

Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica

SOUZA, A.A.¹; DIAS, N.A.A.²; PICCOLI, R.H.²; BERTOLUCCI, S.K.V.^{1*}

¹Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, Departamento de Agricultura, Caixa Postal 3037, Campus Universitário, Lavras - MG, CEP 37200-000; ²Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos, Caixa Postal 3037, Campus Universitário, Lavras - MG, CEP 37200-000. *Autor para correspondência: suzan@dag.ufla.br

RESUMO: Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito bactericida *in vitro* de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). Dentre os óleos essenciais estudados, três foram extraídos *in situ* por arraste a vapor e treze foram adquiridos comercialmente. Todos os óleos foram analisados por CG-EM e CG-DIC. A atividade bactericida foi avaliada pelo método de microdiluição utilizando-se caldo triptona de soja e microplacas de poliestireno de 96 poços, com posterior plaqueamento das culturas em ágar triptona de soja. Os óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* e de *Thymus vulgaris* apresentaram concentração mínima bactericida (CMB) de 0,12% e 0,25%, respectivamente. Já os óleos comerciais de *Syzygium aromaticum* e *Origanum vulgare* apresentaram ambos CMB de 0,50% e os óleos extraídos *in situ* de *Cymbopogon citratus* e *Origanum vulgare* apresentaram ambos CMB de 1,00%. Os dezesseis óleos essenciais apresentaram composição química qualitativa e quantitativa distintas. As análises químicas dos óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* e de *Thymus vulgaris* tiveram a presença majoritária de *E*-cinamaldeído (84,52%) e timol (50,89%). Conclui-se que os óleos de *C. cassia* e *T. vulgaris* foram os mais eficazes na inibição do crescimento *in vitro* dessa bactéria, a qual possui diferentes níveis de sensibilidade dependendo da composição química do óleo.

Palavras-chave: Patógeno alimentar, ETEC, antimicrobianos naturais, atividade bactericida, cromatografia gasosa.

ABSTRACT: Determination of minimum bactericidal concentration of sixteen essential oils on enterotoxigenic *Escherichia coli*. This study aimed to evaluate the bactericidal effect *in vitro* of sixteen essential oils on enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Among the essential oils, three were extracted *in situ* by steam distillation and thirteen were purchased commercially. All oils were analyzed by GC-MS and GC-FID. The bactericidal activity was evaluated by the microdilution method using tryptone soy broth, and 96-well polystyrene microplates with subsequent plating of the cultures in tryptone soy agar. *Cinnamomum cassia* and *Thymus vulgaris* essential oils showed minimal bactericidal concentration (MBC) 0.12% and 0.25%, respectively. Both commercial oils of *Syzygium aromaticum* and *Origanum vulgare* showed MBC of 0.50% and the oils extracted *in situ* *Origanum vulgare* and *Cymbopogon citratus* showed both MBC of 1.00%. The sixteen essential oils pointed out distinct qualitative and quantitative chemical composition. Chemical analysis of *Cinnamomum cassia* and *Thymus vulgaris* oils had the predominant presence of *E*-cinnamaldehyde (84.52% ± 0.07%) and thymol (50.89% ± 0.31%). In conclusion, *T. vulgaris* and *C. cassia* oils were the most effective in inhibiting *in vitro* growth of this bacterium, which has different sensitivity levels depending on the chemical composition of the oil.

Keywords: Food pathogen, ETEC, natural antimicrobial, bactericidal activity, gas chromatography.

INTRODUÇÃO

A presença de microrganismos nos alimentos pode, além de reduzir a vida de prateleira, causar toxinfecções nos consumidores (Melo et al., 2005). Bactérias do grupo dos coliformes fecais são utilizadas como indicadores de condições higiênico-sanitárias de água e alimentos. A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa que faz parte dos coliformes termotolerantes e ocorre em fezes de animais de sangue quente, assim como o homem (Silva et al., 2014). A presença de microrganismos indicadores como *Escherichia coli* em produtos processados indica, provavelmente, contaminação posterior ao processamento e pode sugerir uso de práticas inadequadas de manipulação e higiene (Lima et al., 2007).

