

Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda)

Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Eucalyptus paniculata* (eucalyptus) and *Lavandula angustifolia* (lavender)

RIALA6/1492

Sheila Mello da SILVEIRA^{1,2}, Anildo CUNHA Jr.³, Gerson Neudí SCHEUERMANN³, Fábio Luiz SECCHI², Silvani VERRUCK², Marisete KROHN², Cleide Rosana Werneck VIEIRA^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Av. Admar Gonzaga, 1.346, Itacorubi, CEP: 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. Tel.: +55 (48) 3721-5380/5378. Fax: +55 (48) 3334-6086. E-mail: cleiderosana@cca.ufsc.br

²Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia, Concórdia, SC, Brasil

³Laboratório de Análises Físico-Químicas (LAFQ), Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – Fapesc (Edital 8/2009, processo FCTP 3302/091)

Recebido: 25.10.2011 – Aceito para publicação: 03.06.2012

RESUMO

Neste estudo, foi determinada a composição química de óleos essenciais obtidos de três espécies de plantas medicinais cultivadas na região Sul do Brasil: *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda), e as atividades antimicrobianas foram avaliadas frente a 11 espécies de bactérias, incluindo-se espécies de importância em alimentos e em saúde pública. A composição dos óleos essenciais, obtidos por destilação a vapor, foi determinada por CG/DIC e CG/EM; a atividade antimicrobiana foi detectada pela técnica de difusão em disco; a CMI e a CMB foram determinadas pela metodologia de microdiluição. Os óleos essenciais de lavanda e citronela apresentaram monoterpenos oxigenados como componentes majoritários e, no óleo essencial de eucalipto, os monoterpenos hidrocarbonados foram os principais constituintes. O óleo essencial de citronela foi o mais ativo contra a maioria das bactérias testadas, com valores de CMI e CMB, respectivamente, de 0,075 e 0,31 mg/mL para *Yersinia enterocolitica*. O óleo essencial de lavanda destacou-se pela atividade inibitória contra *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*, e o óleo de eucalipto foi ativo contra *Pseudomonas aeruginosa*. Este estudo demonstra que os óleos essenciais avaliados apresentam potencial para aplicação como agentes antimicrobianos naturais.

Palavras-chave. óleos voláteis, antimicrobianos, produtos naturais, plantas medicinais.

ABSTRACT

The chemical composition of essential oils derived from three medicinal plant species growing in the South of Brazil: *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Eucalyptus paniculata* (eucalyptus), and *Lavandula angustifolia* (lavender) was determined, and their antimicrobial activities were evaluated against 11 bacterial species, including those related to foodborne and human pathogens. The essential oils were obtained by steam distillation, and its chemical composition was analyzed by GC and GC/MS. Antimicrobial activity was screened by disc-diffusion assay. MIC and MBC of the sensitive strains were determined by microdilution methodology. The main components of lavender and citronella essential oils were the oxygenated monoterpenes, and the monoterpene hydrocarbons in eucalyptus oil. Citronella oil showed the lowest MIC and MBC values on the majority of the tested bacteria, and the MIC and MBC values against *Yersinia enterocolitica* were of 0.075 and 0.31 mg/mL, respectively. The lavender oil was active against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*, and the eucalyptus inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. This study showed that the evaluated essential oils might be potentially used as natural antimicrobial agents.

Keywords. volatile oils, antimicrobials, natural products, medicinal plants.

INTRODUÇÃO

A vida vegetal tem sido, ao longo das eras de evolução, alimento e remédio para toda a sorte de espécies animais, das mais primitivas às mais especializadas. A busca e o uso de plantas com propriedades bioativas é uma prática multimilenar, atestada em vários tratados de fitoterapia das grandes civilizações há muito desaparecidas^{1,2}. Atualmente, com a emergência de linhagens de bactérias resistentes à maioria dos antimicrobianos disponíveis, observa-se uma renovação no interesse pela busca de agentes antimicrobianos alternativos³. Além disso, o consumidor tem valorizado cada vez mais a disponibilização de produtos cosméticos e alimentícios mais naturais, saudáveis e que possam trazer algum benefício à saúde. Esses fatores têm contribuído para aumentar o interesse na pesquisa de produtos naturais que apresentem atividades biológicas tais como a atividade antimicrobiana^{4,5}.

Óleos essenciais são produtos aromáticos e voláteis derivados do metabolismo secundário de plantas, formados em células e grupos de células especiais, e normalmente encontram-se concentrados em uma determinada região, tal como folhas, frutos ou casca⁶.

Encontram-se, na literatura, várias publicações a respeito da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais³⁻⁵. Entretanto, frequentemente verificam-se diferenças significativas na atividade antimicrobiana reportada para uma mesma espécie vegetal. Essas diferenças devem-se, principalmente, às diferentes localizações geográficas, época de coleta, genótipo e condições climáticas⁷, sendo, portanto, necessária a caracterização da composição química e da atividade biológica de óleos essenciais obtidos a partir de plantas de uma determinada região.

