento microbiano em mamão verde ralado, com potencial uso para outros produtos. Nikolić et al. (2014) em estudo referente a ação antibacteriana e antibiofilme de extrato etanólico de gengibre em estudos *in vitro*, verificaram a eficiência no controle de bactérias Gram positiva, em especial *Staphylococcus aureus*.

1.2 Óleos Essenciais de Cravo da Índia, Hortelã-Verde e Palmarosa

O Eugenol, em particular, é um fenilpropanóide presente em diversos OEs (PINTO et al. 2019), sendo o principal componente dos óleos essenciais de Cravo da Índia seco (*Eugenia caryophyllus*) de Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) (Myrtaceae). Em estudos anteriores, demonstrou diversas propriedades biológicas contra microrganismos, como bactérias, fungos e parasitas, bem como propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, inseticidas e imunomoduladoras (PINTO et al. 2019; PRATES et al. 2019). Arelada a estas características, este composto também apresenta

baixa toxicidade, sendo caracterizado pela FDA (U.S. *Food and Drug Administration*), como tão seguro quanto um ingrediente alimentar direto (GRAS). Desta forma, o eugenol presente nos referidos OEs, mostra-se um composto promissor para proteção de frutos, e vem chamando a atenção de diversos pesquisadores.

Já os OEs extraídos de plantas do gênero *Mentha*, em especial a espécie *Mentha spicata* (conhecida popularmente como Hortelã-Verde) já demonstraram importante atividade microbiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e leveduras (KATIKA et al., 2011; MUTEAN et al. 2019; WU et al. 2019; EMRE et al., 2019). A origem geográfica, as técnicas de cultivo e os métodos de isolamento, estão entre os principais fatores que influenciam a composição de OEs em plantas. Assim, em certas espécies de *Mentha*, as porcentagens de peróxido (PPO) e epóxido (PEO) são baixas (próximas a 1%).

Entretanto, diversos estudos também mostraram altas porcentagens destes compostos (de 40 a 85,4%) no referido gênero. Tais compostos estão entre os que ainda não foram tão bem estudados, mas ocorrem em diversos OEs. A ação antimicrobiana de PPO e PEO contra patógenos já foi demonstrada em outros trabalhos (MUTEAN et al. 2019), porém seu potencial antibacteriano foi pouco explorado. Alexopoulos, et al. (2019), testou a ação antibiótica destes compostos em cepas isoladas de *S. aureus* e *E. coli*, bactérias que também serão utilizadas neste trabalho. Como conclusão, obtiveram que o PEO pode ser um composto antimicrobiano promissor, quando combinado com antibióticos específicos e merece ser mais estudado.

Por fim, o OE extraído da Palmarosa (*Cymbopogon martinii*) é um importante OE industrial, utilizado em diversos cosméticos (KAKAPARTHI, 2015). Este tem se mostrado, em estudos anteriores, uma ótima alternativa para a preservação de alimentos, devido a sua ação antibiótica e antifúngica. Seu principal componente é o geraniol, o qual apresenta alta atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, contra diversos microrganismos (RAYBAUDI-MASSILIA et al. 2007; VIOLLON & CHAUMONT, 1994; KATIKA et al., 2011).

1.3 Bactérias - *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Staphylococcus aureus é uma bactéria residente na pele e nas membranas basais. Possui um alto potencial patogênico devido a ampla gama de toxinas que produz, podendo causar uma variedade de infecções comunitárias e hospitalares. A intoxicação alimentar por *S. aureus* é uma das doenças de origem alimentar mais comuns. Este tipo de intoxicação acontece quando há a ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) pré formadas nos alimentos, por cepas enterotoxigênicas desta bactéria (OLIVEIRA et al., 2018; HENNEKINNE et al. 2011).

Já a *Escherichia coli*, é uma bactéria que reside principalmente no intestino humano. As infecções extra- intestinais causadas por esta bactéria, são problema de saúde em escala mundial. A ingestão de alimentos contaminados é uma das principais vias de contágio (AJUKA & BUYS, 2019). Desta forma, a busca por agentes inibidores destes tipos de ação torna-se importante para garantir a saúde pública. Os OEs têm se mostrado uma alternativa promissora na proteção de alimentos, contra este tipo de infecção (ALEXOPOULOS et al., 2019; ALOLGA et al., 2019; MELO, et al. 2019; BACHIR RAHO et al., 2012; RAEISI et al., 2012).

