



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos:  
Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section VI International Technical Symposium  
Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 - FAURGS- Gramado / RS

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA

T. Heberle<sup>1</sup>, D.H. Kringel<sup>2</sup>, J.A. Evangelho<sup>3</sup>, G. Dannenberg<sup>4</sup>, R.P.Oliveira<sup>5</sup>, A.R.G. Dias<sup>6</sup>

1-Thauana Heberle - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Campus Universitário, s/n, 96010-900, Capão do Leão-RS, Brasil, Telefone: (53) 8145 0564- e-mail: (thauana.heberle@hotmail.com)

2-Dianini Huttner Kringel - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Campus Universitário, s/n, 96010-900, Capão do Leão-RS, Brasil, Telefone: (53) 8445 5758-e-mail: (dianinikringel@hotmail.com)

3-Jarine Amaral do Evangelho - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Campus Universitário, s/n, 96010-900, Capão do Leão-RS, Brasil, Telefone: (53) 8438 7563-e-mail: (jarineamaral@hotmail.com)

4-Guilherme Dannenberg - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Campus Universitário, s/n, 96010-900, Capão do Leão-RS, Brasil-e-mail: (gui.dannenberg@gmail.com)

5-Álvaro Guerra Dias - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Campus Universitário, s/n, 96010-900, Capão do Leão-RS, Brasil, Telefone: (53) 8405 3817-e-mail: (alvaro.guerradias@gmail.com)

6-Roberto Pedroso de Oliveira - Embrapa Clima Temperado, BR 392 km, 78 Caixa Postal 403 - Pelotas, RS Fone: (53) 3275 8199 Fax: (53) 3275 8219 - 3275 8221-e-mail: (roberto.pedroso@embrapa.br)

**RESUMO** – Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis de baixo peso molecular e insolúveis em água, e têm se destacado devido ao seu efeito antioxidante e antimicrobiano, relacionado diretamente à sua composição química. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de óleo essencial de laranja da variedade Valência. O óleo essencial foi extraído a partir das cascas da laranja e sua atividade antimicrobiana foi avaliada através das análises de teste de difusão em disco, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). O óleo essencial de laranja apresentou efeito antimicrobiano frente a bactérias gram positivas, sendo obtidos os menores valores de CIM e CBM para *L. monocytogenes* e *S. aureus*, comprovando a potencial aplicação deste óleo essencial como inibidor do crescimento microbiano, podendo ser utilizado como um bioconservante na indústria de alimentos.

**ABSTRACT** - Essential oils are complex mixtures of volatile compounds of low molecular weight and insoluble in water, and have been highlighted due to its antioxidant and antimicrobial activities, directly related to their chemical composition. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of essential oil of orange variety Valencia. The essential oil was extracted from orange skin and its antimicrobial activity was evaluated by the disk diffusion test analysis, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The orange essential oil showed antimicrobial effect against gram-positive bacteria. The lowest of MIC and MBC values were obtained for *S. aureus* and *L. monocytogenes*, confirming the potential use of this essential oil as an inhibitor of microbial growth, and may be used as a biopreservative in the food industry.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antimicrobiano, laranja, óleo essencial.

**KEYWORDS:** Antimicrobial, orange, essential oil.



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos:  
Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section VI International Technical Symposium  
Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 - FAURGS- Gramado / RS

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, plantas aromáticas e seus extratos têm sido avaliados quanto à sua eficácia em relação à segurança alimentar. Grande parte das suas propriedades é atribuída aos óleos essenciais e outros componentes do metabolismo secundário das plantas (Calo et al., 2015), que tem despertado interesse na indústria de alimentos devido à sua atividade antioxidante e antimicrobiana (Kfoury et al., 2015). Óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis de baixo peso molecular e insolúveis em água (Dima & Dima, 2015) extraídos a partir de diferentes técnicas de extração, tais como a destilação que inclui a destilação por arraste à vapor, prensagem a frio e maceração (Solórzano-Santos & Miranda-Navales, 2012).

As diversas atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais, tais como agentes antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos, antivirais, anti-inflamatórios e antioxidantes, são dependentes de sua composição química específica (Olmedo et al., 2014), que, por sua vez, dependem de diversos fatores, como a espécie, localização geográfica, época de colheita, clima, técnicas de extração, entre outras (Dima & Dima, 2015). Os componentes químicos dos óleos essenciais são obtidos através de três rotas biossintéticas distintas, tais como, do metileritritol, rota dos mono e diterpenos, do mevalonato para os sesquiterpenos e a rota do ácido chiquímico, para os fenilpropanoides (El-Asbahani et al., 2015).