O gênero *Cymbopogon* inclui cerca de 140 espécies e é amplamente distribuído nas regiões de climas semitemperado a tropical em todo o mundo. Duas espécies principais de citronela são conhecidas e têm importância industrial na área farmacêutica, cosmética e de perfumaria: *C. nardus* (citronela do Ceilão) e *C. winterianus* (citronela de Java)⁸. Dentre suas atividades biológicas, destacam-se a ação repelente de insetos⁹, apresentando atividade contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*¹⁰ e a atividade antimicrobiana^{11,12}.

As plantas do gênero *Lavandula*, pertencentes à família *Lamiaceae*, têm sido utilizadas para uma variedade de propósitos cosméticos e terapêuticos. As

principais espécies de uso medicinal são *L. angustifolia* (*L. officinalis*), *L. stoechas*, *L. latifolia* e *L. x intermedia*, sendo esta última um cruzamento estéril entre *L. latifolia* e *L. angustifolia*. O óleo essencial de lavanda é bastante utilizado na aromaterapia, com efeitos neurológicos benéficos no alívio dos sintomas de estresse e depressão. Também são relatados efeitos antiespasmódico, analgésico, pesticida e antimicrobiano¹³, com atividade antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina-resistentes (MRSA)¹⁴ e atividade antifúngica¹⁵. Os constituintes do óleo essencial de uma mesma espécie de lavanda podem variar consideravelmente dependendo da cultivar e do método de extração, e essa variação poderá determinar o valor de mercado e as possíveis aplicações do produto¹³. Diferenças na composição química tornam alguns óleos essenciais mais efetivos contra determinadas espécies de bactérias, direcionando seu uso terapêutico¹⁶.

Diversas espécies do gênero *Eucalyptus* vêm sendo cultivadas em larga escala em várias partes do mundo. No Brasil, esse gênero é encontrado em todas as regiões, sendo conhecidas cerca de 400 espécies, das quais são utilizados desde o caule, para a extração da celulose, até as folhas, que armazenam óleos essenciais de diferentes composições químicas¹⁷. Extratos obtidos a partir das folhas de eucalipto são aprovados para o uso como aditivos alimentares, sendo também de uso corrente em formulações cosméticas¹⁸. Espécies de eucalipto também são utilizadas na medicina popular como antisséptico e contra infecções do trato respiratório superior, em gripes, resfriados e congestão nasal¹⁹. Encontra-se, na literatura, várias publicações relativas à atividade antimicrobiana de espécies de eucalipto^{17,18,20}, entretanto, não encontramos dados acerca dessa atividade para a espécie *Eucalyptus paniculata* Smith (*Myrtaceae*), tema do presente estudo.

Considerando o amplo potencial de aplicação dos óleos essenciais provenientes das espécies mencionadas, bem como o fato de que uma espécie vegetal pode apresentar composição química – e, portanto, também atividade biológica – variável conforme a localização geográfica, o objetivo deste estudo foi determinar a composição química de óleos essenciais obtidos de três espécies de plantas medicinais cultivadas na região Sul do Brasil: *Cymbopogon winterianus* (DC) Stapf. (*Poaceae*) (citronela), *Eucalyptus paniculata* Sm. (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* Mill. (*Lamiaceae*) (lavanda), e avaliar sua atividade antimicrobiana frente a 11 espécies de bactérias, dentre elas espécies de importância em alimentos e em saúde pública.

Tabela 1. Espécies vegetais, número de registro e partes utilizadas na obtenção dos óleos essenciais

Nome comum	Nome científico	Registro ^a	Data de coleta	Parte destilada
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> (DC) Stapf.	HVAT 2605	17/02/2010	Folhas
Eucalipto	<i>Eucalyptus paniculata</i> Sm.	HVAT 2599	15/03/2010	Folhas
Lavanda	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	HVAT 2601	29/10/2009	Folhas e sumidades floridas

^a Fonte: Herbário do Museu de Ciências Naturais da UNIVATES (HVAT, Lajeado, RS).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal foi coletado na cidade de Concórdia (SC) (27° 14' 02" S 52° 01' 40" O), no período de novembro de 2009 a março de 2010. A identificação botânica das espécies foi realizada pelo Dr. A. Jasper (Univates, RS, Brasil), e as exsiccatas (Tabela 1) foram depositadas no Herbário do Museu de Ciências Naturais do Departamento de Botânica e Paleobotânica (Univates).

Óleos essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos a partir das partes aéreas das plantas pelo processo de destilação a vapor, usando-se um destilador em escala-piloto fabricado em aço inoxidável. Inicialmente, cerca de 5 kg do material vegetal fresco foram acondicionados no sistema de extração. Então, o vapor foi gerado e conduzido por meio do material vegetal para liberação do conteúdo aromático. Ao final, o vapor foi condensado, para render o hidrolato e o respectivo óleo essencial. O processo foi acompanhado por 2 horas. O conteúdo condensado foi reunido e transferido para funil de separação, onde o óleo essencial foi prontamente obtido pela separação espontânea das fases. A fase superior foi coletada em tubo tipo Falcon de 50 mL contendo 0,5 g de Na₂SO₄ anidro. A amostra foi agitada em vortex por 30 segundos e centrifugada a 2.000 rpm por 10 minutos a 5 °C. O óleo essencial obtido como um líquido límpido foi transferido para frasco de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração a 4 °C.

