



Relatório Final de Estágio

Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Lavandula* spp. em microrganismos potencialmente patogénicos

Ecalina Maria Alves

Orientadora Interna

Professora Doutora Fernanda Maria Grácio Delgado Ferreira de Sousa

Orientadora Externa

Mestre Joana Lopes Domingues

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciado em Produção de Alimentos e Nutrição Humana, realizada sob a orientadora interna Professora Doutora Fernanda Maria Grácio Delgado Ferreira de Sousa, da Escola Superior de Agrária, do Instituto Politécnico de Castelo Branco, e da Mestre Joana Lopes Domingues, do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior.

novembro de 2021

Composição do júri

Presidente do júri

Grau académico, nome do presidente do júri”

Vogais

Grau académico, nome do presidente do júri”

Categoria profissional e o nome da Instituição

Grau académico, nome do presidente do júri”

Categoria profissional e o nome da Instituição

Grau académico, nome do presidente do júri”

Categoria profissional e o nome da Instituição

Dedicatória

Dedico este relatório aos meus pais e as pessoas que contribuíram ao longo deste percurso para que eu tivesse uma boa educação. Sem eles, atualmente, eu não estaria aqui. Com o coração cheio de agradecimento, queria-vos agradecer e desejar que Deus vos guarde.

A todos muito obrigada!

Agradecimentos

É com muita alegria que elaboro este relatório, pois significa o fim de uma etapa, a mais importante e a mais surpreendente da minha vida. São tantas histórias e as memórias que ficam para sempre guardadas no peito.

E para demonstrar o meu apreço, queria agradecer em primeiro lugar à minha família, pois tudo isto foi possível com toda a dedicação, a confiança, a paciência, a oração e pelo apoio incondicional que me deu ao longo destes três anos dos meus estudos de licenciatura e que sempre me disse para estudar e ter confiança em mim própria, para que pudesse ter uma vida melhor do que a deles.

Ao Ministério de Educação de Timor-Leste que deu suporte com toda a dedicação ao longo de todo o percurso; nada teria sido possível sem a sua colaboração. Agradeço pela oportunidade, pela confiança e pela contribuição do meu sucesso.

À minha orientadora interna, Professora Doutora Fernanda Delgado, pela sua disponibilidade, paciência, compreensão e dedicação para terminar este relatório.

Ao Centro Biotecnologia de Plantas de Beira Interior pela sua contribuição de autorizar a utilização das suas instalações e equipamentos necessários para a realização da extração e liofilização dos óleos essenciais. Especialmente à Joana Domingues pela sua disponibilidade de ajudar como uma excelente pessoa e profissional durante o período de estágio.

A todas as pessoas do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária, principalmente à Engenheira Manuela Goulão e Professora Doutora Cristina Pintado, que com a sua sabedoria e os seus conhecimentos transmitidos e disponibilidade de ensinar com paciência na realização das atividades da fase laboratorial do trabalho.

A todos os professores que me transmitiram os seus conhecimentos, agradeço a dedicação, o contributo, o seu tempo, a atenção para o meu crescimento pessoal e académico.

Aos colegas e à família em fé, que sempre me acompanharam através das orações, aos apoios que me deram e estiveram ao meu lado durante a minha fase de aprendizagem.

Por esta mesma razão, não quero deixar passar esta oportunidade sem agradecer a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu sucesso e a minha chegada até aqui.

A todos, muito obrigada!

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de duas espécies de *Lavandula*, a *L. stoechas* subsp. *luisieri* e *L. pedunculata* em 10 culturas bacterianas e uma cultura de levedura, todas potencialmente patogênicas: *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* (a estirpe de referência *P. aeruginosa* ATCC 27853 e um isolado obtido de uma amostra de água), *Burkholderia* sp., *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila* e *Chromobacterium violaceum*, e a levedura *Candida albicans*.

Os óleos essenciais utilizados neste trabalho foram obtidos em laboratório, pelo método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, proveniente de plantas recolhidas no período de floração na Serra da Malcata. O óleo essencial de cada espécie foi testado numa primeira fase quanto à sua ação antimicrobiana, usando o método de difusão em placa, com disco e com gota. De acordo com os resultados nestes ensaios prévios, ambos os óleos essenciais apresentaram ação inibitória nos microrganismos testados. Posteriormente foram realizados ensaios para a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração mínima bactericida (MBC). O perfil químico dos óleos essenciais foi obtido por cromatografia gasosa acoplado a um detetor de espectrometria de massa (GC-MS).

O óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri* revelou possuir como compostos maioritários o acetato de *trans*- α -necrodilo (37,81%), *trans*- α -necrodol (10,39%), acetato de lavandulil (5,53%), *o*-cymeno (5,26%) e fenchona (4,20%). No caso do óleo essencial de *L. pedunculata* os maioritários são fenchona (48,89%), cânfora (11,00%), 1,8-cineol (9,57%), α -pineno (7,89%) e linalol (3,52%). De acordo com os resultados obtidos, ambos os óleos essenciais demonstraram atividade antimicrobiana, no entanto foi o óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri* que demonstrou uma maior eficácia, com valores de MIC e MBC inferiores, comparativamente ao óleo essencial de *L. pedunculata*. Para o óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri*, a MIC mais baixa foi encontrada contra *B. cereus* e *Salmonella* sp. e contra a levedura *C. albicans*, com valores de 4,67 μ L/mL. Enquanto para o óleo essencial de *L. pedunculata* os menores valores de MIC obtiveram-se contra a *Salmonella* sp (4,67 μ L/mL). As MBC mais baixas foram encontradas para os microrganismos *C. albicans* para o óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e *C. violaceum* para ambas as espécies, com valores de 9,33 μ L/mL. Por outro lado, os microrganismos mais resistentes (MBC mais elevadas) à ação dos óleos essenciais foram o *B. cereus* e *P. aeruginosa*, esta última só para o óleo essencial de *L. pedunculata*, onde não foi possível determinar a concentração máxima bactericida, cujos valores de MBC foram superiores à concentração máxima testada (149,3 μ L/mL).

Palavras-chave

Atividade Antimicrobiana; GC-MS; *L. stoechas* subsp. *luisieri*; *L. pedunculata*; Óleos Essenciais.

Abstract

This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of essential oils from two species of *Lavandula*, *L. stoechas* subsp. *luisieri* and *L. pedunculata* in 10 bacterial cultures and one yeast culture, all potentially pathogenic: positive coagulase *Staphylococcus*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* (the reference strain ATCC 27853 and an isolate obtained from a water sample), *Burkholderia* sp., *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, and *Chromobacterium violaceum*.

The essential oils used in this work were obtained by hydrodistillation in *Clevenger* apparatus from aerial parts of plants collected during the flowering period in Serra da Malcata. The major volatile components present in the essential oils were identified by gas chromatography coupled with a mass spectrometry detector (GC-MS). The essential oil of each species was first tested for its antibacterial action, using the method of diffusion in plate, with a disc and drop. As both essential oils presented inhibitory action in the previous analyses, subsequent tests were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC).

The main chemical compounds of *L. stoechas* subsp. *luisieri* essential oils were *trans*- α -necrodyl acetate (37,81%), *trans*- α -necrodol (10,39%), lavandulyl acetate (5,53%), *o*-cymene (5,26%) e fenchone (4,20%). While the *L. pedunculata* essential oil the main compounds were fenchone (48,89%), camphor (11,00%), 1,8-cineole (9,57%), α -pinene (7,89%) and linalool (3,52%). According to the results obtained, both essential oils demonstrated antimicrobial activity against the cultures used, nevertheless, the essential oil of *L. stoechas* subsp. *luisieri* demonstrated greater efficacy, with lower MIC and MBC values, compared to *L. pedunculata* essential oil. For the *L. stoechas* subsp. *luisieri* essential oil, a lower MIC was found against *B. cereus* and *Salmonella* sp. and the yeast *C. albicans*, with values of 4,67 μ L/mL. While for the *L. pedunculata* essential oil the lowest MIC values were obtained against *Salmonella* sp, at the same concentration (4,67 μ L/mL). The lowest MBC was found for the microorganisms *C. albicans* for the essential oil of *L. stoechas* subsp. *luisieri* and *C. violaceum* for both species, with values of 9,33 μ L/mL. On the other hand, the most resistant microorganisms to the action of essential oils were *B. cereus* and *P. aeruginosa*, the latter only for the essential oil of *L. pedunculata*, where it was not possible to determine the MBC, the values were higher than the maximum concentration tested (149,3 μ L/mL).

