



Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e de hidrolatos de *Cistus ladanifer*

Sónia Isabel da Conceição Santos

Orientadores

Coordenador interno:

Professora Doutora Fernanda Maria Grácio Delgado Ferreira de Sousa

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Coordenador externo:

Doutor Paulo José Freire Antunes

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciada em Engenharia Biológica e Alimentar, realizado sob a orientadora científica da Professora Doutora Fernanda Delgado e da Professora Doutora Cristina Santos Pintado, do Instituto Politécnico de Castelo Branco, e do Doutor Paulo Antunes, do Centro de Apoio Tecnológico Agro Alimentar de Castelo Branco.

Novembro de 2016

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Doutora Fernanda Delgado docente da Escola Superior Agrária, pela oportunidade de realizar este estágio sob a sua orientação, por toda a disponibilidade, apoio, amizade e acima de tudo a dedicação que teve durante todo o período do curso e estágio.

À Professora Doutora Cristina Santos Pintado, docente da Escola Superior Agrária, por toda a colaboração, dedicação e disponibilidade ao longo do curso e de todo o desenvolvimento deste trabalho.

A todas as pessoas do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária, em especial à Engenheira Helena, por todos os conhecimentos transmitidos e por toda a disponibilidade, ajuda e amizade no decorrer de toda a fase laboratorial do trabalho.

Ao Doutor Paulo Antunes, do Centro de Apoio Tecnológico e Agro Alimentar, pela colaboração, disponibilidade e dedicação prestada ao longo do estágio.

Às empresas Aromas do Valado, Unipessoal, Lda. e Essential Oil NaturalNess por ter disponibilizado os óleos essenciais e os hidrolatos de *Cistus ladanifer*, pois sem eles, este trabalho não poderia ter sido realizado, e a informação necessária para este trabalho, um grande obrigado sempre pela ajuda.

Resumo

Cistus ladanifer é um arbusto pertencente à família *Cistaceae*, ocorre predominantemente em França e na Península Ibérica e é conhecida vulgarmente no nosso país por esteva.

Podemos encontrar esta espécie em todo o território português, sendo que para este estudo escolhemos a zona de Segura e Serra da Gardunha pertencentes ao Distrito de Castelo Branco. Neste estudo utilizaram-se quatro amostras de óleos e duas de hidrolatos sendo uma da zona de Segura, extraída no mês de Janeiro e as restantes da zona do Lourical do Campo extraídas nos meses de janeiro, abril e junho.

Determinou-se a composição química de todas as amostras de óleos extraídos através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). As diferenças verificadas entre os compostos químicos dos óleos foram baseadas em diversos fatores que influenciam os resultados, tais como a época do ano e a zona de colheita. Os valores da concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais de *Cistus ladanifer* foram determinados pelo método de microdiluição em caldo para as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* e para os fungos *Rhizopus* sp. e *Botrytis cinerea*. Para a levedura *Yarrowia lipolytica* utilizou-se o método de macrodiluição em caldo. Foram também determinadas a concentração mínima bactericida (CMB) e a concentração mínima fungicida (CMF).

Dos resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana apenas para a levedura estudada se obteve inibição para todos os óleos. O óleo de Segura não conseguiu inibir nenhum dos fungos testados nem a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Os restantes óleos do Lourical do Campo apenas não inibiram *P. commune*. No que diz respeito a *Botrytis cinerea* apenas se obteve inibição com os óleos de abril e de junho. Para *Rhizopus* sp. só se obteve inibição com o óleo de junho.

Os valores de CMI para as bactérias testadas foram 0,54% para *E. coli* e *Staphylococcus aureus*, 8,7% para *Pseudomonas aeruginosa* e 1,088% para *L. monocytogenes*. No que diz respeito à levedura *Y. lipolytica* temos 5,6%, para o fungo *Botrytis cinerea* obtivemos 1,09% e para *Rhizopus* sp. 2,18%.

Os valores de CMB foram 1,088% para *E.coli* e *Staphylococcus aureus*, 2,18% para *L. monocytogenes* e 8,7% para *Pseudomonas aeruginosa*. No que diz respeito à levedura *Y. lipolytica* obtivemos o valor de 11,3% e por fim para os fungos *Rhizopus* sp. e *Botrytis cinerea* obtivemos um valor de CMB de 1,09%.

Palavras chave

Concentração mínima inibitória; Concentração mínima bactericida; Concentração mínima fungicida; Esteva; Controlo de microrganismos

Abstract

Cistus ladanifer is a shrub of the family *Cistaceae*. It is native in France and in the Iberian Peninsula and is known commonly in our country by "esteva".

We find this species throughout the Portuguese territory, and for this study we chose the area of Segura and Gardunha Mountain Range, both belonging to the municipality of Castelo Branco. In this study we used four samples of oils and two of hydrolates, being one from Segura, extracted in the month of January and the rest where extracted in Louriçal do Campo during the months of January, April and June.

We determined the chemical composition of all samples of oils extracted by gas chromatography coupled to a spectrometer (GC-MS). The differences between the chemical compounds of the oils were based on several factors that influence the results, such as the time of year and the harvest area.

The values of the minimal inhibitory concentration (MIC) of essential oils of *Cistus ladanifer* were determined by the method of broth microdilution for the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* and fungi *Rhizopus* sp. and *Botrytis cinerea*. For the yeast *Yarrowia lipolytica* was used the broth macrodilution method. We also determined the minimal bactericidal concentration (MBC) and the minimal fungicidal concentration (MFC).

