

## Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero *Citrus* sobre o crescimento de micro-organismos

### Inhibitory effect of essential oils from the genus *Citrus* on the microorganisms growth

RIALA6/1478

Tamara Cubiaki PIRES\*, Roberta Hilsdorf PICCOLI

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037. CEP: 37200-000, Lavras (MG), Brasil. Tel.: (35) 3829-1392. E-mail: tamarapires@bol.com.br

Recebido: 01.09.2011- Aceito para publicação: 24.04.2012

#### RESUMO

Os óleos essenciais encontrados em plantas medicinais, aromáticas e condimentares têm interessado às indústrias alimentícias, pelas suas propriedades antimicrobianas contra bactérias deteriorantes e/ou patogênicas. No intuito de avaliar o efeito inibitório dos óleos essenciais da casca e da folha de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti), foram realizados experimentos, utilizando-se a técnica de cultura de difusão em placa de ágar com as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e levedura *Candida utilis*. Para o fungo *Penicillium expansum*, foram realizadas culturas em placas-padrão com e sem a presença dos óleos. Nos ensaios *in vitro*, os óleos essenciais testados promoveram inibição de todos os micro-organismos testados, e os maiores halos ocorreram sobre a levedura *C. utilis*. Nas bactérias, os óleos induziram melhor inibição sobre *S. aureus* do que em *E. coli* e *P. aeruginosa*. O efeito inibitório dos óleos de citros foi eficaz sobre o fungo *P. expansum*, exceto o óleo de limão-cravo, que mostrou efeito estimulante de crescimento. Os óleos essenciais analisados demonstraram efeito inibitório sobre os micro-organismos avaliados.

**Palavras-chave.** essências vegetais, limão, bactérias, fungos.

#### ABSTRACT

The food industries show interest for the essential oils found in medicinal, aromatic and seasoning plants, as they contain antimicrobial activity against the decaying and/or pathogenic bacteria. In this study, the inhibitory properties of essential oils extracted from the rinds and the leaves of *Citrus limonia* Osbeck (Cravo-lemon), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (Galego-lemon) and *Citrus latifolia* Tanaka (Tahiti-lemon) were assessed on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida utilis* yeast. This experiment was performed by means of agar dish diffusion technique; the culture in plates-standard technique with and without the presence of oils was used for *Penicillium expansum* fungus. In the agar diffusion assays, the analyzed essential oils promoted the inhibition of all of the tested microorganisms; and the major inhibition haloes were detected on *Candida utilis* yeast. As for bacteria, the oils induced better inhibition on *Staphylococcus aureus* than on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The inhibitory effect of the citros oils was effective on *Penicillium expansum* fungus; excepting Cravo-lemon oil which showed a growth-stimulating effect. The oils evaluated in this study showed to have inhibitory effect on the analyzed microorganisms.

**Keywords.** plant essences, lemon, bacteria, fungi.

## INTRODUÇÃO

O uso de óleos essenciais em alimentos vem ganhando importância devido ao fato de apresentarem componentes naturais, evitando-se o uso de aditivos sintéticos, deteriorações, oxidações e o desenvolvimento de micro-organismos, demonstrando eficiência nas funções antioxidantes, anti-radicais, tais como: os carotenoides e diterpenos fenóis presentes em óleos como orégano, alecrim e coentro, e antimicrobianas em alimentos<sup>1</sup>.

Os óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana sobre grande número de bactérias deteriorantes e patogênicas, incluindo espécies resistentes a antibióticos. Eles podem apresentar ação tanto sobre bactérias Gram-positivas, quanto Gram-negativas e, ainda, leveduras e fungos filamentosos micotoxigênicos e deteriorantes<sup>2,3</sup>.

A produção do gênero *Citrus* (limão), além de destinar-se ao consumo *in natura* e à indústria de sucos, destina-se também à extração do óleo essencial contido em sua casca. Este óleo é comumente utilizado por indústrias de bebidas, refrigerantes, cosméticos, essências aromáticas e culinária, entre outras<sup>4</sup>.

Pesquisas limitadas têm sido realizadas sobre os óleos essenciais de espécies *Citrus*, em termos de seu uso como agente antimicrobiano em alimentos. Porém, esses compostos têm demonstrado possuir propriedades antimicrobianas potenciais não somente sobre leveduras e bactérias produtoras de esporos, mas também sobre bactérias que causam deterioração em alimentos<sup>5</sup>.