Em óleos essenciais de citros, aproximadamente 400 compostos têm sido identificados, sendo o citruleno e o limoneno os mais comumente encontrados, podendo exercer atividade antimicrobiana de largo espectro (Calo et al., 2015). O limoneno tem demonstrado ser eficaz contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* e *S. bayanus*, entre outros organismos (Chikhounne et al., 2013).

O óleo essencial de laranja [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] pode ser classificado como uma mistura de terpenos, hidrocarbonetos e compostos oxigenados, considerados quimicamente instáveis. Em função de sua natureza insaturada pode ser facilmente oxidado por influência da luz, do ar e da umidade. O óleo essencial de laranja é constituído por aproximadamente 98% de *R*-limoneno sendo os 2% restantes referentes a uma mistura de outros terpenos e aldeídos alifáticos (Galvão et al., 2015). Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de óleo essencial de laranja.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Laranjas da cultivar Valência, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, coletadas em setembro de 2015, no município de Pelotas-RS, Brasil.

### 2.2 Extração do óleo essencial de laranja (OEL)

Uma amostra de 300 g de cascas frescas de laranja foi triturada com 300 mL de água destilada na proporção de (1:10; p/v). A extração foi feita através de uma hidrodestilação utilizando extrator de Clevenger, conectado a um balão de fundo redondo de 2000 mL, com uma manta de



aquecimento como fonte geradora de calor. Após 3 horas, o óleo essencial foi recolhido e acondicionado em ultrafreezer a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana de óleo essencial de laranja

A determinação do espectro de ação do OEL foi realizada através da técnica de difusão em disco (CLSI, 2015). Culturas bacterianas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*) foram suspensas em água peptonada (0,1%) obtendo a concentração de  $10^8\text{ UFC.g}^{-1}$  (0,5 McFarland). O inóculo foi semeado com swabs estéreis na superfície de placas com Agar Mueller-Hinton (MH - Oxoid®), sobre as quais foram dispostos discos de papel estéreis (Laborclin®). Uma alíquota de  $10\text{ }\mu\text{L}$  de OEL foi adicionada em cada disco, deixando em repouso durante 1 hora para a absorção, e, posteriormente, as placas foram incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após 24 horas foi avaliada a existência de halos de inibição, quantificando os existentes com paquímetro digital (king.tools®).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada através do teste de microdiluição em placa (CLSI, 2015). O OEL foi diluído em caldo Brain Heart Infusion (BHI-Oxoid®) adicionado de 3% de tween 20 (Vetec®) obtendo concentrações de 166,7 a  $0,3\text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$ . As bactérias (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *S. dysenteriae*, *E. coli* e *S. typhimurium*) foram adicionadas obtendo a concentração final de  $10^4\text{ UFC.mL}^{-1}$  em cada poço. As placas foram encubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e a leitura realizada em espectrofotômetro de placas (Robonik® Readwel plate) a 625 nm, considerando a maior diluição, onde não houve crescimento celular (Ojeda-Sana et al., 2013).

Para detectar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), foram plaqueadas em Agar BHI alíquotas de  $10\text{ }\mu\text{L}$  de cada poço, onde houve inibição no teste da CIM, considerando a CBM como a menor concentração, onde não houve crescimento neste novo meio. Todos os testes foram realizados em duplicata.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de laranja

O teste de difusão em disco, CIM e CBM do OEL estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de laranja.

Bactéria	Cepa	Difusão em disco (mm)	CIM ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	CBM ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) <sup>b</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	$10,59 \pm 0,43$	2,60	5,21
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	$10,10 \pm 0,88$	2,60	5,21
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	$9,99 \pm 0,18$	5,21	5,21
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	$9,30 \pm 0,31$	10,42	20,83
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 13313	$8,73 \pm 0,56$	41,67	41,67



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos:  
Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section VI International Technical Symposium  
Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 - FAURGS- Gramado / RS

<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	-	-	-

<sup>a</sup>CIM: Concentração inibitória mínima;

<sup>b</sup>CBM= Concentração bactericida mínima.

Referente ao teste de difusão em disco, foi possível observar que o óleo essencial de laranja apresentou melhor resposta antimicrobiana frente a bactérias gram positivas, destacando-se *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Em relação à concentração inibitória mínima (MIC) e bactericida mínima (CBM), os menores valores de MIC e MBC foram observados contra as bactérias *L. monocytogenes* e *S. aureus*, enquanto os maiores valores foram encontrados para a bactéria *S. dysenteriae*.