Análise por cromatografia gasosa (CG/DIC)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Varian CP 3800 (Walnut Creek, CA, USA) equipado com injetor *split/splitless* e um amostrador automático Varian CP 8100 autoinjector. Nas separações cromatográficas utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (Restek, Bellefonte, IL, USA) com 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm de espessura de filme e fase estacionária composta por poli (5% difenil 95% dimetil) siloxano. Programa de temperatura do forno: 50 °C (2

min.); 220 °C (2 °C/min); 220 °C (3 min.). Temperatura do injetor: 240 °C. Temperatura do detector (DIC): 240 °C. Gás de arraste: N₂, fluxo de 1,2 mL/min. As amostras foram previamente dissolvidas em CH₂Cl₂ (1:100 v/v) e 1 µL da solução resultante foi injetado no modo *split* (1:10). Os dados foram adquiridos usando-se o *software* Star Chromatography Workstation (Varian). As amostras de óleos essenciais foram analisadas em triplicata. A quantificação foi realizada por normalização das áreas dos picos obtidas por integração eletrônica do cromatograma.

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (Shimadzu GCMS-QP2010) utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (Restek, Bellefonte, IL, USA) com 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm de espessura de filme e fase estacionária composta por poli (5% difenil 95% dimetil) siloxano. O programa de temperatura foi o mesmo descrito na seção anterior, e o gás de arraste utilizado foi o Hélio, a um fluxo de 1,2 mL/min. Parâmetros de operação do EM: temperatura da interface: 220 °C; modo de ionização por impacto eletrônico a 70 eV; faixa de massa: 35-350 *m/z* (0,5 scan/s). As amostras foram previamente dissolvidas em CH₂Cl₂ (1:100 v/v) e 1 µL da solução resultante foi injetado no modo *split* (1:10). Os componentes individuais foram identificados inicialmente por comparação dos respectivos espectros de massas com aqueles disponíveis na base de dados NIST 05 e por comparação dos índices de retenção (IR) relativos uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos C₇-C₃₀ com valores descritos na literatura²¹.

Atividade antimicrobiana

Culturas bacterianas

Os óleos essenciais foram testados frente a 11 espécies de bactérias, sendo 5 espécies Gram-positivas e 6 espécies Gram-negativas, a saber: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC

11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610.

As cepas foram mantidas a -20 °C nos meios de cultura apropriados adicionados de 10% de glicerol, e repicadas a cada 15 dias para tubos inclinados de ágar triptose de soja (TSA), mantidos a 4 °C.

Deteção da atividade antimicrobiana – ensaio de disco-difusão

A detecção de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre as bactérias testadas foi realizada por meio do método de disco-difusão²², com adaptações. As culturas em TSA foram repicadas para ágar sangue e incubadas a 35 °C por 12-18 horas, para verificação da morfologia das colônias e a pureza da cultura. A partir dessas placas, tomou-se 3 a 5 colônias isoladas e transferiu-se para caldo triptose de soja (TSB), incubado a 35 °C por 2 a 6 horas, a fim de obter-se uma cultura em crescimento ativo. O inóculo foi preparado a partir da cultura ativa de cada espécie bacteriana, diluída em solução salina 0,9% a uma concentração de aproximadamente 10⁸ UFC/mL, comparável à solução padrão de McFarland 0,5, verificada espectrofotometricamente a 625 nm. A suspensão foi diluída a aproximadamente 10⁷ UFC/mL, em solução salina, e essa suspensão foi utilizada para inocular placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton, utilizando-se *swab* estéril.

Discos de papel filtro estéreis (9 mm de diâmetro e 250 g/m²) foram impregnados com 25 µL de óleo essencial puro e depositados sobre as placas inoculadas, incubadas a 36 °C por 18-24 horas. Discos comerciais de ampicilina (10 µg/disco) e cloranfenicol (30 µg/disco) foram utilizados como antibióticos de referência.

O diâmetro da zona de inibição foi medido, em milímetros, e a inibição foi classificada em forte, moderada ou fraca conforme Carovic-Stanko et al.²³, adaptando-se os valores ao diâmetro dos discos utilizados. O ensaio foi realizado em quadruplicata e o valor apresentado como a média (± desvio padrão).

Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Os óleos essenciais foram avaliados quanto à concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração

Mínima Bactericida (CMB) para as espécies bacterianas que se mostraram sensíveis no teste de disco-difusão. A CMI foi determinada por meio do método de microdiluição²⁴, com modificações. O inóculo foi preparado conforme descrito no item anterior.

Os óleos essenciais foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) à concentração de 100 mg/mL. A seguir, foram preparadas séries de diluições sucessivas, na faixa de 10 mg/mL a 0,075 mg/mL, em caldo Mueller-Hinton.

Foram adicionados aos poços das placas de microdiluição 100 µL de cada solução diluída e 5 µL da suspensão bacteriana. Em cada placa, foram mantidos controles de esterilidade (sem adição de inóculo) e controles de crescimento (caldo Mueller-Hinton adicionado de DMSO e inóculo). A pureza das suspensões de inóculo foi verificada por meio da inoculação simultânea em ágar não seletivo. As placas foram incubadas a 36 °C por 18 horas, e o crescimento microbiano detectado visualmente e confirmado pela adição de 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% (m/v) com incubação adicional de 1 hora, à mesma temperatura. Todos os ensaios foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em mg/mL. A CMI foi definida como a menor concentração do óleo essencial que inibiu totalmente o crescimento microbiano²⁵.