Os alimentos podem apresentar diversos micro-organismos, muitas vezes patogênicos, os quais poderão sintetizar substâncias tóxicas, prejudiciais se ingeridas pelo homem ou animal, ou também deteriorantes, causando diversos prejuízos para as indústrias.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito inibitório dos óleos essenciais extraídos da casca e da folha de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti) sobre o crescimento de bactérias e fungos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle

(limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti) utilizados foram extraídos no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As folhas e limões destinados à obtenção de óleos essenciais foram obtidos no pomar da UFLA. Os frutos foram descascados e as cascas e folhas foram picadas em quadrados pequenos.

Os óleos essenciais foram extraídos pelo método de hidrodestilação, empregando o aparelho de Clevenger modificado<sup>6</sup>. Utilizaram-se 500 gramas de folha e de casca, separadamente, para cada extração de cada variedade de limão. O material foi acondicionado em balões de 6 litros e mantido em ebulição, à temperatura constante, por 3 horas. Decorrido esse tempo, o hidrolato foi coletado e centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36 x g, por 5 minutos. A fase aquosa foi retirada do hidrolato, adicionando-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica e levando-se à centrifugação novamente para a obtenção do óleo puro. Os óleos essenciais foram armazenados protegidos da luz, a 4 °C.

### Micro-organismos utilizados

As análises microbiológicas empregando-se óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

Para avaliação *in vitro* do efeito antimicrobiano dos óleos obtidos da casca e folha de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti), foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Candida utilis* CCT 3469 e *Penicillium expansum* CCT 4680.

### Preparação do inóculo

Foram utilizadas culturas das bactérias mantidas em meio de congelamento (glicerol 125 mL, extrato de levedura 1,5 g, peptona bacteriológica 2,5 g, NaCl 2,5 g, 1 litro de água destilada) e da levedura em meio YW (extrato de levedura 3 g, extrato de malte 3 g, peptona bacteriológica 5 g, glicose 10 g, ágar 15 g e 1 litro de água destilada), acrescidas de glicerol, ambas estocadas a 4 °C e do bolor em meio batata dextrose ágar (BDA), estocado a 25 °C.

As cepas de bactérias e levedura foram reativadas inoculando-se uma alçada em tubos contendo caldo infusão cérebro coração (BHI); as culturas de *S. aureus*

e *E. coli* foram incubadas, por 24 horas, a 37 °C e *P. aeruginosa* e *C. utilis*, a 28 °C, pelo mesmo período. Alíquotas de 1,0 mL das culturas foram transferidas para microtubos e centrifugadas, a 735 x g por 15 minutos (centrífuga modelo 5415 C). Após separação, 10 µL das células foram coletados do pellet formado e inoculados em 200 mL de caldo BHI. O crescimento de cada cepa foi acompanhado pela determinação da densidade óptica, a 620 nm, a cada 2 horas, da cultura e do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), empregando-se a técnica de plaqueamento em microgota. As culturas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram plaqueadas em ágar para contagem padrão (PCA), *E. coli* em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e *C. utilis* em ágar YW. Com os resultados obtidos de absorbância e UFC/mL de cada micro-organismo, foram elaboradas curvas padrões.

#### Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre bactérias e leveduras

A atividade antimicrobiana dos óleos foi testada pelo método de difusão em ágar por cavidade em placa<sup>7,8</sup>. Adicionou-se uma suspensão padronizada ( $5,88 \times 10^8$  UFC/mL para *S. aureus*;  $8,66 \times 10^8$  UFC/mL para *E. coli*;  $3,31 \times 10^8$  UFC/mL para *P. aeruginosa*;  $8 \times 10^6$  UFC/mL para *C. utilis*) dos micro-organismos a 10 mL de ágar Müeller Hinton (bactérias) e ágar YEFG (em g/L: extrato de levedura 10; peptona bacteriológica 20; glicose 20; ágar 15) (levedura), à temperatura de 45 °C, obtendo-se a concentração final de  $10^8$  UFC/mL para bactérias e  $10^6$  UFC/mL para levedura, homogeneizando-se a mistura depositada imediatamente sobre uma camada (10 mL) do mesmo ágar já solidificado. Os slots foram feitos na superfície do ágar, com auxílio de pérolas de vidro, retiradas previamente. Alíquotas de 8 µL de cada diluição dos óleos essenciais foram depositadas nos slots. Foram utilizadas as concentrações de 10, 20, 40, 80 e 160 µL/mL de cada óleo, diluídas em etanol. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em BOD, a 37 °C (*S. aureus* e *E. coli*) e 28 °C (*P. aeruginosa* e *C. utilis*), por 48 horas. Foram medidos os diâmetros dos halos de inibição formados, com auxílio de um paquímetro, e o etanol foi utilizado como controle negativo. As análises foram realizadas em triplicata.

#### Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre *Penicillium expansum*

Foram avaliados os efeitos fungicidas dos óleos essenciais de *Citrus* nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2 e

4 µL/mL. Foram observados o crescimento e ou a inibição micelial da cultura fúngica, por meio de comparação com placa-padrão (sem óleo)<sup>9</sup>.

Foram adicionadas, em 10 mL de ágar BDA, as diferentes concentrações dos óleos essenciais, homogeneizando-se a mistura depositada imediatamente sobre uma camada (10 mL) do mesmo ágar já solidificado.

O inóculo, constituído por um disco de micélio com o fungo *P. expansum*, de 8 mm de diâmetro, foi transferido para o centro das placas. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas, em BOD, a 25 °C, por 7 dias.

As avaliações foram realizadas por meio de medições diametralmente opostas do crescimento micelial. As análises foram realizadas em triplicata.

#### Análise estatística

Para os micro-organismos, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. utilis*, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em um esquema fatorial ( $3 \times 2 \times 5$ ), sendo três óleos *C. limonia*, *C. aurantifolia* e *C. latifolia*, dois locais (casca e folha), cinco concentrações (10, 20, 40, 80 e 160 µL/mL) com três repetições e mais um tratamento adicional (testemunha), totalizando 108 observações.

Em se tratando do fungo *P. expansum*, a análise estatística foi conduzida considerando-se a natureza dos resíduos como aproximadamente normal, ou seja, violando-se a pressuposição de normalidade que garante a exatidão dos testes. Isso pode alterar as taxas de erro tipo I (probabilidade de rejeitar a hipótese nula, dado que ela é verdadeira e é representada por  $\alpha$ ) e as de erro tipo II (probabilidade de não rejeitar a hipótese nula, dado que ela é falsa e é representada por  $\beta$ ) de forma negativa. Portanto, as conclusões tiradas para essa variável devem ser tiradas com ressalvas.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em um esquema de análise fatorial ( $3 \times 2 \times 5$ ), sendo três óleos (limão-cravo, limão-galego e limão-tahiti), dois locais (casca e folha), cinco concentrações (0,25, 0,5, 1, 2 e 4 µL/mL) com três repetições e mais um tratamento adicional (testemunha), totalizando 93 observações.

Os programas estatísticos utilizados foram o SAS<sup>a</sup> v.8.2<sup>10</sup> e o Sisvar<sup>11</sup>. Quanto à análise de variância, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey e pelo teste F, a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Efeito inibitório dos óleos essenciais de citros sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

Os halos de inibição produzidos pelos óleos essenciais de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti), da casca e da folha, em placas contendo as bactérias *E. ATCC 8739*, *S. aureus ATCC 25923* e *P. aeruginosa ATCC 25853*, foram medidos, revelando efeito inibitório dos óleos.

Os óleos essenciais estudados foram mais eficazes em inibir o crescimento de *S. aureus* (Tabela 1). *E. coli* (Tabela 2) e *P. aeruginosa* (Tabela 3) se mostraram mais resistentes à atividade antimicrobiana dos óleos. Resultados encontrados por Fisher e Philips<sup>5</sup> também mostram a maior eficiência dos óleos essenciais de *Citrus* sobre as bactérias Gram-positivas do que sobre as bactérias Gram-negativas nos testes *in vitro*. Resultados similares são encontrados para os mais diversos óleos essenciais e micro-organismos<sup>12,13,14</sup>.

Vários trabalhos demonstraram que, embora os óleos essenciais sejam efetivos em inibir tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, a presença da membrana externa nas bactérias Gram-negativas as torna menos susceptíveis a algumas substâncias. Esse fato decorre do caráter hidrofóbico da membrana celular externa dessas bactérias, que atua como barreira à permeabilidade de várias substâncias ou devido ao tamanho de suas porinas, a qual varia entre os micro-organismos<sup>12,15</sup>.

