



Óleos essenciais de *Melaleuca armillaris* Caracterização e atividade antimicrobiana

Patrícia Isabel Nunes Pires

Orientadores

Professora Doutora Fernanda Maria Grácio Delgado Ferreira de Sousa

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

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 Biologia Aplicada, realizado sob a orientação científica da Prof^a Doutora Fernanda Delgado e da Prof^a Doutora Cristina Pintado, do Instituto Politécnico de Castelo Branco e do Doutor Paulo Antunes, do Centro de Apoio Tecnológico Agro Alimentar de Castelo Branco.

Outubro de 2013

Agradecimentos

Começo por agradecer à Doutora Fernanda Delgado, docente da Escola Superior Agrária, pela oportunidade de realizar este estágio sob a sua orientação, por todo o apoio e dedicação ao longo do curso e do estágio.

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

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

À Doutora Catarina Gavinhos, docente da Escola Superior Agrária, pela disponibilidade e ajuda prestada na realização dos estudos estatísticos deste trabalho.

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

À Engenheira Cecília, do Laboratório de Química da Escola Superior Agrária, por todo o apoio durante a extração dos óleos essenciais.

Às minhas colegas de curso que me acompanharam neste percurso, em especial à Ana Sofia, que sempre me apoiou e a sua amizade nunca será esquecida.

Ao Mickael, por toda a força incondicional, apoio e incentivo que me dá sempre, e por ser uma pessoa especial que me ajuda em tudo e por nunca me deixar desistir daquilo em que acredito.

Por fim, agradeço à minha família e amigos, principalmente aos meus pais pelo grande apoio, em todos os aspectos, que sempre me deram, e por me incentivarem a lutar por um futuro melhor.

Resumo

Melaleuca armillaris é um arbusto, pertencente à família *Myrtaceae*, com origem na Austrália. Esta espécie é cultivada no terreno da Escola Superior Agrária (Castelo Branco), na qual se utilizaram as suas folhas em verde e em seco a fim de se extraírem os seus óleos essenciais através de hidrodestilação. O objectivo foi identificar os compostos químicos desses óleos, assim como a sua atividade antimicrobiana.

A primeira etapa foi a determinação do tempo de extração dos óleos essenciais, a partir de folhas secas de *M. armillaris* recolhidas em outubro de 2012. Efetuou-se a extração dos óleos essenciais de folhas em verde e em seco recolhidas em plantas com exposição Norte nos meses de março, abril e maio de 2013. Realizou-se também extração de óleos essenciais de folhas em seco no mês de maio, na direção Sul. Através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrometro de massa (GC-MS) determinou-se a composição química de todas as amostras de óleos extraídos. As diferenças verificadas entre os compostos químicos dos óleos nas diferentes condições foram analisadas através de tratamento estatístico. Os valores da concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais de *M. armillaris* foram determinados pelo método de microdiluição em caldo para as bactérias *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* e pelo método de macrodiluição para a levedura *Yarrowia lipolytica*. Os valores de concentração mínima bactericida (CMB) e concentração mínima fungicida (CMF) foram determinados pelo método de avaliação de concentração mínima bactericida e fungicida, respetivamente. O cloranfenicol foi usado como antibiótico de referência. Os óleos essenciais foram testados com concentrações diferentes para cada cultura.

O tempo ideal de extração dos óleos essenciais foi de 2 horas e na composição química destes, destaca-se o 1,8-cineol como composto maioritário.

Os resultados da atividade antimicrobiana mostraram que *L. monocytogenes* e *Yarrowia lipolytica* foram inibidas pelos óleos essenciais de *M. armillaris*, enquanto que o crescimento de *P. aeruginosa* não foi afetado, mesmo com a concentração mais elevada. Os valores de CMI e CMB mais frequentes dos óleos essenciais testados contra *L. monocytogenes* foram 11,63 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ /22,48 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ e 83,2 $\mu\text{l.ml}^{-1}$, respetivamente. No que diz respeito à levedura *Yarrowia lipolytica*, observaram-se valores de CMI e CMF de 8,76 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ para todos os óleos essenciais, à exceção da CMF do óleo da planta situada a Sul (26,22 $\mu\text{l.ml}^{-1}$).

A relação entre a actividade antimicrobiana, a origem da planta e a composição química dos óleos essenciais a partir de diferentes proveniências foram também discutidas.