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada a partir das microplacas utilizadas para a determinação da CMI. De cada poço onde não ocorreu crescimento microbiano visível, foram transferidas alíquotas (10 µL) para placas de ágar triptona de soja (TSA). As placas foram incubadas a 36 °C por 24 horas, e o crescimento de colônias foi verificado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados, expressos em mg/mL. A CMB foi definida como a menor concentração de cada óleo essencial que impediu totalmente o crescimento microbiano nas placas sem a presença do agente antimicrobiano.

Análise estatística

Os dados referentes à avaliação da atividade antimicrobiana (teste de difusão em disco) foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) para cada espécie de bactéria, e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa Statistica-Statsoft® 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta a composição dos óleos essenciais avaliados, determinada por cromatografia gasosa (CG -DIC e CG/EM). Neste estudo, foi possível identificar 61 compostos, que representaram de 94,87 a 97,49% da composição dos óleos voláteis. A Tabela 3 apresenta a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, avaliada por meio do teste de difusão em

disco. Os três óleos essenciais avaliados apresentaram atividade antimicrobiana, contra diferentes espécies de bactérias e em diferentes intensidades. A CMI e a CMB foram determinadas para as espécies bacterianas que se mostraram sensíveis no teste de difusão em disco. Conforme pode ser observado na Tabela 4, os valores de CMI situaram-se entre 0,075 e >10 mg/mL e os de CMB, entre 0,31 e >10 mg/mL.

Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais avaliados

Composto ^a	RIE ^b	<i>C. winterianus</i> (Citronela)	<i>E. paniculata</i> (Eucalipto)	<i>L. angustifolia</i> (Lavanda)
α-Tujeno	924	-	-	0,27
α-Pineno	930	-	55,47	3,24
Canfeno	944	-	0,54	0,91
Sabineno	970	-	-	0,39
α-Pineno	972	-	-	5,04
1-Octen-3-ol	981	-	-	0,31
α-Mirceno	991	-	-	0,80
α-Felandreno	1004	-	0,24	-
o-Cimeno	1022	-	11,78	0,49
(+)-Silvestreno	1026	-	-	2,39
D-Limoneno	1026	2,89	2,08	-
1,8-Cineol	1028	-	5,61	46,78
α-Terpineno	1056	-	15,84	0,13
Fenchona	1086	-	-	7,94
Linalol	1102	0,66	0,18	3,03
Fenchol	1113	-	0,28	2,78
<i>trans</i> -Pinocarveol	1137	-	-	0,99
Cânfora	1141	-	-	13,71
Isopulegol	1144	0,29	-	-
<i>trans</i> -Verbenol	1145	-	-	0,17
Citronelal	1154	41,80	-	-
Pinocarvona	1160	-	-	0,51
Borneol	1165	-	0,52	0,53
Terpinen-4-ol	1176	-	0,35	0,38
Criptona	1186	-	-	0,38
α-Terpineol	1191	-	0,75	0,87
Mirtenal	1194	-	-	0,74
Mirtenol	1197	-	-	0,38
Verbenona	1209	-	-	0,15
α-Citronelol	1233	10,44	-	-
<i>cis</i> -Carveol	1221	-	0,14	-
Neral	1242	0,65	-	-
Carvona	1244	-	-	0,23
Geraniol	1259	19,63	-	-
Geranial	1273	0,75	-	-
Acetato de citronelila	1356	2,64	-	-
Acetato de α-Terpinila	1249	-	0,17	-
Eugenol	1359	0,80	-	-
Acetato de geranila	1387	5,50	-	-
α-Cariofileno	1413	-	0,15	0,20

Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais avaliados (continuação)

Composto ^a	RIE ^b	<i>C. winterianus</i> (Citronela)	<i>E. paniculata</i> (Eucalipto)	<i>L. angustifolia</i> (Lavanda)
Aromadendreno	1433	-	0,28	-
α-Bergamoteno	1433	-	-	0,23
α-(E)-Farneseno	1457	-	-	0,16
Germacreno D	1476	1,25	-	-
α-Selineno	1480	-	-	0,57
α-Elemeno	1492	-	-	0,13
α-Muroleno	1499	0,92	-	-
α-Bisaboleno	1507	-	-	0,27
α-Cadineno	1520	0,82	-	-
α-Elemol	1548	2,48	-	-
Germacreno D-4-ol	1572	2,79	-	-
Spatulenol	1574	-	0,19	-
Óxido de cariofileno	1577	-	-	0,59
Globulol	1587	-	0,12	-
Veridiflorol	1587	-	0,18	-
τ-Murolol	1639	0,87	-	-
β-Eudesmol	1646	0,34	-	0,18
Óxido de α-Bisabolol A	1651	-	-	0,17
α-Cadinol	1652	1,29	-	-
α-Bisabolol	1683	-	-	1,45
(E,E)-Farnesol	1724	0,21	-	-
Total identificado (%)		97,02	94,87	97,49
Monoterpenos hidrocarbonados		2,89	85,95	13,66
Monoterpenos oxigenados		82,36	8,00	79,57
Sesquiterpenos hidrocarbonados		2,99	0,43	1,56
Sesquiterpenos oxigenados		7,98	0,49	2,39
Rendimento (% p/p material fresco)		0,48	0,25	0,19
Matéria seca (%)		24,72	31,42	26,40