Com base nos resultados obtidos neste experimento, a análise de variância se mostrou

significativa para as concentrações e para a interação entre o óleo e o local de extração (casca e folha) ( $p \leq 0,05$ ). Pelos dados descritos na Tabela 1, observa-se que, ao considerar os óleos obtidos da casca de limão-galego e do limão-tahiti, estes demonstraram maior inibição do crescimento bacteriano que o óleo de limão-cravo; porém, já os óleos obtidos da folha não apresentaram significativa variação em nenhum dos óleos, mas apresentaram sensibilidade aos óleos essenciais. Na Tabela 1, observa-se que, para o limão-cravo, o óleo obtido da folha promoveu maior halo de inibição que o da casca; para o óleo de limão-galego, tanto o da casca quanto o da folha não tiveram diferença estatística entre eles; já para o óleo de limão-tahiti, o óleo da casca promoveu maior inibição da bactéria que o óleo da folha ( $P < 0,05$ ).

Changetal.<sup>16</sup> verificaram a atividade antibacteriana do óleo da folha de *Cinnamomum osmophloeum* e seus constituintes sobre nove espécies de bactérias e observaram concentração inibitória mínima (MIC) para folha de 500  $\mu\text{L/mL}$  sobre *K. pneumoniae* e *Salmonella* sp., e 250  $\mu\text{g/mL}$  sobre as outras sete espécies de bactérias. Quando utilizou-se apenas o padrão de cinamaldeído, os MICs sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, MRSA, *K. pneumoniae*, *Salmonella* sp. e *V. parahemolyticus* foram de 500, 1.000, 250, 250, 250, 250, 1.000, 500 e 250  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Pelos dados da Tabela 2, observa-se que, quando comparados os óleos obtidos da casca, o óleo da casca do limão-galego apresentou maior halo de inibição que os óleos da casca do limão-tahiti e do limão-cravo. Já para a folha, todos os óleos testados não apresentaram variação significativa, porém, todos promoveram formação do halo, segundo a análise de variância que se mostrou

**Tabela 1.** Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de *Citrus* (casca e folha) sobre *Staphylococcus aureus*

Concentração ( $\mu\text{L/mL}$ )	Formação do halo de inibição (mm)					
	<i>C. aurantifolia</i> (limão-galego)		<i>C. limonia</i> (limão-cravo)		<i>C. latifolia</i> (limão-tahiti)	
	folha (médias*)	casca (médias*)	folha (médias*)	casca (médias*)	folha (médias*)	casca (médias*)
0	3,7 <sup>d</sup>	3,3 <sup>d</sup>	3,3 <sup>d</sup>	3,3 <sup>d</sup>	3,7 <sup>d</sup>	3,3 <sup>d</sup>
10	7,8 <sup>b</sup>	7,7 <sup>b</sup>	7,3 <sup>c</sup>	6,8 <sup>c</sup>	7 <sup>c</sup>	8,2 <sup>b</sup>
20	8,2 <sup>b</sup>	8,7 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	7,3 <sup>c</sup>	7,6 <sup>b</sup>	8,3 <sup>b</sup>
40	8 <sup>b</sup>	8,2 <sup>b</sup>	8,7 <sup>a</sup>	7,7 <sup>b</sup>	8,2 <sup>b</sup>	8,7 <sup>a</sup>
80	8,7 <sup>a</sup>	8,8 <sup>a</sup>	8,8 <sup>a</sup>	8,2 <sup>a</sup>	8,5 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>
160	9 <sup>a</sup>	9,3 <sup>a</sup>	9,7 <sup>a</sup>	7,8 <sup>b</sup>	8,7 <sup>a</sup>	9,7 <sup>a</sup>

Zona de inibição em mm, incluindo o diâmetro do slot. Diâmetro do slot, 3 mm.

\*médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 2.** Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de *Citrus* (casca e folha) sobre *Escherichia coli*

Concentração (µL/mL)	Formação do halo de inibição (mm)					
	<i>C. aurantifolia</i> folha (médias*)	<i>C. aurantifolia</i> casca (médias*)	<i>C. limonia</i> folha (médias*)	<i>C. limonia</i> casca (médias*)	<i>C. latifolia</i> folha (médias*)	<i>C. latifolia</i> casca (médias*)
0	3,3 <sup>c</sup>	3,7 <sup>c</sup>	3,7 <sup>c</sup>	3,3 <sup>c</sup>	3,3 <sup>c</sup>	3,3 <sup>c</sup>
10	6,2 <sup>b</sup>	6,8 <sup>a</sup>	6,3 <sup>b</sup>	5,7 <sup>b</sup>	6,2 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>
20	6,3 <sup>b</sup>	7,8 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup>	5,8 <sup>b</sup>	6,3 <sup>b</sup>	7 <sup>a</sup>
40	6,7 <sup>a</sup>	7,3 <sup>a</sup>	7,8 <sup>a</sup>	6,3 <sup>b</sup>	6,7 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>
80	7 <sup>a</sup>	7,8 <sup>a</sup>	7,3 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>
160	7,5 <sup>a</sup>	8,2 <sup>a</sup>	8,5 <sup>a</sup>	7,5 <sup>a</sup>	7,2 <sup>a</sup>	6,3 <sup>b</sup>

Zona de inibição, em mm, incluindo o diâmetro do slot. Diâmetro do slot, 3 mm.