1.4 Fungo - *Penicillium* spp.

O gênero de fungos *Penicillium* spp. ocorre em inúmeros habitats diferentes, desde solo, vegetação, ar, ambientes internos e diversos tipos de alimentos, sendo por isso um dos mais comuns a nível global. Além disso, também é considerado um elevado agente deteriorante na pós-colheita de frutos, atingindo inúmeras culturas na pós-colheita. Por apresentar limitação de crescimento à 37°C, estes fungos raramente são associados como patógeno humano (ELSHAFIE et al., 2019; SANTAMARINA et al., 2017).

Porém, as micotoxinas que liberam podem contaminar alimentos e prejudicar a saúde humana. Suas micotoxinas mais comuns em alimentos são a ocratoxina A e a patulina, sobre as quais inúmeros países impõe regulamentação sobre sua presença em alimentos (PERRONE & SUSCA, 2017). Duas culturas agrícolas de grande importância no mundo são afetadas, na pós-colheita, por fungos do gênero *Penicillium* spp., sendo elas a maçã (*Malus doméstica*) e frutas do gênero citrus. Assim, encontrar mecanismos de combate à espécies deste gênero e a presença de suas micotoxinas em alimentos, é de grande importância para a segurança alimentar (YU et al., 2020; KANASHIRO et al., 2020).

2. Objetivo

Determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais de Hortelã Verde (*Mentha spicata*), Palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*).

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais frente às bactérias

Staphylococcus aureus e *Escherichia coli*.

- Avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais frente ao fungo *Penicillium sp.*

3. Materiais e Métodos

3.1 Óleos Essenciais

Os OEs foram selecionados com base em uma pesquisa na literatura baseando-se naqueles que apresentaram boa aceitação sensorial quando aplicados em revestimentos para frutas ou que demonstraram potencial de serem sensorialmente compatíveis com o morango, sendo assim: Hortelã-verde (*Mentha spicata*) (SHAHBAZI, 2018), Palmarosa (*Cymbopogon martinii*) (RAYBAUDI-MASSILIA, MOSQUEDA-MELGAR; MARTÍNBELLOSO, 2008) e o Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*). Os óleos serão obtidos em sua forma comercial e serão armazenados em frasco selado a 4°C para posterior análise.

3.2 Determinação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos óleos foi determinada contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* pelo método de diluição em caldo. Foram preparados dois experimentos com doze diluições seriadas de OE a 100 µl / ml e 50 µl / ml, respectivamente, utilizando caldo Mueller Hinton com Tween 80 a 0,5%. Uma colônia de cada cepa bacteriana foi amostrada e inoculada 25 ml de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubada por 18–24 h a 37 °C. A suspensão bacteriana foi diluída para obter 10⁶ UFC /mL e 10 uL foram adicionados em cada poço e incubados a 37 °C durante 24h. Para verificar se houve crescimento bacteriano, foram adicionados 40 uL de cloreto de trimetiltetrazolio (CTT) a 0,1% em cada poço, os quais foram incubados novamente a 37 °C durante 20 minutos. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração testada que impediu o crescimento visível, ou seja, que não assumiu a coloração rosa após a adição do CTT. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada subcultivando 100 µL de cada poço de teste na concentração ≥ CIM em placas de ágar de contagem de placas. A CBM foi definida como a menor concentração, resultando em uma subcultura negativa ou na presença de apenas uma colônia após a incubação. A atividade bacteriostática foi definida como uma razão de CBM para CIM > 4 (PANKEY; SABATH, 2004).

3.3. Determinação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica para o fungo *Penicillium sp* em meio sólido dos óleos foi determinada de acordo com metodologia proposta por Tolba et al., (2015), pelo método de diluição em ágar. O óleo foi adicionado ao meio sabouraud dextrose ágar e vertido em placas de Petri para obter concentrações finais (0-1%, v/v). Discos de papel filtro estéril impregnado com a suspensão fúngica (10⁶ UFC/mL) foram colocados na superfície dos meios. As placas foram mantidas em fotoperíodo de 12h a 25 ° C, com medições do crescimento micelial de cada colônia realizadas a cada 8h, em duas direções perpendiculares (diâmetro em cm). A inibição do crescimento fúngico nas diferentes concentrações dos óleos foi medida pela equação $PI (\%) = (\text{Controle do Crescimento} - \text{Crescimento do Tratamento}) / \text{Crescimento do Controle} \times 100$ (Plaza et al., 2004). A Concentração Inibitória Mínima (CIM), quando presente, foi considerada a menor concentração do tratamento, dentre as concentrações avaliadas, capaz de inibir completamente o desenvolvimento dos fungos.