^aOs compostos estão listados em ordem de eluição da coluna Rtx-5MS

^bÍndice de retenção determinado experimentalmente na coluna Rtx-5MS utilizando-se uma série homóloga de alcanos C₈-C₃₀

Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *C. winterianus*, *E. paniculata* e *L. angustifolia*, detectada através do teste de difusão em disco (mm)^a

	Citronela (<i>C. winterianus</i>)	Eucalipto (<i>E. paniculata</i>)	Lavanda (<i>L. angustifolia</i>)	Ampicilina	Cloranfenicol
<i>S.aureus</i>	33,7 ± 1,5 ^a	22,9 ± 0,5 ^c	21,6 ± 1,4 ^c	36,4 ± 1,8 ^a	26,1 ± 0,5 ^b
<i>E.faecalis</i>	17,7 ± 0,6 ^c	16,0 ± 0,6 ^d	15,6 ± 0,7 ^d	27,0 ± 0,4 ^a	23,6 ± 0,2 ^b
<i>L.monocytogenes</i>	28,0 ± 1,6 ^b	21,5 ± 1,3 ^c	13,2 ± 0,5 ^d	31,1 ± 0,9 ^a	28,4 ± 1,0 ^b
<i>B.cereus</i>	50,7 ± 2,5 ^a	22,4 ± 1,2 ^c	14,0 ± 0,0 ^d	12,1 ± 0,2 ^d	27,9 ± 0,7 ^b
<i>B.subtilis</i>	85,0 ± 0,0 ^a	22,5 ± 1,1 ^c	15,9 ± 0,6 ^d	31,1 ± 1,8 ^b	29,9 ± 0,5 ^b
<i>Y.enterocolitica</i>	13,9 ± 0,6 ^d	14,0 ± 0,4 ^d	19,6 ± 1,3 ^c	21,7 ± 0,5 ^b	28,1 ± 0,5 ^a
<i>E.coli</i>	0,0 ± 0,0 ^d	0,0 ± 0,0 ^d	15,5 ± 0,8 ^c	18,9 ± 0,5 ^b	26,1 ± 0,6 ^a
<i>S.Typhimurium</i>	0,0 ± 0,0 ^d	0,0 ± 0,0 ^d	11,7 ± 0,3 ^c	27,1 ± 0,5 ^a	24,4 ± 0,5 ^b
<i>E.aerogenes</i>	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c	12,6 ± 0,2 ^b	0,0 ± 0,0 ^c	23,0 ± 0,7 ^a
<i>P.vulgaris</i>	18,5 ± 0,6 ^c	19,6 ± 0,5 ^{bc}	19,5 ± 1,0 ^{bc}	21,1 ± 1,0 ^{ab}	22,4 ± 0,8 ^a
<i>Paeruginosa</i>	0,0 ± 0,0 ^b	11,2 ± 0,3 ^a	0,0 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^b

^a Zona de inibição incluindo o diâmetro do disco, de 9 mm. Os dados referem-se à média de quatro replicatas ± desvio padrão. Grau de inibição: fraca: 10-13,9 mm; moderada: 14-18 mm; forte: >18 mm. Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma linha não são significativamente diferentes (p < 0,05).

Tabela 4. Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais de *C. winterianus*, *E. paniculata* e *L. angustifolia* (mg/mL)^{a, c}

	Citronela (<i>C. winterianus</i>)		Eucalipto (<i>E. paniculata</i>)		Lavanda (<i>L. angustifolia</i>)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>S.aureus</i>	0,62	2,5	1,25	>10	1,25	5,0
<i>E.faecalis</i>	0,075	5,0	0,075	>10	0,075	>10
<i>L.monocytogenes</i>	0,62	2,5	1,25	>10	1,25	5,0
<i>B.cereus</i>	0,075	2,5	1,25	>10	0,62	2,5
<i>B.subtilis</i>	0,075	1,25	1,25	>10	1,25	2,5
<i>Y.enterocolitica</i>	0,075	0,31	0,075	>10	0,075	2,5
<i>E.coli</i>	NA ^b	NA	NA	NA	2,5	2,5
<i>S.Typhimurium</i>	NA	NA	NA	NA	1,25	>10
<i>E.aerogenes</i>	NA	NA	NA	NA	>10	>10
<i>P.vulgaris</i>	0,31	1,25	0,62	2,5	0,62	1,25
<i>P. aeruginosa</i>	NA	NA	2,5	5,0	NA	NA

^a Os testes foram realizados em triplicata, e os resultados referem-se aos valores modais.

^b NA: não aplicável, devido à não-deteção de atividade antimicrobiana no teste prévio de difusão em disco.

^c Em todos os ensaios, foram mantidos controles de esterilidade (sem adição de inóculo) e controles de crescimento (caldo Mueller-Hinton adicionado de DMSO e inóculo).