\*médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

significativa para as interações entre o óleo e o local e o óleo e a concentração ( $p \leq 0,05$ ).

Duarte et al.<sup>17</sup> verificaram a atividade de óleos essenciais de folhas de 29 plantas medicinais normalmente usadas no Brasil sobre *E. coli* e observaram que o óleo de *Cymbopogon martinii* exibiu um amplo espectro de inibição e apresentou forte atividade (MIC entre 100 e 500 µg/mL) sobre 10 dos 13 tipos de *E. coli*, sendo três enterotoxigênicas, duas enteropatogênicas, três enteroinvasivas e duas produtoras de shiga toxina (STEC).

Pelos dados da Tabela 2, pode-se observar que os efeitos dos óleos essenciais obtidos das folhas para o limão-cravo e o tahiti foram maiores que os obtidos da casca. Para o limão-galego, a casca apresentou melhor resultado que a folha. Já em relação às concentrações, os óleos essenciais de limão-cravo, tahiti e galego não apresentaram significativa variação na indução de formação de halo nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 µL/mL. Para a concentração de 160 µL/mL, os óleos essenciais de limão-tahiti e galego apresentaram melhores resultados de inibição do crescimento de *E. coli* que o óleo do limão-cravo.

A constância nos resultados observados entre os micro-organismos testados provavelmente ocorre devido ao etanol utilizado na diluição dos óleos. Esse solvente pode alterar a entrada do óleo na célula bacteriana, facilitando sua difusão em maiores diluições, porém, pouco se conhece a respeito da ação do óleo sobre a estrutura bacteriana<sup>18</sup>.

Com base nos resultados obtidos neste experimento, a análise de variância se mostrou significativa para os óleos, locais e concentrações e não foi significativa para nenhuma das interações ( $P \leq 0,05$ ).

Nakamura et al.<sup>19</sup> estudaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*

L. e verificaram que o mesmo inibiu *S. aureus* a uma concentração de 0,75 µg/mL. A concentração inibitória mínima (MIC) para *Shigella flexineri*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli*, *Klebsiella* sp. e *Proteus mirabilis* estavam em concentrações que variam de 3 a 12 µg/mL. O ponto final não foi alcançado para *P. aeruginosa* ( $\geq 24$  mg/mL).

De acordo com os dados da Tabela 3, observa-se que o óleo essencial de limão-galego apresentou maior inibição sobre *P. aeruginosa* do que os demais óleos testados. Comparando-se a atuação inibitória dos óleos da folha e da casca, observa-se que os óleos essenciais obtidos da folha dos citros apresentaram maior inibição do crescimento de *P. aeruginosa*, quando comparados com os óleos obtidos da casca, o que pode ser explicado provavelmente pela maior variabilidade dos constituintes químicos presentes nas folhas em relação à casca<sup>24</sup>.

Vários fatores influenciam os resultados obtidos. Dentre eles, podem ser citados a época de colheita da planta, a localização geográfica e o método de extração do óleo essencial. Outro fator que pode influenciar drasticamente nos resultados é a metodologia empregada para avaliação. Normalmente, os resultados diferem nessa metodologia; sendo assim, difícil a comparação entre os resultados<sup>13,14</sup>. Uma outra metodologia empregada é a do disco difusão, e esse método é um dos mais adequados para se trabalhar com óleos extraídos com solvente orgânico.

#### Efeito inibitório dos óleos essenciais de citros sobre *Candida utilis*

Os óleos essenciais limão-cravo, limão-galego e limão-tahiti, casca e folha, apresentaram níveis significativos de inibição sobre o micro-organismo testado, confirmado pelos grandes diâmetros dos halos de inibição formados (Tabela 4).