4. Resultados e Discussão

4.1 Determinação da atividade antibacteriana

Dois ensaios foram feitos, seguindo o método de diluição em caldo (PANKEY; SABATH, 2004), com os OEs de Palmarosa, Hortelã-verde e Cravo da Índia, sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para o primeiro, foi feita uma diluição em série de 100 µL de cada um dos OEs testados, em 12 poços contendo 100 µL de caldo Mueller Hinton com Tween 80 a 0,5%. Em seguida, 10 µL de cada uma das bactérias a 10⁶ UFC /mL foi adicionado, em experimentos separados. Após a aplicação e o tempo de incubação, adicionou-se corante (CTT) para evidenciar o crescimento bacteriano. Como resultado, não observou-se crescimento bacteriano algum em nenhuma das diluições. Além disso, após a aplicação e incubação de 100 µL de solução dos poços com a menor diluição de OE, em placas de petri, também não foi evidenciado crescimento bacteriano algum.

Como não foi possível obter a CIM e a CBM, um novo ensaio foi feito, com a diluição em série dos OEs partindo de 50 µL até 0,01 µL. Neste segundo experimento (Figura 1), foi possível verificar os seguintes resultados:

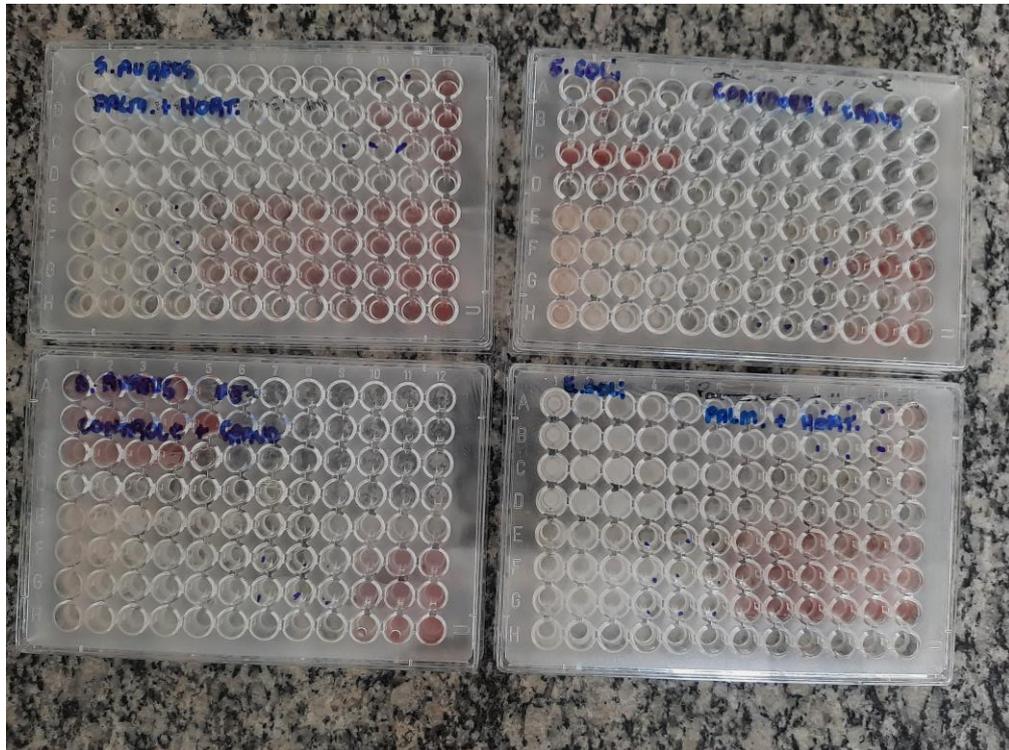


Figura 1: Fotografia das placas do segundo teste, evidenciando que houve crescimento bacteriano, tornando possível determinar a CIM e a CBM - o crescimento é indicado pela coloração rosa, após a aplicação do CTT

A partir da análise da Figura 1, podemos notar que as placas contendo as diluições do OE de Hortelã-verde, foram as que mais apresentaram coloração rosa, indicando que este OE apresenta potencial antibacteriano a concentrações maiores que os OEs de Cravo da Índia e Palmarosa. De acordo com a literatura, este resultado já era esperado (ALEXOPOULOS et al., 2019). O mesmo notamos ao analisar a tabela abaixo, que também mostra que o OEs de Hortelã-verde e Palmarosa não apresentaram atividade bacteriostática.