O óleo essencial de citronela apresentou, no ensaio de difusão em disco (Tabela 3), as maiores zonas de inibição observadas para as espécies Gram-positivas *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *B. subtilis*, sendo a atividade contra *S. aureus* equivalente à da ampicilina ($p < 0,05$).

Para *L. monocytogenes*, importante patógeno alimentar, a atividade antibacteriana do óleo essencial de citronela foi equivalente ao cloranfenicol ($p < 0,05$) e semelhante à ampicilina. Esse óleo essencial apresentou ainda excepcional atividade contra as espécies de *Bacillus* testadas, com zonas de inibição significativamente superiores aos antibióticos de referência utilizados. A forte atividade apresentada no ensaio de difusão em disco foi confirmada no ensaio de microdiluição (Tabela 4), em que o óleo essencial de citronela apresentou as maiores atividades (menores valores de CMI e CMB) frente às bactérias Gram-positivas testadas. De acordo com Holetz et al.²⁶ e Ayres et al.²⁷, valores de CMI inferiores a 100 µg/mL (0,1 mg/mL) representam uma boa atividade antimicrobiana; valores situados entre 100 e 500 µg/mL (0,1-0,5 mg/mL) indicam atividade moderada; e valores entre 500 a 100 µg/mL (0,5-1,0 mg/mL) equivalem a uma fraca atividade antimicrobiana. Considerando-se essa faixa de classificação, o óleo essencial de citronela apresentou, nos ensaios de microdiluição, uma boa atividade contra *E. faecalis*, *B. cereus*, *B. subtilis* e *Y. enterocolitica*, e ainda atividade moderada contra *P. vulgaris*.

Os resultados do presente estudo concordam em parte com aqueles apresentados por Scherer et al.²⁸, que, avaliando a atividade antimicrobiana de um óleo essencial de citronela de composição química majoritária semelhante à do presente estudo, encontraram valores de CMI para *S. aureus* na faixa de 0,600 a 0,800 mg/mL, compatível com o valor encontrado no presente trabalho. Por outro lado, diferentemente dos autores citados, não detectamos atividade inibitória do óleo de citronela contra *E. coli* e *S. Typhimurium*. Em outro trabalho, Duarte et al.¹¹ também verificaram atividade inibitória do óleo essencial de citronela contra diversos sorotipos de *E. coli*, porém não apresentam a composição química do óleo em questão, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos. Tipicamente, e também no presente estudo, o composto majoritário (41,8%) desse óleo essencial, citronelal, apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, conforme reportado por Kim et al.²⁹.

A dificuldade em comparar os resultados obtidos por vários autores é frequentemente mencionada³⁰, e é um problema real enfrentado no estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e produtos derivados de plantas em geral, uma vez que existem inúmeras variações nas metodologias utilizadas, desde o método de preparação do inóculo, passando pelo método de inoculação propriamente dito, à forma de aplicação do óleo essencial, puro ou diluído – e, se diluído, o solvente utilizado, até o volume depositado nos discos, o diâmetro

dos discos e a gramatura do papel, no caso de testes de difusão em disco. Além disso, conforme apontam Cavanagh e Wilkinson¹³, tanto o método de difusão quanto o de diluição foram desenvolvidos e otimizados para testes de susceptibilidade a antibacterianos de natureza hidrofílica, e os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis e insolúveis em água. Assim, ainda segundo os autores citados, há a necessidade da padronização de um método robusto e reprodutível para a avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais, para que os resultados obtidos por diferentes autores sejam passíveis de comparação.

O óleo essencial de eucalipto apresentou, no ensaio de difusão em disco, atividade forte a moderada contra todas as bactérias Gram-positivas testadas. Dentre as espécies Gram-negativas, apresentou atividade contra *Y. enterocolitica*, *P. vulgaris* e *P. aeruginosa*, destacando-se pela inibição desta última espécie, um micro-organismo que reconhecidamente apresenta resistência a muitos agentes antimicrobianos e desinfetantes³¹.

Considerando-se os valores de CMI determinados, e a mesma classificação de níveis de atividade utilizada para o óleo essencial de citronela, o óleo essencial de eucalipto apresentou boa inibição de *E. faecalis* e *Y. enterocolitica* e uma fraca inibição de *P. vulgaris*. No presente estudo, os valores de CMI e CMB indicam que a utilização do óleo essencial da espécie de eucalipto *E. paniculata*, nas concentrações de 0,25% e 0,5%, resulta em atividade bacteriostática e bactericida, respectivamente, contra *P. aeruginosa*. Se por um lado esses valores indicam uma fraca atividade antimicrobiana em termos de terapêutica anti-infecciosa, por outro lado a aplicação desse óleo essencial pode vir a ser útil na desinfecção de ambientes e utensílios, por exemplo. A atividade antibacteriana desse óleo essencial pode ser explicada pela presença, entre outros constituintes, do composto majoritário α -pineno (55,47%), que apresenta comprovada atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas³².