In the results obtained in the determination of antimicrobial activity only for the yeast studied, we found inhibition to all oils. The oil of Segura failed to inhibit any of the tested fungi or bacteria *Ps. aeruginosa*. The remaining oils from Louriçal do Campo just did not inhibit *P. commune*. Concerning *Botrytis cinerea* we just obtained inhibition to the oils of April and June. For *Rhizopus* we only obtained inhibition to the oil of June.

The values of MIC for the bacteria tested were 0.54% for *E. coli* and *Staphylococcus aureus*, 8.7% to *Pseudomonas aeruginosa* and 1.09% for *L. monocytogenes*. Regarding the yeast *Y. lipolytica* we have 5.6%, for the fungus *Botrytis cinerea*, 1.09% and *Rhizopus* sp. 2.18%.

The values of MBC were 1.09% for *E. coli* and *Staphylococcus aureus*, 2.18% for *L. monocytogenes* and 8.7% for *Pseudomonas. aeruginosa*. Regarding the yeast *Y. lipolytica* we have 11.3% and finally, the fungus *Rhizopus* sp. and *Botrytis cinerea* we obtained a MBC value of 1.09%.

Keywords

Minimal inhibitory concentration; Minimal bactericidal concentration; Minimal fungicidal concentration; Crimson-spot rockrose; Microbial control

Índice geral

Agradecimentos.....	III
Resumo	V
Abstract.....	VII
Índice de figuras	XI
Lista de tabelas	XII
Introdução	1
I Revisão Bibliográfica	2
1. <i>Cistus ladanifer</i>	2
2. Óleos essenciais.....	3
2.1 Composição química	4
2.2 Ação antimicrobiana.....	5
3. Hidrolatos.....	5
4. Técnicas de macro e microdiluição em caldo	6
5. Características dos microrganismos em estudo.....	7
5.1 <i>Escherichia coli</i>	7
5.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	7
5.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
5.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	8
5.5 <i>Yarrowia lipolytica</i>	9
5.6 <i>Penicillium commune</i>	9
5.7 <i>Botrytis cinerea</i>	10
5.8 <i>Rhizopus</i> sp.....	10
II Material e Métodos.....	11
1. Extrações de óleos essenciais de <i>Cistus ladanifer</i>	11
1.1 Recolha de material vegetal.....	11
1.2 Hidrodestilação.....	11
1.3 Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	12
2. Ensaio prévio da atividade antimicrobiana	13
3. Método de microdiluição em caldo para a avaliação da concentração mínima inibitória para as bactérias.....	13
3.1 Preparação dos meios de cultura.....	14
3.2 Preparação da solução resazurina	14
3.3 Preparação do inóculo	14
3.4 Inoculação da microplaca	15

3.5	Concentração mínima bactericida e fungicida	17
4.	Método de macrodiluição em caldo para a avaliação da concentração mínima inibitória face à levedura estudada	17
4.1	Preparação do meio de cultura	17
4.2	Preparação do inóculo	18
4.3	Ensaio da macrodiluição em caldo.....	18
4.4	Avaliação da concentração mínima fungicida	19
5.	Método de microdiluição para determinação da concentração mínima inibitória face aos bolores testados	20
5.1	Preparação do meio de cultura	20
5.2	Preparação da suspensão de esporos.....	20
5.3	Inoculação da microplaca.....	20
5.4	Concentração Mínima Fungicida	21
III	Resultados e Discussão.....	22
1.	Identificação dos compostos químicos dos óleos essenciais	22
2.	Testes prévios.....	25
3.	Concentração mínima inibitória (CMI).....	25
4.	Concentração mínima bactericida (CMB) e fungicida (CMF).....	28
IV	Considerações Finais	30
	Referências Bibliográficas.....	31

Anexos

Índice de figuras

Figura 1 Planta de <i>Cistus ladanifer</i> (Themes,2016).....	2
Figura 2 Sistema de hidrodestilação (Sartor, 2009)	3
Figura 3 Constituintes químicos dos óleos essenciais (Azambuja, sd)	4
Figura 4 Sistema de destilação a vapor (Ferraço,2013)	6
Figura 5 Contaminação de morangos por <i>Botrytis cinerea</i>	10
Figura 6 Destilador por arraste a vapor de Louriçal do Campo (Essential Oil NaturalNess).....	12
Figura 7 Esquema da microplaca.....	16
Figura 8 Ensaio em microplaca inoculada com <i>Listeria monocytogenes</i> no qual foram testados os óleos essenciais de Segura (A.V., A.V.', A.V.'') e do Louriçal do Campo do mês de junho (L.f., L.f.', L.f.''), ambos em triplicado.....	16
Figura 9 Ensaio em microplaca inoculada com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no qual foram testados os óleos essenciais do Lourião do Campo de janeiro (Lj, Lj', Lj'') e de abril (La, La', La''), ambos em triplicado.....	17
Figura 10 Esquema do ensaio da macrodiluição	18
Figura 11 Tubos de ensaio antes de incubação do óleo L. janeiro.....	19
Figura 12 Esquema da inoculação da microplaca com a suspensão de bolores	21
Figura 13 Cromatograma do óleo de L. janeiro.....	22
Figura 14 Resultado do ensaio de microdiluição em caldo para a <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26

Lista de tabelas

Tabela 1 Compostos identificados de todos os óleos analisados.....	23
Tabela 2 Resultados obtidos nos ensaios prévios dos óleos e hidrolatos usando o método de difusão em agar, com e sem disco	25
Tabela 3 Resultados dos ensaios de CMI de todos os microrganismos testados	27
Tabela 4 Resultados dos ensaios CMB e CMF de todos os microrganismos testados...	28