Palavras chave

Melaleuca armillaris, óleos essenciais, atividade antimicrobiana, *Listeria monocytogenes*, *Yarrowia lipolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

Melaleuca armillaris (Soland & Gaertn) Sm is a shrub belonging to the family *Myrtaceae*, originated in Australia. This species is cultivated on the campus of Escola Superior Agrária (Castelo Branco). Were used its leaves in green and dry in order to extract their essential oils by hydrodistillation. The aim was to identify the chemical compounds of these oils, as well as their antimicrobial activity.

The first step was the determination of the time of extraction of essential oils from dry leaves of *M. armillaris* collected in October 2012. Essential oils of leaves in fresh and dried plants collected in Northern exposure in the months of March, April and May of 2013 made up the time previously set. We also conducted extraction of essential oils from leaves dry in May, towards south through gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC - MS) determined the chemical composition of all samples extracted oils. The differences between the chemical compounds of the oils in different conditions were analyzed by statistical treatment. The values of minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oils of *M. armillaris* were determined by the broth microdilution method for the bacteria *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* and the macrodilution method for the yeast *Yarrowia lipolytica*. The values of minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were determined by the method of evaluation of minimum concentration bactericide and fungicide, respectively. The antibiotic chloramphenicol was used as reference. The essential oils were tested in different concentrations for each microorganism. The optimal time of extraction of essential oils was 2 hours and the chemical composition of these stands out as the 1,8-cineole compound majority.

The results of antimicrobial activity showed that *L. monocytogenes* and *Yarrowia lipolytica* were inhibited by the essential oils of *M. armillaris*, while the growth of *P. aeruginosa* was not affected, even at the highest concentration. The values of MIC and MBC most frequently against *L. monocytogenes* were 11.63 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ /22.48 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ e 83.2 $\mu\text{l.ml}^{-1}$, respectively. In *Yarrowia lipolytica*, the MIC and CMF is the same value, 8.76 $\mu\text{l.ml}^{-1}$, for all essential oils, except for CMF oil plant located South (26.22 $\mu\text{l.ml}^{-1}$).

The relationship between the antimicrobial activity, of plant origin and chemical composition of essential oils from different origins were also discussed.

Keywords

Melaleuca armillaris, essential oils, antimicrobial activity, *Listeria monocytogenes*, *Yarrowia lipolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*

Índice geral

Agradecimentos	III
Resumo	V
Abstract	VII
I Introdução	1
II Revisão Bibliográfica	2
1. <i>Melaleuca armillaris</i>	2
2. Óleos essenciais	3
2.1. Composição química	4
2.2. Ação antimicrobiana	5
3. Técnicas de macro e microdiluição em caldo	6
4. Características dos microrganismos em estudo	7
4.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	7
4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
4.3 <i>Yarrowia lipolytica</i>	8
III Material e Métodos	8
1. Extrações de óleos essenciais de <i>Melaleuca armillaris</i>	8
1.1. Recolha do material vegetal	8
1.2. Hidrodestilação	9
2. Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrómetro de massa	10
3. Ensaio prévios de atividade antimicrobiana	10
4. Método de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana contra <i>Listeria monocytogenes</i>	12
4.1. Preparação do meio de cultura	12
4.2. Preparação do púrpura de bromocresol	12
4.3. Preparação do cloranfenicol	13
4.4. Obtenção e preparação do inóculo	13
4.5. Ensaio de microdiluição em caldo	13
4.6. Avaliação da concentração mínima bactericida	14
5. Método de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
5.1. Preparação do meio de cultura	15
5.2. Preparação da resazurina	15
5.3. Obtenção e preparação do inóculo	15
5.4. Ensaio de microdiluição em caldo	15
5.5. Avaliação da concentração mínima bactericida	16

6. Método de macrodiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana contra <i>Yarrowia lipolytica</i>	16
6.1. Preparação do meio de cultura	16
6.2. Obtenção e preparação do inóculo	16
6.3. Ensaio de macrodiluição em caldo	16
6.4. Avaliação da concentração mínima fungicida	17
IV Resultados e Discussão	18
1. Rendimentos de extração de óleos essenciais	18
1.1. Determinação do tempo de extração dos óleos essenciais	18
1.2. Extração dos óleos essenciais em diferentes meses	18
2. Identificação dos compostos químicos dos óleos essenciais e comparações estatísticas	19
3. Concentrações mínimas inibitórias (CMI)	21
4. Concentrações mínimas bactericidas (CMB) e fungicidas (CMF)	24
V Considerações Finais	25
VI Referências Bibliográficas	26
Anexos	