**Tabela 3.** Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de *Citrus* (casca e folha) sobre *Pseudomonas aeruginosa*

Concentração (µl/ml)	Formação do halo de inibição (mm)					
	<i>C. aurantifolia</i> folha (médias*)	<i>C. aurantifolia</i> casca (médias*)	<i>C. limonia</i> folha (médias*)	<i>C. limonia</i> casca (médias*)	<i>C. latifolia</i> folha (médias*)	<i>C. latifolia</i> casca (médias*)
0	3,3 <sup>c</sup>	3,7 <sup>c</sup>	3,3 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>	3,7 <sup>c</sup>	3,7 <sup>c</sup>
10	5,3 <sup>b</sup>	5,3 <sup>b</sup>	4,7 <sup>b</sup>	3,7 <sup>c</sup>	5 <sup>b</sup>	4,3 <sup>b</sup>
20	5,7 <sup>b</sup>	5,7 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	4,3 <sup>b</sup>	6,2 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>
40	6 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	5,3 <sup>b</sup>	4,7 <sup>b</sup>	6 <sup>a</sup>	5,3 <sup>b</sup>
80	6,3 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	5,7 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	5,5 <sup>b</sup>	5,7 <sup>b</sup>
160	7 <sup>a</sup>	7,3 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	5,3 <sup>b</sup>	5,3 <sup>b</sup>	6,2 <sup>a</sup>

Zona de inibição, em mm, incluindo o diâmetro do slot. Diâmetro do slot, 3 mm.

\*médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**Tabela 4.** Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de *Citrus* (folha e casca) sobre *Candida utilis*

Concentração (µL/mL)	Formação do halo de inibição (mm)					
	<i>C. aurantifolia</i> folha (médias*)	<i>C. aurantifolia</i> casca (médias*)	<i>C. limonia</i> folha (médias*)	<i>C. limonia</i> casca (médias*)	<i>C. latifolia</i> folha (médias*)	<i>C. latifolia</i> casca (médias*)
0	3 <sup>d</sup>	3 <sup>d</sup>	3 <sup>d</sup>	3 <sup>d</sup>	3 <sup>d</sup>	3 <sup>d</sup>
10	13,3 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	9,7 <sup>c</sup>	7,7 <sup>c</sup>	8,7 <sup>c</sup>	7,7 <sup>c</sup>
20	15,7 <sup>a</sup>	12,7 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	9 <sup>c</sup>	11,7 <sup>b</sup>	9,7 <sup>b</sup>
40	16,3 <sup>a</sup>	14,7 <sup>b</sup>	12,3 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>
80	18 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	13 <sup>b</sup>	12,3 <sup>b</sup>	15,7 <sup>a</sup>	13,7 <sup>b</sup>
160	20 <sup>a</sup>	17,3 <sup>a</sup>	14,3 <sup>b</sup>	13,7 <sup>b</sup>	17,7 <sup>a</sup>	15,7 <sup>a</sup>

Zona de inibição, em mm, incluindo o diâmetro do slot. Diâmetro do slot, 3 mm

\*médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Com base nos resultados obtidos neste experimento, constata-se que houve interação significativa entre os óleos, locais (folha ou casca) e concentrações ( $p < 0,05$ ). O óleo de limão-galego, tanto da casca quanto da folha, apresentou os melhores resultados de inibição do crescimento entre os óleos em todas as concentrações testadas; porém, o óleo extraído das folhas apresentou melhor inibição do crescimento desta levedura.

Comparando-se a ação inibitória do óleo essencial de limão-cravo, observa-se que o óleo da folha promoveu melhor inibição do crescimento de *C. utilis* nas concentrações mais baixas (10, 20 e 40 µL/mL) que o óleo da casca do limão-cravo. Já para as concentrações mais altas (80 e 160 µL/mL), os óleos da casca e da folha do limão-cravo não diferiram estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

O óleo essencial da folha do limão-tahiti apresentou os melhores resultados de inibição do crescimento para todas as concentrações, quando comparado com o óleo extraído da casca. Isto poderia ser explicado provavelmente em virtude dos constituintes químicos majoritários presentes nesta

variedade de limão estão em maior concentração na folha do que na casca<sup>24</sup>.

Sacchetti et al.<sup>20</sup> verificaram que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* promoveu notável inibição no crescimento das leveduras *Candida albicans* ATCC 48274, *Rhodotorula glutinis* ATCC 16740, *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 60232, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2365 e *Yarrowia lipolytica* ATCC 16617.