Apesar de *E. coli* serem largamente consideradas como comensais, alguns isolados têm o potencial de provocar infecções. *E. coli* patogênicas podem ser divididas em três subgrupos principais dependendo de sua patogenicidade: comensais ou não patogênicas, *E. coli* patogênicas intestinais e *E. coli* patogênicas extraintestinais. As *E. coli* patogênicas intestinais incluem diferentes patótipos, dos quais se inclui a *E. coli* enterotoxigênica (Moriel et al., 2010). A ETEC causa a gastroenterite conhecida como diarreia dos viajantes, que tem como quadro clínico diarreia líquida, dor abdominal, febre baixa, náusea e mal-estar. A ETEC, normalmente não é responsável por toxinfecções alimentares em países com bom padrão sanitário e boas práticas de preparação dos alimentos. Porém, em países com precárias condições higiênico-sanitárias a contaminação da água com esgoto pode levar à contaminação destes (CVE, 2002).

O interesse em antimicrobianos naturais tem se expandido nos últimos anos em resposta a demanda dos consumidores por aditivos naturais. Durante as duas últimas décadas, conservantes naturais têm sido investigados para aplicações práticas (Tiwari et al., 2009). Dentre diversos outros produtos naturais, extratos vegetais e óleos essenciais vêm sendo largamente estudados para uso como conservantes naturais de alimentos e, têm demonstrado promissoras propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antiparasitárias (Okpekon et al., 2004; Sokmen et al., 2004; Sacchetti et al., 2005; Ferreira et al., 2006; Boulanouar et al., 2013).

Em particular, os óleos essenciais podem afetar tanto o invólucro externo quanto o citoplasma das células bacterianas, sendo a membrana celular o primeiro alvo. Isto ocorre devido à hidrofobicidade destes e de seus componentes, que permitem que eles se difundam através da bicamada fosfolipídica (Nazzaro et al., 2013). O mecanismo de ação dos óleos essenciais sobre as bactérias está relacionado

à perturbação da membrana citoplasmática, danos nas proteínas da membrana, coagulação do citoplasma, alteração no fluxo de elétrons, interrupção da força próton motriz, alteração do transporte ativo e redução do *pool* de ATP intracelular (Burt, 2004; Nazzaro et al., 2013).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito bactericida *in vitro* de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), bem como relacionar a composição química desses óleos com esta atividade.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos óleos essenciais

A atividade bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre ETEC foi avaliada. Destes, treze foram adquiridos da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda. e os demais extraídos *in situ* no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os óleos essenciais comerciais empregados no estudo estão listados na Tabela 1.

Os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (capim-limão), *Ocimum basilicum* L. (manjerição) e *Origanum vulgare* L. (orégano) foram obtidos das folhas frescas. As três espécies vegetais foram cultivadas em solo com adubação orgânica (esterco bovino) em canteiros localizados no Horto de Plantas Medicinais do DAG/UFLA, Lavras (21°14' 43S 44 °59' 59W, média anual de precipitação de 1530 mm, temperatura média de 20,4°C e 919 m altitude), Minas Gerais, Brasil. As exsiccatas de *C. citratus*, *O. basilicum* e *O. vulgare* estão depositadas no herbário ESAL sob os registros 18409, 18406 e 22156, respectivamente. Folhas das três espécies foram coletadas entre os meses de fevereiro a abril de 2014 às 9:00 h da manhã. As folhas de *C. citratus* foram cortadas em fragmentos de 1,0±0,2 cm² e as de *O. basilicum* e *O. vulgare* foram utilizadas inteiras. Os óleos essenciais das três espécies foram extraídos por destilação por arraste a vapor, em destilador Marconi® MA480, por 120 minutos. O óleo essencial foi purificado por decantação, e armazenado em refrigerador a 4°C, até a realização dos ensaios biológicos e análises químicas por CG-EM e CG-DIC.

Análises químicas dos óleos essenciais

As análises químicas dos óleos essenciais foram realizadas por Cromatografia de Fase Gasosa empregando-se um Cromatógrafo Agilent® 7890A, operado com sistema de processamento de dados HP GC ChemStation Ver. A.01.14, equipado com injetor/amostrador automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG,

TABELA 1. Óleos essenciais comerciais utilizados no estudo.