Tabela 1: Resultados das CIM, CBM (em μL) e da Atividade Bacteriostática (CBM/CIM), obtidos a partir da análise da coloração dos poços das placas.

| Óleo Essencial | Bactéria | CIM (μL) | CBM (μL) | Atividade Bacteriostática (CBM/CIM) |
|----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| Hortelã-verde | <i>Escherichia coli</i> | 0,781 | 0,781 | 1 |

| | | | | |
|----------------|------------------------------|-------|-------|------|
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 3,125 | 3,125 | 1 |
| Palmarosa | <i>Escherichia coli</i> | 0,024 | 0,024 | 1 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 0,024 | 0,097 | 4,04 |
| Cravo da Índia | <i>Escherichia coli</i> | 0,097 | 0,097 | 1 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 0,097 | 0,193 | 1,98 |

4.2 Determinação da atividade antifúngica

Os ensaios foram feitos com os OEs de Palmarosa, Hortelã-verde e Cravo-da-índia sobre o fungo *Penicillium sp.* A escolha do OE de Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*), se deveu à alta concentração de Eugenol em sua composição. À princípio, os OEs de Palmarosa e Hortelã-verde foram testados, obtendo-se a Figura 2.

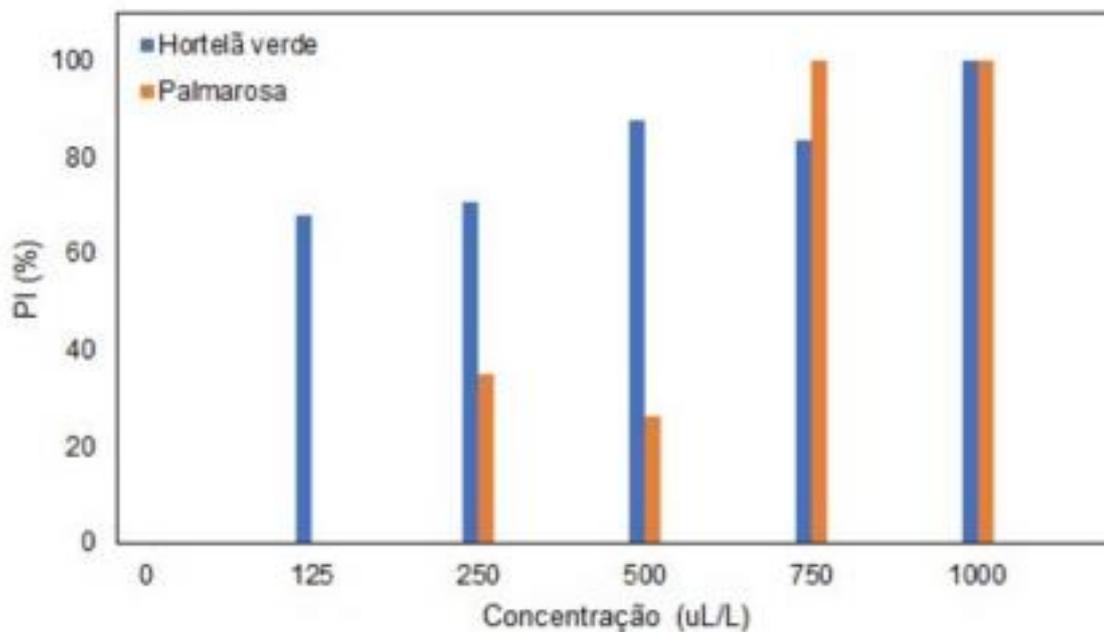


Figura 2: Porcentagem de Inibição (PI) de cada concentração testada ($\mu\text{L/L}$), dos óleos essenciais de Palmarosa e Hortelã-verde.