Tserennadmid et al.<sup>25</sup> trabalharam com alguns óleos essenciais, incluindo o limão (*Citrus lemon*), em leveduras deteriorantes de alimentos e obtiveram um efeito inibitório substancial sobre todas as leveduras estudadas, mostrando um grande halo de inibição do crescimento das leveduras *S. pombe*, *G. candidum*, *P. anomala* e *S. cerevisiae*.

Souza et al.<sup>21</sup> trabalharam com o óleo de orégano (*Origanum vulgare* L.) e obtiveram um efeito inibitório substancial sobre todas as leveduras estudadas, mostrando um grande halo de inibição do crescimento das leveduras *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Pichia minuscula* e *Rhodotorula rubra*, com valores de MIC, para a maioria delas, de 20 e 0,6 µL/mL.

### Efeito inibitório dos óleos essenciais de citros sobre *Penicillium expansum*

Com base nos resultados obtidos neste experimento, constata-se que houve interação significativa entre óleos, locais (folha ou casca) e concentrações ( $p < 0,05$ ). Pelos dados descritos na Tabela 5, pode-se observar que o óleo da casca do limão-cravo promoveu o desenvolvimento micelial do fungo estudado, ou seja, estimulou o crescimento em relação ao controle. Resultados semelhantes foram observados por Pereira et al.<sup>22</sup>, que relataram que esse tipo de comportamento requer um estudo específico, por se tratar de vários fatores, tais como: tipo de substrato, reação do fungo ao substrato e diferentes tipos de compostos que podem interferir sobre o comportamento do fungo.

Comparando-se a atuação inibitória dos óleos obtidos da casca dos limões, observa-se que o óleo da casca do limão-galego apresentou maior inibição do crescimento micelial do fungo em todas as concentrações em relação aos demais óleos obtidos da casca. Apenas na concentração de 0,25  $\mu\text{L/mL}$ , o óleo da casca do limão-cravo obteve resultado estatístico igual ao limão-galego ( $P < 0,05$ ).

Pela Tabela 5, pode-se observar que, quando comparados os óleos obtidos da folha dos limões, na concentração de 0,25  $\mu\text{L/mL}$ , o óleo da folha de limão-galego apresenta maior inibição do crescimento micelial que os demais óleos. Na concentração de 0,5  $\mu\text{L/mL}$ , tanto o óleo da folha de limão-galego quanto o de limão-cravo apresentaram maior inibição do crescimento micelial que o óleo da folha do limão-tahiti. Nas concentrações de 1 e 2  $\mu\text{L/mL}$ , o óleo da folha do limão-cravo foi mais efetivo que os demais e, para a concentração de 4  $\mu\text{L/mL}$ , os óleos não diferiram estatisticamente entre si; porém, promoveram inibição total do crescimento micelial do fungo estudado.

O efeito inibitório dos óleos obtidos da folha foi maior que o efeito dos óleos obtidos da casca, em todas as concentrações testadas, para todos os óleos ( $P < 0,05$ ), isso pode ser explicado pela maior variabilidade dos constituintes químicos presentes nas folhas em relação à casca<sup>24</sup>.

Caccioni et al.<sup>2</sup> trabalharam com os componentes de óleos essenciais de frutos cítricos sobre *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum* e observaram que o citral é o componente mais ativo sobre *Penicillium digitatum*. Quando foi utilizado o óleo essencial de limão-siciliano, colhido em três épocas distintas, verificaram que o óleo do limão colhido em dezembro promoveu maior inibição dos fungos que os óleos dos limões colhidos em fevereiro e junho.

Sharma e Tripathi<sup>23</sup> verificaram que o óleo essencial da casca de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre *Aspergillus niger* promoveu a inibição total do crescimento micelial do fungo, na concentração de 3  $\mu\text{L/mL}$ , após 7 dias de incubação.

### CONCLUSÃO

A atividade bactericida dos óleos essenciais testados foi evidenciada sobre *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*; todavia, o óleo da casca do *C. latifolia* (*S. aureus*), da casca do *C. aurantifolia* (*E. coli*) e o da folha do *C. aurantifolia* (*P. aeruginosa*) produziram um maior diâmetro dos halos de inibição.

Os óleos essenciais testados apresentaram efeito inibitório significativo sobre *Candida utilis*, tendo o óleo essencial da folha do *C. aurantifolia* promovido melhor inibição da levedura em estudo.

O efeito fungicida dos óleos essenciais foi efetivo sobre o fungo *Penicillium expansum*; porém, os óleos

**Tabela 5.** Resultados médios do crescimento micelial do fungo *Penicillium expansum* pelos óleos essenciais de *Citrus*.