Segundo Velázquez-Núñez et al. (2013), óleos essenciais do gênero *Citrus*, que inclui importantes frutos, como laranjas, tangerinas, limas e limão, são conhecidos por apresentar importante efeito antimicrobiano contra bactérias e fungos. Esta atividade antimicrobiana é atribuída principalmente a compostos como o citruleno e o limoneno, considerados majoritários nestes tipos de óleos (Calo et al., 2015).

A ação antimicrobiana de óleos essenciais pode ser atribuída à sua capacidade em penetrar através das membranas bacterianas para o interior da célula e exibem atividade inibitória sobre as propriedades funcionais da célula, e suas propriedades lipofílicas. A resposta antimicrobiana contra bactérias patogênicas de origem alimentar pode ser atribuída também a natureza fenólica dos óleos essenciais. Os mecanismos de ação referem-se à capacidade dos compostos fenólicos de alterar a permeabilidade da célula microbiana, danificando as membranas citoplasmáticas, o que, conseqüentemente, resulta em morte celular (Bajpai et al., 2012).

Bactérias gram positivas, tais como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, são mais susceptíveis aos óleos essenciais que as bactérias gram negativas, tais como *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*. Este fato pode ser devido à interação direta das membranas das células com componentes hidrofóbicos dos óleos (Calo et al., 2015).

A permeabilidade da membrana bacteriana, a presença de proteínas porinas em bactérias gram negativas e a distribuição intracelular dos constituintes dos óleos essenciais são elementos-chaves que influenciam a difusão e a ação dos óleos essenciais dentro das células, representando, então, a variação na atividade dos óleos essenciais esperada contra diferentes grupos de bactérias (Lambert et al., 2001; Randrianarivelo et al., 2009).

No presente estudo, o óleo essencial de laranja não apresentou efeito antimicrobiano frente às bactérias gram negativas *E. coli* e *S. Typhimurium*. A estrutura da parede celular dessas bactérias é constituída essencialmente de lipopolissacarídeos, que bloqueiam a penetração do óleo essencial e evitam o seu acúmulo na membrana de células alvo, conferindo maior resistência a essas bactérias (Cox et al., 2000).


## 4. CONCLUSÃO

O óleo essencial de laranja mostrou resposta antimicrobiana frente a bactérias gram positivas, sugerindo, assim, a sua possível aplicação na conservação de alimentos e apresentando-se como uma alternativa natural aos conservantes sintéticos.

## 5. AGRADECIMENTOS

Promoção:  sbCTA 

Realização:  sbCTA-RS

Organização:  office  
MARKETING  
EVENTOS 51 2108-3111



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos:  
Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section VI International Technical Symposium  
Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 - FAURGS- Gramado / RS

À CAPES, CNPq, FAPERGS, SCT-RS, Pólo de Inovação Tecnológica em Alimentos da Região Sul e à Embrapa Clima Temperado.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bajpai, V. K., Baek, K.-H., & Kang, S. C. (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. *Food Research International*, 45, 722-734.
- CLSI. (2015). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard Eleventh Edition. 32.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems- A review. *Food Control*, 54, 111-119.
- Chikhoun, A., Hazzit, M., Kerbouche, L., Baaliouamer, A., & Aissat, K. (2013). Tetraclinis articulata (Vahl) masters essential oils: chemical composition and biological activities. *Journal of Essential Oil Research*, 25, 300-307.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170-175.
- Dima, C., & Dima, S. (2015). Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5, 29-35.
- El-Asbahani, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aitt Adi, E. H., Casabianca, H., El Mousadik, E., Hartmann D., Jilale, A., Renaud, F.N.R., & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483, 220-243.
- Galvão, J. G., Silva, V. F., Ferreira, S. G., França, F. R. M., Santos, D. A., Freitas, L. S., Alves, P. B., Araújo, A. A. S., Cavalcanti, S. C. H., & Nunes, R. S. (2015).  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. *Thermochimica Acta*, 608, 14-19.
- Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2015). Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. *Carbohydrate Polymers*, 131, 264-272.
- Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 3, 453-62.
- Olmedo, R., Nepote, V., & Grosso, N. G. (2014). Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation. *Food Chemistry*, 156, 212-219.
- Randrianarivelo, R., Sarter, S., Oudox, E., Brat, P., Lebrun, M., Romestand, B., Menut, C., Andrianoelisoa, H.S., Raherimandimby, M., & Danthu, P. (2009) Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamomum fragrans*. *Food Chemistry*, 114, 2, 680-684.
- Santos, A. C. A., Serafini, L. A., & Cassel, E. (2003). Estudo de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas. Caxias do Sul: EDUCS, 19-29.
- Solórzano-Santos, F., & Miranda-Novales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 136-141.
- Velázquez-Nuñez, M. J., Avila-Sosa, R., Palou, E., & López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 31, 1-4.