Analisando a figura 2, é possível notar que o OE de Hortelã-verde demonstrou um potencial inibitório mais alto ou igual que o OE de Palmarosa, em quase todas as concentrações testadas, exceto na concentração de $750\mu\text{L}$. Devido a essa falta de padronização nos dados obtidos para o OE de Hortelã-verde, os testes foram repetidos, acrescentando-se também o teste com o OE de Cravo da Índia (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2: Resultados das médias do crescimento do *Penicillium sp.* em cada uma das concentrações testadas, para cada um dos OEs analisados.

| Concentrações dos OEs | OEs | | |
|-----------------------|-----------|---------------|----------------|
| | Palmarosa | Hortelã-verde | Cravo-da-índia |
| 125 μL | 48,77 | 67,13 | 35,61 |
| 250 μL | 61,63 | 55,94 | 0 |
| 500 μL | 7,09 | 58,24 | 0 |
| 750 μL | 0 | 25,60 | 0 |
| 1000 μL | 0 | 13,42 | 0 |

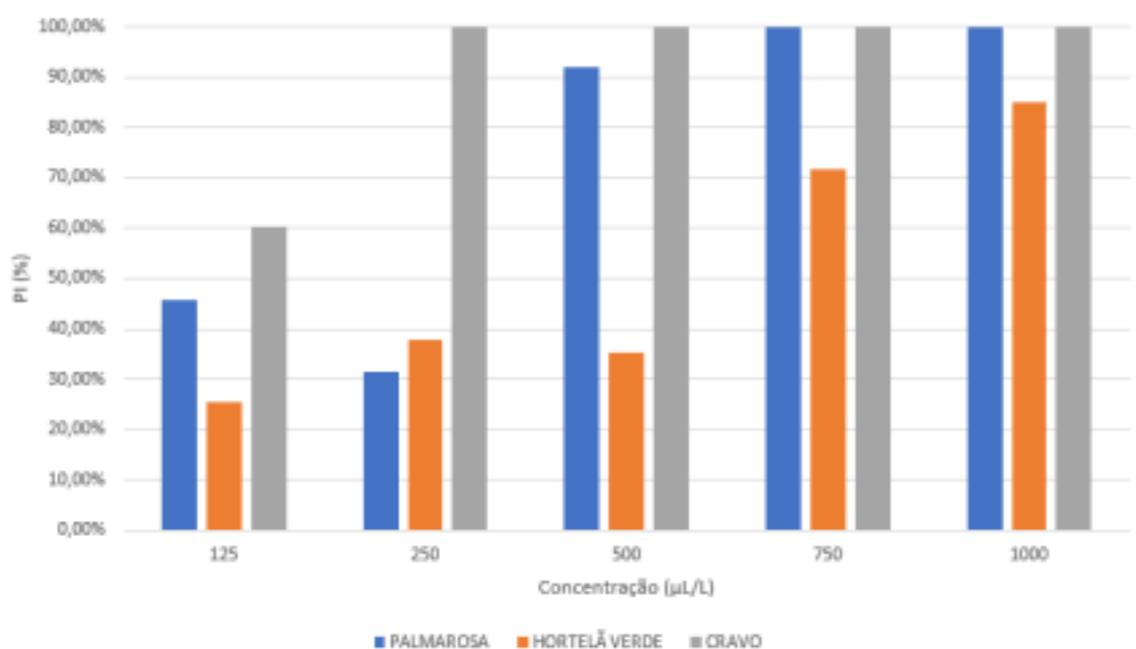


Figura 3: Porcentagem de Inibição (PI) de cada concentração testada ($\mu\text{L/L}$), dos óleos essenciais de Palmarosa, Hortelã-verde e Cravo da Índia.

A partir da análise da Figura 3 é possível observar que o OE de maior potencial inibitório é o de Cravo da Índia, que obteve uma inibição máxima mesmo em concentrações mais baixas (a partir de $250\mu\text{L}$). Este gráfico também confirma que o OE de Palmarosa apresenta um potencial inibitório máximo às concentrações de 750 e $1.000\mu\text{L}$, confirmando o que havia sido exposto na figura 1. Todavia, o OE de Hortelã-verde, demonstrou uma menor porcentagem de inibição do crescimento do fungo, atingindo valores maiores de inibição, em concentrações de 750 e $1.000\mu\text{L}$, resultados distintos do primeiro ensaio, o que torna os dados obtidos, inconclusivos.