Nome científico	Nome comum	Parte usada *
<i>Cinnamomum cassia</i> Nees ex Blume	Canela	Folhas, casca
<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle	Limão tahiti	Pericarpo
<i>Citrus nobilis</i> Lour.	Mandarina	Pericarpo
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Funcho doce	Sementes
<i>Illicium verum</i> Hook.	Anis estrelado	Frutos e sementes
<i>Mentha piperita</i> L.	Menta	Folhas
<i>Myristica fragans</i> Houtt.	Noz moscada	Frutos
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Manjericão	Folhas
<i>Origanum vulgare</i> L.	Orégano	Folhas
<i>Piper nigrum</i> L.	Pimenta preta	Frutos
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Alecrim	Folhas
<i>Syzygium aromaticum</i> Thumb.	Cravo da Índia	Botões florais
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomilho branco	Folhas

*Com exceção dos frutos cítricos que foram extraídos por prensagem a frio, os demais, segundo a empresa Ferquima®, foram extraídos por destilação por arraste a vapor.

Switzerland) e um Detector de Ionização em Chama (DIC). As amostras foram preparadas diluindo-se o óleo essencial em acetato de etila (1%, v/v). O volume de injeção foi de 1,0 µL, no modo *split* a uma razão de injeção de 50:1. Empregou-se coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 250 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240°C. Empregou-se uma rampa de temperatura de 3°C/min de 60°C a 200°C, seguido de uma rampa de 10°C/min até 270°C, mantendo-se em condição isotérmica por 1 minuto. As concentrações dos constituintes foram expressas pela média da porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos ± o desvio padrão de 3 amostras analisadas. Devido à complexidade química e o grande número de amostras (dezesseis óleos essenciais), os resultados analíticos foram apresentados apenas para os cinco constituintes de maior área relativa.

As análises qualitativas foram realizadas em Cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC. Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (Nist,

2008) e de literatura (Adams, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Van den Dool & Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (Adams, 2007).

Microrganismo, manutenção, padronização e obtenção do inóculo

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. O microrganismo utilizado foi *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) cedida pelo Laboratório de Enterobactérias (LABENT) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ). A cultura estoque, armazenada em meio de congelamento (glicerol – 15 mL; peptona bacteriológica – 0,5 g; extrato de levedura – 0,3 g; NaCl – 0,5 g; água destilada – 100 mL; pH entre 7,2 e 7,4), foi ativada pela transferência de alíquotas da cultura para caldo triptona de soja (Tryptone Soya Broth – TSB, Himedia®) e incubada a 37°C por 24 horas. Após ativação, transferiu-se 40 µL da cultura para 200 mL de TSB, e incubou-se a 37°C, sendo o crescimento acompanhado por leituras periódicas de absorbância, a 600nm e quantificação de células viáveis em ágar triptona de soja (Tryptone Soya Agar – TSA, Himedia®) com incubação a 37°C por 24 horas. A cultura foi padronizada em 10⁸UFC.mL⁻¹ na absorbância de 0,5 a 1,0 nm.

Determinação da Concentração Mínima Bactericida

A determinação da concentração mínima bactericida (CMB) foi realizada empregando-se o método de microdiluição em caldo utilizando-se microplacas de poliestireno com 96 poços (CLSI,

2003). Soluções com diferentes concentrações dos óleos essenciais foram preparadas em TSB adicionado de 0,5% de Tween 80 nas concentrações: 2,00%; 1,00%; 0,50%; 0,25%; 0,12%; 0,06%; e 0,03%. Após as alíquotas de 150 µL das diferentes soluções serem transferidas para as cavidades das microplacas, 10 µL de cultura padronizada foram inoculadas em cada cavidade. As microplacas foram vedadas e incubadas a 37°C por 24 horas com posterior plaqueamento por microgota em TSA e incubação a 37°C por 24 horas.

O experimento foi conduzido em triplicata com três repetições para cada réplica, utilizando-se controle positivo (TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 e cultura) para cada repetição.

A pureza da cultura foi avaliada periodicamente por coloração de Gram e plaqueamento em ágar eosina azul de metileno (EMB) com incubação a 37°C por 24 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que os dezesseis óleos essenciais selecionados apresentaram diferentes magnitudes de atividade biocida sobre ETEC (Tabela 2). O óleo essencial com maior atividade biocida sobre ETEC foi o de *C. cassia*, com CMB de 0,12%, seguido pelo óleo essencial de *T. vulgaris* com CMB de 0,25%.

Com uma atividade bactericida moderada, os óleos essenciais de *S. aromaticum* e *O. vulgare* comerciais apresentaram CMB de 0,50% e os

TABELA 2. Concentração mínima bactericida (CMB) de óleos essenciais sobre a bactéria *Escherichia coli* enterotoxigênica *in vitro*.