Os resultados do presente estudo concordam com os dados reportados por Estanislau et al.¹⁷, que, avaliando a atividade antimicrobiana de cinco espécies de Eucalipto cultivadas em Goiás (*E. cloenziana*, *E. citriodora*, *E. grandis*, *E. microcorys* e *E. saligna*) pelo método de difusão em disco, observaram zonas de inibição de *S. aureus* ATCC 6538 variando de 8 a 20 mm e de *E. coli* ATCC 8739 desde 0 (inativo) até 20 mm, conforme a espécie de eucalipto considerada. Gilles et

al.¹⁸ avaliaram a atividade antimicrobiana de outras três espécies de eucalipto (*E. dives*, *E. olida* e *E. staigeriana*), e também verificaram diferentes perfis de inibição conforme a espécie vegetal em questão. As mesmas cepas ATCC de *S. aureus* e *P. aeruginosa* avaliadas no presente trabalho e *E. faecalis* ATCC 19433 apresentaram zonas de inibição variando de 25 a >90 mm, de 0 a 9,1 mm e de 9,1 a 20,3 mm, respectivamente, comparáveis aos resultados obtidos no presente estudo. Entretanto, não foram reportados, até o momento, dados referentes à atividade antimicrobiana da espécie *E. paniculata*. Dessa forma, os resultados do presente estudo contribuem para o conhecimento da composição química, bem como da atividade antimicrobiana do óleo essencial dessa espécie vegetal, presente na região Sul do Brasil.

O óleo essencial de lavanda apresentou o maior espectro de ação dentre os óleos essenciais avaliados, tendo sido detectada, no ensaio de difusão em disco, atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos testados, com exceção de *P. aeruginosa*. Entre os três óleos essenciais estudados, foi o único a apresentar atividade inibitória para *E. coli*, *S. Typhimurium* e *E. aerogenes*. No ensaio de difusão em disco, esse óleo essencial apresentou forte atividade contra *S. aureus*, *Y. enterocolitica* e *P. vulgaris*, atividade moderada contra *E. faecalis*, *B. cereus*, *B. subtilis* e *E. coli* e ainda uma fraca atividade inibitória frente a *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *E. aerogenes*. A determinação dos valores de CMI demonstrou boa atividade inibitória de *E. faecalis* e *Y. enterocolitica* e uma fraca inibição de *B. cereus* e *P. vulgaris*, adotando-se o mesmo critério de graduação da atividade inibitória utilizado para os demais óleos essenciais avaliados. O principal constituinte identificado nesse óleo essencial foi o 1,8-cineol (46,78%), previamente reportado³³ como o composto majoritário (65,4%) do óleo essencial obtido a partir das folhas dessa espécie de lavanda. Esse composto demonstrou ser ativo quando testado contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, conforme reportado por Sokovic et al.³² e van Vuuren e Viljoen³⁴.

Os resultados obtidos no presente estudo são semelhantes aos reportados por Alexopoulos et al.³⁵ para a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. angustifolia* sobre 24 isolados clínicos de *S. aureus* (zona média de inibição de 16 mm e CMI equivalente a aproximadamente 1,0 mg/mL). Azar et al.³⁶ reportam a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *L. angustifolia* obtidos por diferentes métodos de extração. O óleo essencial obtido por hidrodestilação apresentou

valores de CMI (determinados por meio do método de diluição em ágar) para *B. subtilis* ATCC 6633 e *E. coli* ATCC 8739 iguais a 0,5 e 1,0 mg/mL, respectivamente, demonstrando maior atividade do que a verificada no presente trabalho. Contudo, quando se busca comparar resultados obtidos por diferentes autores, é necessário considerar as variações existentes entre as metodologias e cepas empregadas. Além disso, embora se trate da mesma espécie vegetal, a composição química dos óleos essenciais apresenta diferenças, o que reforça a necessidade de se caracterizar os óleos essenciais provenientes de uma determinada região.

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. De modo geral, entende-se que a inibição do crescimento microbiano pelos óleos essenciais seja devida ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que acaba por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos³⁷. Cox et al.³⁸ avaliaram o mecanismo de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, constituído na sua maior parte por monoterpenos cíclicos, sobre *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os autores constataram que os efeitos inibitórios do óleo essencial são consistentes com a partição dos constituintes monoterpênicos na membrana celular, e que o dano causado à membrana produz diferentes efeitos em diferentes micro-organismos. Oyedemi et al.³⁹ reportam ainda a perda de conteúdo celular, como lipídios e proteínas, como efeitos de alguns componentes de óleos essenciais sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

De acordo com Rahman e Kang⁴, o risco de que micro-organismos patogênicos venham a desenvolver resistência aos óleos essenciais é muito baixo, uma vez que esses produtos contêm uma mistura de substâncias antimicrobianas, que atuam por meio de diversos mecanismos. Essa é uma característica vantajosa dos óleos essenciais sobre outros agentes antimicrobianos, que pode trazer benefícios nas diversas áreas passíveis de aplicação.

Em conclusão, com relação às bactérias Gram-positivas testadas, a atividade antibacteriana dos óleos essenciais avaliados, em ordem decrescente, apresentou-se da seguinte forma: citronela > lavanda > eucalipto. Já para as espécies Gram-negativas, a atividade inibitória dos óleos essenciais pode ser classificada na seguinte ordem: lavanda > eucalipto >

citronela. Além disso, na escolha de um óleo essencial para uma determinada aplicação, é importante que seja levado em consideração o micro-organismo de interesse, uma vez que a atividade inibitória foi diferente entre as espécies de um mesmo grupo.