5. Conclusões

Os resultados indicam o potencial de uso dos OEs testados para controle fúngico e também bacteriano. O OE de cravo da Índia e de Palmarosa se destacaram, com altas propriedades antifúngicas (inibição do crescimento a partir de $250\mu\text{L}$ e $750\mu\text{L}$, respectivamente) e também antibacterianas, com o OE de Cravo da Índia como único com atividade bacteriostática, contra *S. aureus*. Por fim, OE de Hortelã-verde foi o que obteve menor potencial antibacteriano, com as maiores CIMs e CBMs ($0,781$ para *E.coli* e $3,125$ para *S.aureus*), e os testes de seu potencial antifúngico foram inconclusivos, tonando necessário mais ensaios com *Penicillium* spp.

Literatura Consultada

[AIJUKA](#), M., [BUYS](#), E. M. 2019. **Persistence of Foodborne Diarrheagenic Escherichia Coli in the Agricultural and Food Production Environment: Implications for Food Safety and Public Health.** *Food Microbiology*, v.82, p.363-370

ALMEIDA J. R. G. A., SILVA-FILHO R. N., NUNES X. P., DIAS C. S., PEREIRA F. O., Lima EO 2006. **Antimicrobial activity of the essential oil of Bowdichia virgilioides Kunt.** *Rev Bras Farmacogn* 16(Supl.): 638-641.

ALEXOPOULOS, A., KIMBARIS, A. C., PLESSAS, S., MANTZOURANI, I., VOIDAROU, C., PAGONOPOULOU, O., TSIGALOU, C., FOURNOMITI, M., BONTSIDIS, C., STAVROPOULOU, E., PAPAEMMANOUI, V., BEZIRTZOGLU E. 2019. **Combined Action of Piperitenone Epoxide and Antibiotics Against Clinical Isolates of Staphylococcus aureus and Escherichia coli.** *Frontiers in Microbiology*, v. 10, article 2607.

ALOLGAA, N. R., CHÁVEZ LÉON, M. A. S. C., OSEI-ADJEI, G., ONOJA, V. 2019. **GC-MS-based metabolomics, antibacterial and antiinflammatory investigations to characterize the quality of essential oil obtained from dried Xylopia aethiopica fruits from Ghana and Nigeria.** *Journal of Pharmacy And Pharmacology*.

ARRUDA, T. A., ANTUNES, R. M. P., CATÃO, R. M. R., LIMA, E. O., SOUSA, D. P., NUNES, X. P., PEREIRA, M. S. V., BARBOSA-FILHO, J. M., CUNHA, E. V. L. 2006. **Preliminary study of the antimicrobial activity of Mentha x villosa Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues.** *Rev Bras Farmacogn* 16: 307-311.

ARWEILER, N. B., DONOS, N., NETUSCHIL, L., REICH, E., SCULEAN, A. 2000. **Clinical and antibacterial effect of tea tree oil - a pilot study.** *Clin Oral Investig* 4: 70- 73.

ATARÉS, L.; BONILLA, J.; CHIRALT, A. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 678–687, 2010.

ATARÉS, L., DE JESÚS, C., TALENS, P., CHIRALT, A. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, v.99, p.384–391, 2010.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-75, 2008.

BAY M., OLIVEIRA J. V. S., JUNIOR, P. A. S., MURTA, S. M. F., SANTOS, A. R., BASTOS, I. S., ORLANDI, P. P., JUNIOR, P. T. S. 2019. **In vitro Trypanocidal and Antibacterial Activities of Essential Oils from Four Species of the Family Annonaceae.** *Chemistry & Biodiversity*, 16(11): e1900359.

BHAVANANI, S. M., BALLOW, C. H. 1992. **New agents for Gram-positive bacteria.** *Curr Opin Microbiol* 13: 528-534.

BENKEBLIA, N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions

(*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm-Wiss Technol* 37: 263-268.

BREDA, C. A. **Emprego de extratos de folhas e resíduos de espécies frutíferas do cerrado como fungicidas naturais em filmes e revestimentos comestíveis**. 168 p. Tese - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas. 2015.

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.

CLAFFEY, N. 2003. **Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management**. *J Clin Periodontol* 30: 22- 24.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, CLSI document M02-A10, 2009.

CRUZ, M. M.; LINS S. R. O.; OLIVEIRA, S. M. A.; BARBOSA, M. A. G. Efeito de óleos essenciais e revestimentos comestíveis sobre podridões pós-colheita em manga, cv. Kent. *Revista Caatinga*, Mossoró, v. 25, n. 2, p. 1-6, 2012.