Óleos essenciais	CMB (%) (v/v)
Cinnamomum cassia	0,12
Citrus aurantifolia	> 2,00
<i>Citrus nobilis</i>	> 2,00
Cymbopogon citratus	1,00
Foeniculum vulgare	> 2,00
<i>Illicium verum</i>	> 2,00
Mentha piperita	2,00
Myristica fragans	> 2,00
Ocimum basilicum	> 2,00
<i>Ocimum basilicum</i> (UFLA)	> 2,00
Origanum vulgare	0,50
<i>Origanum vulgare</i> (UFLA)	1,00
Piper nigrum	> 2,00
Rosmarinus officinalis	> 2,00
<i>Syzygium aromaticum</i>	0,50
Thymus vulgaris	0,25

de *O. vulgare* e *C. citratus* extraídos na UFLA, apresentaram CMB de 1,0%. Dentre os dezesseis óleos estudados, dez apresentaram CMB igual ou superior a 2% (v/v) sobre ETEC, sendo eles *M. piperita*, *C. aurantifolia*, *C. nobilis*, *F. vulgare*, *I. verum*, *M. fragans*, *O. basilicum* (comercial e UFLA), *P. nigrum* e *R. officinalis* (Tabela 2).

A atividade antimicrobiana exercida pelos óleos essenciais tem sido descrita para uma ampla variedade de microrganismos, tanto Gram-positivos quanto Gram-negativos, os quais respondem de forma distinta e dependente da composição química dos óleos (Boulanouar et al., 2013; Burt, 2004; Solórzano-Santos & Miranda-Navales, 2011). Deste modo, as diferenças observadas na atividade bactericida desses óleos sobre ETEC podem estar relacionadas as expressivas variações na composição química dos óleos (Tabela 3). As diferenças químicas foram observadas, principalmente, na classe dos monoterpenos hidrocarbonetos, cujos teores variaram de 1,3% a 95,52%; na classe dos monoterpenos oxigenados, desde não detectados até 84,07% e na classe de compostos fenólicos, desde não detectados até 94,75%. Com isso, não foi possível relacionar a suscetibilidade de ETEC frente aos dezesseis óleos com base na classe química constitucional do óleo, já que houve óleos ricos em compostos fenólicos, como *I. verum* (93,64%) e *O. basilicum* comercial (86,74%), que apresentaram CMB maior que 2% e o óleo de *C. cassia*, rico no aldeído fenólico *E*-cinamaldeído, que apresentou CMB de 0,12%.

O óleo de *C. cassia* foi constituído na sua totalidade de 94,75% de compostos fenólicos característicos da classe dos fenilpropanóides. A análise por CG-EM identificou três fenilpropanóides principais, dos quais 84,52% de *E*-cinamaldeído, 8,79% de (*E*)-*o*-metoxicinamaldeído e 1,44% de acetato de *E*-cinamila.

Já o óleo de *T. vulgaris*, que apresentou o segundo melhor resultado contra ETEC, foi composto de 30,88% de compostos da classe dos monoterpenos hidrocarbonetos, 4,46% de monoterpenos oxigenados e 53,82% de compostos fenólicos. No entanto, dentro do percentual dos compostos fenólicos, 50,89% correspondeu ao teor de timol, um composto fenólico de origem biossintética da rota dos terpenos. Salienta-se ainda que, a classe dos monoterpenos hidrocarbonetos no óleo de *T. vulgaris*, foi constituída por 24,87% de *p*-cimeno e 5,91% de γ -terpineno.

Destacam-se ainda a composição química do óleo essencial de *O. vulgare* comercial e *S. aromaticum* que apresentaram CMB sobre ETEC de 0,50%. No primeiro, a classe de monoterpenos hidrocarbonetos foi constituída na sua totalidade de 3,92% de *p*-cimeno e 3,93% de γ -terpineno;

TABELA 3. Composição química principal dos óleos essenciais avaliados nos ensaios de efeito bactericida *in vitro* contra ETEC.