REFERÊNCIAS

1. Hamburger M, Hostettmann K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochem*. 1991;30(12):3864-74.
2. Silva Junior AA. Essentia herba – Plantas bioativas. Florianópolis (SC): Epagri; 2003.
3. Militello M, Settani L, Aleo A, Mammina C, Moschetti G, Giammanco GM, et al. Chemical composition and antibacterial potential of *Artemisia arborescens* L. essential oil. *Curr Microbiol*. 2011;62:1274-81.
4. Rahman A, Kang SC. Inhibition of foodborn pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (Walt.) BSP *J Food Saf*. 2009;29:176-89.
5. Viuda-Martos M, El-Nasser A, El Gendy GS, Sendra E, Fernández-López J, El Razik KAA, et al. Chemical composition and antioxidant and anti-*Listeria* activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. *J Agric Food Chem*. 2010;58:9063-70.
6. Conner DE. Naturally occurring compounds. In: Davidson P, Branen AL (Eds.). *Antimicrobials in foods*. Nova York: Marcel Dekker; 1993. p. 441-68.
7. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2007;18(5):414-20.
8. Shasany AK, Lal RK, Patra NK, Darokar MP, Garg A, Kumar S, et al. Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. *Genet Resour Crop Evol*. 2000;47:553-9.
9. Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. Repellent activity of essential oils: a review. *Biores Technol*. 2010;101:372-8.
10. Mendonça FAC, da Silva KFS, dos Santos KK, Ribeiro Júnior KAL, Sant'Ana AEG. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*. 2005;76:629-36.
11. Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J Ethnopharmacol*. 2007;111:197-201.
12. Oliveira MMM, Brugnera DF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Piccoli RH. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. *Rev Bras Plantas Med*. 2011;13(1):8-16.
13. Cavanagh HMA, Wilkinson JM. Biological activities of lavender essential oil. *Phytother Res*. 2002;16:301-8.
14. Roller S, Ernest N, Buckle J. The antimicrobial activity of high necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA). *J Altern Complement Med*. 2009;15(3):275-9.

15. Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J Agric Food Chem*. 2000;48:2576-81.
16. Cavanagh HMA, Wilkinson JM. Lavender essential oil: a review. *Austr Infect Control*. 2005;10(1):35-7.
17. Estanislau AA, Barros FAZ, Peña AP, Santos SC, Ferri PH, Paula JR. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. *Rev Bras Farmacogn*. 2001;11(2):95-100.
18. Gilles M, Zhao J, Na M, Agboola S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chem*. 2010;119:731-7.
19. Harborne SB, Baxter H. *Phytochemical Dictionary*. Londres: Taylor and Francis; 1995.
20. Sartorelli P, Marquiere AD, Amaral-Baroli A, Lima MEL, Moreno PRH. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. *Phytother Res*. 2007;21:231-3.
21. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatographic/Quadrupole Mass Spectrometry. Carol Stream (IL): Allured; 2001.
22. NCCLS. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. The Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 8ª ed. NCCLS document M2-A8. Wayne (PA): NCCLS; 2003.
23. Carovic-Stanko K, Orlic S, Politeo O, Strikic F, Kolak I, Milos M, et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. *Food Chem*. 2010;119:196-201.
24. NCCLS. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. The Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. 6ª ed. NCCLS document M7-A6. Wayne (PA): NCCLS; 2003.
25. Smânia A Jr., Monache FD, Smânia EF, Gil ML, Benchetrit LC, Cruz FS. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *J Ethnopharmacol*. 1995;45:177-81.
26. Holecz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(7):1027-31.
27. Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Júnior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJS, et al. Atividade antibacteriana de plantas úteas e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18(1):90-7.
28. Scherer R, Wagner R, Duarte MCT, Godoy HT. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Rev Bras Plantas Med*. 2009;11(4):442-9.
29. Kim J, Marshall MR, Wei C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J Agric Food Chem*. 1995;43:2839-45.
30. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol*. 2004;94:223-53.
31. Russel AD. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *J Appl Microbiol*. 1991;71:191-201.
32. Sokovic M, Marin PD, Brkic D, Van Griensven LJLD. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food*. 2008;1(2):220-6.
33. Hajhashemi V, Ghannadi A, Sharif B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J Ethnopharmacol*. 2003;89:67-71.
34. Van Vuuren SF, Viljoen AM. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole and in combination. *Flavour Fragr J*. 2007;22:540-4.
35. Alexopoulos A, Kimbaris AC, Plessas S, Mantzourani I, Theodoridou I, Stavropoulou E. Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Anaerobe*. 2011;17:399-402.
36. Azar PA, Torabbeigi M, Sharifan A, Tehrani MS. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia* isolated by solvent free microwave assisted extraction and hydrodistillation. *J Food Biosci Technol*. 2011;1:19-24.
37. Peter KV (Ed.). *Handbook of herbs and spices*. V.2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2004.
38. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Gustafson JE, Warmington JR. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. *Molecules*. 2001;6:87-91.
39. Oyedemi SO, Okoh AI, Mabinya LV, Pirochenva G, Afolayan AJ. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *Afr J Biotechnol*. 2009;8(7):1280-6.