DANTAS et al., Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. *Fitopatologia Brasileira*, n.28, p.528-533, 2003.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. v.15, p. 167-193, 2002.

EMREA, I., KURŞAT, M., YILMAZ, O., ERECEV, P. 2019. **Chemical compositions, radical scavenging capacities and antimicrobial activities in seeds of *Satureja hortensis* L. and *Mentha spicata* L. subsp. *spicata* from Turkey**. *Brazilian Journal of Biology*.

GEMEDA, N., WOLDEAMANUEL, Y., ASRAT, D., DEBELLA, A. 2014. **Effect of *Cymbopogon martinii*, *Foeniculum vulgare*, and *Trachyspermum ammi* Essential Oils on the Growth and Mycotoxins Production by *Aspergillus* Species**. *International Journal of Food Science*.v.2014.

HENNEKINNE, J. A., BUYSER, M. L., DRAGACCI, S. 2011. **Staphylococcus Aureus and Its Food Poisoning Toxins: Characterization and Outbreak Investigation**. *FEMS Microbiol. Rev*, v.36(4), p.815-36.

KANASHIRO, ALINE MIDORI; AKIYAMA1, DANIEL YURI; KUPPER, KATIA CRISTINA AND FILL, TAÍCIA PACHECO. **Penicillium italicum: An Underexplored Postharvest Pathogen**. *Frontiers in Microbiology*. V. 11.

KATIKI, L. M., CHAGAS, A. C. S., BIZZO, H. R., FERREIRA J. S. F., AMARANTE, A. F. T. 2019. **Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different in vitro tests**. *Veterinary Parasitology*, 183: 103-108.

FINE, D. H., FURGANG, D., BARNETT, M. L., DREW, C., STEINBERG, L., CHARLES, C. H., VINCENT, J. W. 2000. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. *J Clin Periodontol* 27:

LEILEI YU, NANZHEN QIAO, JIANXIN ZHAO, HAO ZHANG, FENGWEI TIAN, QIXIAO ZHAI, WEI CHEN. 2020. **Postharvest control of *Penicillium expansum* in fruits: A review.** *Food Bioscience*. Volume 36.

LUCARINI, A.C.; SILVA, L.A. da; BIANCHI, R.A.C. Um sistema para contagem semiautomática de microorganismos. **Revista Pesquisa e Tecnologia - FEI**, n.26, p.36- 40, 2004.

MELO, R. S., AZEVEDO A. M. A., PEREIRA, A. M. G., ROCHA, R. R., CAVALCANTE, R. M. B, MATOS, M. N. C., LOPES, P. H. R., GOMES, G. A., RODRIGUES, T. H. S., SANTOS, H. S, PONTE, I. L., COSTA, R. A., BRITO, G. S., JÚNIOR, F. E. A. C., CARNEIRO, V. C. 2019. **Chemical Composition and Antimicrobial Effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil Against Multidrug-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.** *MDPI: Molecules*, 24, 3864.

MUNTEAN D., LICKER, M., ALEXA, E., POPESCU, I., JIANU, C., BUDA, V., DEHELEAN, C. A., GHIULAI, R., HORHAT, F., HORHAT, D., DANCIU, C. 2019. **Evaluation of essential oil obtained from *Mentha×piperita* L. against multidrug resistant strains.** *DovePress*. 12, p.2905–2914.

NATTA, L., K. ORAPIN, N. KRITTIKA AND B. PANTIP. Essential oil from five Zingiberaceae for anti food-borne bacteria. **Int. Food Res. J.**, 15, p. 337–346, 2008.

NIKOLIĆ, et al. Antibacterial and anti-biofilm activity of ginger (*Zingiber Officinale* (roscoe)) ethanolic extract. ***kragujevac j. sci.*** 36, p.129-136, 2014.

NUNES, X. P., MAIA, G. L. A., ALMEIDA, J. R. G.S, PEREIRA, F. O., LIMA, E. O. 2006. **Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L.** *Rev Bras Farmacogn* 16(Supl.): 642-644.

OLIVEIRA, D., ANABELA BORGES, A., SIMÕES, M. 2015. ***Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases.** *MDPI: Toxins*.v.10, p. 252.