Constituintes	IR ^a	Óleos essenciais (área %)															
		C. cassia	C. aurantifolia	C. nobilis	C. citratus ^b	F. vulgare	I. verum	M. piperita	M. fragans	O. basilicum	O. basilicum ^b	O. vulgare	O. vulgare ^b	P. nigrum	R. officinalis	S. aromaticum	T. vulgaris
α-Pineno	933	-	2,42	2,07	-	4,07	-	-	18,47	-	-	-	-	12,09	14,71	-	-
Canfeno	944	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,41	-	-
Sabineno	973	-	1,78	-	-	-	-	-	16,54	-	-	-	-	11,22	-	-	-
β-Pineno	977	-	12,05	-	-	-	-	-	12,94	-	-	-	-	11,44	7,00	-	-
β-Mirceno	990	-	-	1,73	14,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Felandreno	1105	-	-	-	-	2,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
δ-3-Careno	1011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,77	-	-	-
p-Cimeno	1023	-	-	1,91	-	-	-	-	-	-	-	3,92	8,09	-	-	-	24,97
Silvestreno	1027	-	-	-	-	-	-	-	5,88	-	-	-	-	-	-	-	-
Limoneno	1028	-	58,30	74,46	-	4,66	-	-	-	-	-	-	-	13,88	-	-	-
1,8-Cineol	1030	-	-	-	-	-	-	8,36	-	3,60	21,12	-	-	-	48,47	-	-
(E)-β-Cimeno	1046	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ-Terpineno	1058	-	14,00	15,35	-	-	-	-	-	-	-	3,93	13,40	-	-	-	5,91
Fenchona	1087	-	-	-	-	5,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol	1097	-	-	-	-	-	1,30	-	-	0,89	31,51	-	-	-	-	-	4,46
Hidrato de cis-Sabineno	1100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,12	-	-	-	-
Canfora	1143	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,28	-	-	-	14,03	-	-
Mentona	1145	-	-	-	-	-	-	26,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Borneol	1156	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,30	-	-
Iso-Mentona	1165	-	-	-	-	-	-	9,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpinen-4-ol	1176	-	-	-	-	-	-	34,88	5,44	-	-	-	10,86	-	-	-	-
Isocitral	1182	-	-	-	2,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil-chavicol	1199	-	-	-	-	-	3,48	-	-	86,74	-	-	-	-	-	-	-
Neral	1241	-	-	-	31,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Anisaldeído	1253	-	-	-	-	-	1,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geraniol	1254	-	-	-	2,51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-Cinamaldeído	1264	84,52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geranial	1269	-	-	-	43,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-Anetol	1285	-	-	-	-	77,89	87,69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Timol	1291	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,97	10,56	-	-	-	50,89
Acetato de mentila	1295	-	-	-	-	-	-	5,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvacrol	1300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	73,11	-	-	-	-	2,93
Eugenol	1362	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,90	-	-	-	-	80,67	-
E-Cariofileno	1417	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,32	-	25,49	-	5,51	-
α-Bergamoteno	1436	-	-	-	-	-	-	-	-	2,47	2,47	-	-	-	-	-	-
Acetato de E-cinamila	1444	1,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Humuleno	1451	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,68	-
β-Bisaboleno	1506	-	1,71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Miristicina	1519	-	-	-	-	-	-	-	15,10	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de eugenol	1522	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,92	-
(E)-o-Metoxi-cinamaldeído	1529	8,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Óxido de cariofileno	1582	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,66	-
Foeniculina	1679	-	-	-	-	-	1,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrocarbonetos monoterpenos		-	89,90	95,52	94,57	16,06	1,30	-	53,83	-	-	7,85	34,61	55,40	25,12	-	30,88
Monoterpenos oxigenados		-	-	-	-	-	-	84,07	5,44	4,49	64,91	-	10,86	-	63,80	-	4,46
Hidrocarbonetos sesquiterpenos		-	1,71	-	-	-	-	-	-	2,47	2,47	4,32	-	25,49	-	6,19	-
Sesquiterpenos oxigenados		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,66	-
Compostos fenólicos		94,75	-	-	-	77,89	93,64	-	15,10	86,74	3,90	76,08	10,56	-	-	92,59	53,82
Total		94,75	90,26	95,52	94,57	93,95	94,94	84,07	74,37	93,70	71,28	88,25	56,03	80,89	88,92	99,44	89,16

^a Índice de retenção relativo a série *n*-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. - = não detectado. ^b Óleos essenciais extraídos por arraste a vapor na UFLA.