Concentração ( $\mu\text{L/mL}$ )	Crescimento micelial (mm)					
	<i>C. aurantifolia</i> folha (médias*)	<i>C. aurantifolia</i> casca (médias*)	<i>C. limonia</i> folha (médias*)	<i>C. limonia</i> casca (médias*)	<i>C. latifolia</i> folha (médias*)	<i>C. latifolia</i> casca (médias*)
0	48 <sup>d</sup>	48 <sup>d</sup>	48 <sup>d</sup>	48 <sup>d</sup>	48 <sup>d</sup>	48 <sup>d</sup>
0,25	30 <sup>c</sup>	38 <sup>c</sup>	33 <sup>c</sup>	38 <sup>c</sup>	32 <sup>c</sup>	43 <sup>d</sup>
0,5	27 <sup>b</sup>	35 <sup>c</sup>	27 <sup>b</sup>	47 <sup>d</sup>	32 <sup>c</sup>	42 <sup>d</sup>
1	22 <sup>b</sup>	28 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>	52 <sup>d</sup>	23 <sup>b</sup>	37 <sup>c</sup>
2	15 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	50 <sup>d</sup>	17 <sup>a</sup>	32 <sup>c</sup>
4	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	45 <sup>d</sup>	9 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>

Crescimento micelial, em mm, incluindo o diâmetro do inóculo. Diâmetro do inóculo, 8 mm

\*médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

essenciais das folhas dos *C. limonia* e *C. aurantifolia* apresentaram uma melhor inibição micelial do fungo. Entretanto, o óleo da casca do *C. limonia* estimulou o desenvolvimento micelial do fungo em estudo.

## REFERÊNCIAS

1. Pereira AA. Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos [dissertação de mestrado]. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras; 2006.
2. Caccioni DRL, Guizzardi M, Biondi DM, Renda A, Ruberto G. Relationship between volatile components of *citrus* essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int J Food Microbiol*. 1998;43:73-9.
3. Prashar A, Hili P, Veness RG, Evans CS. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochem*. 2003;63:569-75.
4. Grassi Filho H, Penteadó BB, Santos dos CH. Preparo de amostras e métodos para a determinação do teor de óleo essencial de frutos de limoeiro. *Rev Bras Frutic*. 2005;27:191-3.
5. Fisher K, Philips CA. The Effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J Appl Microbiol*. 2006;101:1232-40.
6. Craveiro AA, Fernandes AG, Andrade CHS, Matos FJ de A, Alencar JW, Machado MIL. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza, CE: Universidade Federal do Ceará; 1981.
7. Deans SG, Ritchie G. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int J Food Microbiol*. 1987;5:165-80.
8. Mendonça AT. Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa [tese de doutorado] Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras; 2004.
9. Stangarlin JR, Schwan-estrada KRF, Cruz mês, Nozaki MH. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnol Ciênc & Desenvol*. 1999;11:16-21.
10. SAS Institute. SAS for Windows, Release 8. Cary; 2000.
11. Ferreira DF. Análises estatísticas por meio do Sisvar para o Windows versão 4.0. Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria. São Carlos: Programas e resumos; 2000. p. 255-8.
12. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol*. 1998;26:118-22.
13. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*. 2000;8:308-16.
14. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int J Food Microbiol*. 2004;94:223-53.
15. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67:556-93.
16. Chang ST, Chen PF, Chang SC. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J Ethnopharmacol*. 2001;77:123-7.
17. 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.
18. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warminton JR. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Meleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol*. 2000;88:170-5.
19. Nakamura CV, Nakamura TU, Bando E, Melo AFN, Cortez DAG, Filho BP. Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94:675-8.
20. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem*. 2005;91:621-2.
21. Souza EL, Stamford TLM, Lima EO, Trajano VN. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*. 2007;18:409-13.
22. Pereira MC, Vilela GR, Costa LMAS, Silva RA, Soares AF, Fonseca EVN. Inhibition fungi growth through of utilization essential oils of spice. *Ciênc Agrotecnol*. 2006;30:731-8.
23. Sharman N, Tripathi A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol Res*. 2006;1-8.
24. Lota M, Serra DR, Tomi F, Jacquemond C, Casanova J. Volatile Components of Peel and Leaf Oils of Lemon and Lime Species. *J Agric Food Chem*. 2002;50:796-805.
25. Tserennadmid R, et al. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int J Food Microbiol*. 2011;144:480-6.