PAN, P., BARNETT, M. L., COELHO, J., BROGDON, C., FINNEGAN, M. B. 2000. **Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method.** *J Clin Periodontol* 27: 256-261.

PANDU SASTRY KAKARAPARTHI, P. S., SRINIVAS, K. V. N. S., KUMAR, J. K., KUMAR, A. N., RAJPUT, D. K., ANUBALA, S. 2015. **Changes in the essential oil content and composition of palmarosa (*Cymbopogon martini*) harvested at different stages and short intervals in two different seasons.** *Industrial Crops and Products*. 69: 348-354.

PANKEY, GEORGE A.; SABATH, L. D. **Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections.** *Clinical infectious diseases*, v. 38, n. 6, p. 864-870, 2004.

PERRONE, GINCARLO AND ANTONIA, SUSCA. 2017. **Penicillium Species and Their Associated Mycotoxins**. *Methods in Molecular Biology, Mycotoxigenic Fungi*. Volume 1542, capítulo 5.

PINTO, S. M. L., RIVERA, Y., SANDOVA, L. V. H., LIZARAZO, J. C., RINCÓN, J. J., MÉNDEZ, L. Y. V. 2019. **Semisynthetic eugenol derivatives as antifungal agents against dermatophytes of the genus *Trichophyton***. *Journal of Medical Microbiology*. 68:1109–1117.

PRATES, L. H. F., FARONI, L. R. D, HELENO, F. F., QUEIROZ, M. E. L. R., SOUSA, A. H., SILVA, M. V. A. 2019. **Eugenol difusion coefcient and its potential to control *Sitophilus zeamais* in rice**. *Nature*. 9:11161.

RAHMANI, A. H.; SHABRMI, F. M. A.; ALY, S. M. Active ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases via modulation of biological activities. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, v.6, n.2, p.125-136. 2014.

RAHO, G. B., BENALI, M. 2012. **Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus***. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(9): 739-742.

RAEISI, M., TAJIK, H., RAZAVI ROOHANI S. M., MAHAM, M., MORADI, M., HAJIMOHAMMADI, B., NAGHILI, H., HASHEMI, M., MEHDIZADEH, T. 2012. **Essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus*) antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in culture media and Iranian white cheese**. v.4, n.1: 30-34.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M., MOSQUEDA-MELGAR, J., MARTÍN-BELLOSO, O. 2008. **Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon**. *International Journal of Food Microbiology*.v.121, p.313–327.

REHDER, V. L. G., MACHADO, A. L. M., DELARMELENA, C., SARTORATTO, A., FIGUEIRA, G. M., DUARTE, M. C. T. 2004. **Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare***. *Rev Bras Pl Med* 6: 67-71.

SA-NGUANPUAG, K.; KANLAYANARAT, S.; SRILAONG V.; TANPRASERT, K.; TECHAVUTHIPORN, C. Ginger (*Zingiber officinale*) oil as an antimicrobial agent for minimally processed produce: a case study in shredded green papaya. **Int. J. Agric. Biol.**, 13, p. 895–901, 2011.

SEYMOUR, R., 2003. **Additional properties and uses of essential oils**. *J Clin Periodontol* 30: 19-21.

SIQUI et al. A. C., SAMPAIO, A. L. F., SOUSA, M. C., HENRIQUES, M. G. M. O., RAMOS, M. F. S. 2000. **Óleos essenciais - potencial antiinflamatório**. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 16: 38-43.

SRIDHAR, S. R.; RAJAGOPAL, R. V.; RAJAVEL, R.; MASILAMANI, S.; NARASIMHAN, S. Antifungal Activity of Some Essential Oils. **J. Agric. Food Chem.** v. 51, p. 7596–7599, 2003

TOLBA, H.; MOGHRANI, H.; BENELMOUFFOK, A.; KELLOU, D.; MAACHI, R. Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antifungal activity. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, v. 25, n. 4, p. e128-e133, 2015.

VIOLLON, C., CHAUMONT, J. P. 1994. **Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans***. *Mycopathologia*.v.128, p.151-153.

ZHAOHAI WU, Z., TAN, B., LIU, Y., DUNN, J., GUEROLA, P. M., TORTAJADA, M., CAO, Z., JI, P. 2019. **Chemical Composition and Antioxidant Properties of Essential Oils from Peppermint, Native Spearmint and Scotch Spearmint**. *MDPI: Molecules*. 24, p.2825