4,32% de *E*-cariofileno (sesquiterpeno oxigenado); e, 76,08% de compostos fenólicos. Por sua vez, o óleo de *S. aromaticum* foi constituído de 6,19% de hidrocarbonetos sesquiterpênicos; 0,66% do sesquiterpeno oxigenado óxido de cariofileno; e, 92,59% de compostos fenólicos, sendo que destes, 80,67% correspondeu ao teor do fenilpropeno eugenol.

Os resultados do presente estudo corroboram com os resultados de Holley & Patel (2005), que observaram que os óleos essenciais e seus constituintes fenólicos, como cinamaldeído, timol, carvacrol e eugenol foram eficazes contra muitos agentes patogênicos de origem alimentar, incluindo a *E. coli* O157:H7. Na literatura foram encontrados dois manuscritos que avaliaram a atividade antimicrobiana sobre ETEC. O primeiro foi publicado por Peñalver et al. (2005) que observaram maior capacidade inibitória do crescimento sobre bactérias da família *Enterobacteriaceae* em óleos ricos em compostos fenólicos, como carvacrol e timol. Nesse trabalho, os óleos essenciais de *Origanum vulgare* e diferentes espécies do gênero *Thymus* (*T. mastichina* e *T. zygis*) apresentaram concentração mínima inibitória de 4% (v/v). O segundo, foi realizado por Duarte et al. (2007) que avaliaram 29 óleos essenciais contra diferentes sorotipos de *E. coli*. Para os óleos de *M. piperita*, *O. basiculum*, *O. vulgare* e *Thymus vulgaris*, Duarte e colaboradores observaram concentração mínima inibitória acima de 1000 µg/mL, não apresentando os dados de composição química, já que não foram os óleos mais eficazes.

Conforme Gutierrez et al. (2008), a ação antimicrobiana apresentada pelos óleos essenciais não depende unicamente da composição química, mas também das propriedades lipofílicas, da solubilidade em água, da potência dos grupos funcionais e da mistura de compostos com diferentes propriedades bioquímicas. No que se refere a potência do grupo funcional, o cinamaldeído é um aldeído aromático, já bem conhecido como agente antimicrobiano natural de patógenos contaminantes de alimentos. Seu mecanismo de ação tem sido associado à formação de base de Schiff com proteínas de membrana pela reação com seu grupo carbonílico livre, o que provoca danos na membrana celular (González-Aguilar et al., 2011, Wei et al., 2011).

Há evidências também que alguns constituintes presentes em pequenas quantidades nos óleos essenciais, como γ -terpineno e *p*-cimeno, interferem na atividade antimicrobiana dos óleos facilitando a permeabilidade do carvacrol e timol na célula bacteriana (Silva et al., 2010; Romero et al., 2009), o que nesse caso poderia explicar a atividade bactericida dos óleos de *T. vulgaris* e *O.*

vulgare comercial sobre ETEC. Já o modo de ação de compostos fenólicos em bactérias patogênicas ainda não está bem estabelecido. Acredita-se que fenóis hidrofóbicos, como timol e carvacrol também possam agir por alterações na permeabilidade da membrana celular. No entanto, investigações mais aprofundadas são necessárias para esclarecer os mecanismos de ação desses compostos (González-Aguilar et al., 2011).

As atividades antimicrobianas dos óleos de *C. cassia* e *T. vulgaris*, avaliadas por diferentes metodologias, já são bem relatadas na literatura para uma série de microorganismos patogênicos (Ooi et al., 2006; Oussalah et al., 2007; Abdollahzadeh et al., 2014; Dussault et al., 2014; Pekmezovic et al., 2015). Assim, como estudos com outras cepas patogênicas de *E. coli*, como o estudo de Oliveira et al. (2012), que observaram atividade inibitória de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) ao avaliarem os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão da Índia Oriental) e *Cinnamomum cassia* (canela cássia) pelo mesmo método utilizado neste trabalho. A CBM determinada para estes óleos foram de 0,06% para óleo de *C. cassia* e 0,25% para os óleos de *M. alternifolia* e *C. flexuosus*. Santos et al. (2012) pesquisando a ação antibacteriana do óleo essencial de folhas de *Piper malacophyllum* (pariparoba) sobre *E. coli* ATCC 25922 pelo método de microdiluição em caldo, encontraram uma CMB de 3700 µg/mL.

Embora a atividade antibacteriana dos óleos essenciais utilizados neste trabalho seja bem conhecida, estes ainda não haviam sido avaliados contra a cepa ETEC. Os resultados mostraram diferentes níveis de sensibilidade desta cepa de *Escherichia coli* frente aos dezesseis óleos essenciais. Estudos futuros podem ser realizados objetivando investigar os mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-ETEC, visto que diferentes classes de compostos químicos estavam envolvidas na eficácia da atividade biocida desta bactéria e diversos são os fatores que podem interferir no crescimento e desenvolvimento bacteriano.

CONCLUSÃO

Escherichia coli enterotoxigênica apresenta diferentes níveis de sensibilidade frente à faixa de concentração de 0,03% a 2,00% dos dezesseis óleos essenciais estudados. A atividade anti-ETEC é dependente da composição química do óleo essencial. Os óleos de *C. cassia* e *T. vulgaris*, ricos em *E*-cinamaldeído e timol, respectivamente, foram os mais eficazes na inibição do crescimento *in vitro* de ETEC, o que indica potencialidades na conservação microbiológica de alimentos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry**. 4.ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007. 803p.
- ABDOLLAHZADEH, E.; et al., Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v.35, p.177-83, 2014.
- BOULANOUAR, B.; et. al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.46, p.85-96, 2013.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p.223 -253, 2004.
- CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico**: norma aprovada. 6.ed. São Paulo, v.23, M7-A6, 2003.
- CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos: Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC)**, São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2002. Disponível em: http://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/ecoli_entero_toxi.pdf. Acesso em: 16 set. 2014.
- DUARTE, M.C.T. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.197-201, 2007.
- DUSSAULT, D.; et al., *In vitro* evaluation of antimicrobial activities of various comercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. **Meat Science**, v. 96, p.514-20, 2014.
- FERREIRA, A.; et al. The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n.1, p.31-37, 2006.
- GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A.; et al. Natural antimicrobial compounds to preserve quality and assure safety of fresh horticultural produce. In: RAI, M.; CHIKINDAS, M. (eds). **Natural antimicrobials in food safety and quality**. Cambridge: Cabi International, 2011. p. 277-282.
- GUTIERREZ, J.; et al., The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v.124, p.91-97, 2008.
- HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v.22, p.273-292, 2005.
- LIMA, C.P.S.; et al. Presença de microrganismos indicadores de qualidade em farinha e goma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista APS**, v.10, n.1, p.14-19, 2007.
- MELO, N.R.; et al., Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v.52, n.303, p.921-938, 2005.
- NAZZARO, F.; et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v.6, n.12, p.1451-1474, 2013.
- NIST. NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library**, software. Gaithersburg: NIST, 2008.
- OLIVEIRA, M.M.M.; et al. Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. **Food and Bioproducts Processing**, v.9, p. 809-818, 2012.
- OKPEKON, T.; et al. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n.1, p.91-97, 2004.
- OOI, L.S.M.; et al. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.34, n.3, p.511-22, 2006.
- OUSSALAH, M.; et al. 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**, v.18, p.414-20, 2007.
- PEKMEZOVIC, M.; et al. Development of kinetic model for testing antifungal effect of *Thymus vulgaris* L. and *Cinnamomum cassia* L. essential oils on *Aspergillus flavus* spores and application for optimization of synergistic effect. **Biochemical Engineering Journal**, v.99, p.131-37, 2015.
- PEÑALVER, P. et al. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* Family. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.113, p.1-6, 2005.
- MORIEL, D.G.; et al. Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, n. 20, p. 9072-77, 2010.
- ROMERO, A.L.; et al. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.11, n.4, p.15-18, 2009.
- SACCHETTI, G.; et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v.91, n.4, p.621-632, 2005.
- SANTOS, T.G.; et al. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Química Nova**, v.35, n.3, p.477-81, 2012.
- SILVA, J.P.L.; et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.136-141, 2010.
- SILVA, M.L.Q.; et al. Avaliação higiênico-sanitária dos

- restaurantes self-services e restaurantes populares da cidade de Juazeiro do Norte (CE) quanto a prevalência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus sp.* **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v.2, n. especial, 2014.
- SOKMEN, S.; et al. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, v. 15, n. 8, p. 627-634, 2004.
- SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, p.1-6, 2011.
- TIWARI, B.K.; et al. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p.5987-6000, 2009.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p.463-71, 1963.
- WEI, Y.; et al. Mechanism of *Vibrio cholerae* autoinducer-1 biosynthesis. **ACS Chem Biol**, v.6, p.356-65, 2011.