Keywords

Antimicrobial activity; Essential oils; GC-MS analysis; *L. stoechas* subsp. *luisieri*; *Lavandula pedunculata*.

Índice Geral

I.	Introdução	1
II.	Revisão Bibliográfica	2
1.	Caracterização morfológica, química e etnobotânica das plantas usadas neste trabalho.....	2
1.1.	<i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	2
1.2.	<i>Lavandula pedunculata</i>	3
1.3.	Óleos Essenciais (OE) e Extratos Aquosos (EA)	4
2.	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	5
3.	Modo de ação antimicrobiana	6
4.	Características dos microrganismos usados neste estudo	6
4.1.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	6
4.2.	<i>Bacillus cereus</i>	6
4.3.	<i>Burkholderia</i> sp.	7
4.4.	<i>Candida albicans</i>	7
4.5.	<i>Chromobacterium violaceum</i>	8
4.6.	<i>Listeria monocytogenes</i>	8
4.7.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
4.8.	<i>Salmonella</i> sp.....	9
4.9.	<i>Serratia marcescens</i>	9
4.10.	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	10
III.	Material e Métodos	11
1.	Recolha do material vegetal	11
2.	Obtenção dos óleos essenciais e extratos aquosos.....	11
3.	Análise dos compostos químicos dos óleos essenciais	12
4.	Microrganismos selecionados.....	12
4.1.	Ensaio prévio da atividade antimicrobiana	13
4.2.	Método de microdiluição em caldo para avaliação da atividade antimicrobiana (MIC)	14
4.2.1.	Preparação do meio de cultura	14
4.2.2.	Preparação da solução de resazurina	14
4.2.3.	Preparação do inóculo	14
4.2.4.	Preparação da microplaca.....	14
4.3.	Avaliação da concentração mínima bactericida (MBC).....	15
IV.	Resultados e Discussão	17
1.	Rendimento de extração dos subprodutos da hidrodestilação.....	17

2. Componentes químicos majoritários de óleos essenciais de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>L. pedunculata</i>	17
3. Ensaio prévio da atividade antimicrobiana	20
4. Concentração mínima inibitória (MIC)	21
5. Concentração mínima bactericida (MBC).....	23
V. Considerações Finais	25
VI. Referências Bibliográficas	26
Web bibliografia	29

Índice de figuras

Figura 1 - <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	2
Figura 2 - <i>Lavandula pedunculata</i>	3
Figura 3 - Aparelho do tipo Clevenger.....	11
Figura 4 - Desenho experimental da microplaca para determinar a concentração mínima inibitória (MIC).	15
Figura 5 - Cromatograma do óleo essencial de <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> obtido por GC-MS.....	18
Figura 6 - Cromatograma do óleo essencial de <i>Lavandula pedunculata</i> obtido por GC-MS.....	20

Lista de tabelas

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana de subprodutos de hidrodestilação de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>L. pedunculata</i>	5
Tabela 2 - Culturas microbianas usadas neste trabalho.	13
Tabela 3 - Rendimento de extração dos subprodutos de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>L. pedunculata</i>	17
Tabela 4 - Compostos maioritários do óleo essencial de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	18
Tabela 5 - Compostos maioritários do óleo essencial de <i>L. pedunculata</i>	19
Tabela 6 - Resultados do ensaio prévio da atividade antimicrobianos do óleo essencial (OE) e extratos aquosos (EA) de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e de <i>L. pedunculata</i>	21
Tabela 7 - Concentração mínima inibitória ($\mu\text{L}/\text{mL}$) dos óleos essenciais de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>L. pedunculata</i>	22
Tabela 8 - Concentração mínima bactericida ($\mu\text{L}/\text{mL}$) dos óleos essenciais de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>L. pedunculata</i>	23
Tabela 9 - Concentração mínima inibitória e bactericida ($\mu\text{g}/\text{mL}$) do extrato aquoso de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	24

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

μL - microlitro

ATCC - American Type Culture Collection

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CN - controlo negativo

CP - controlo positivo

EA - Extrato Aquoso

GC-MS - Gas Chromatography – Mass Spectrometry

h - Horas

L - Litro

MBC - Minimum Bactericidal Concentration

mg - miligrama

MIC - Minimum Inhibitory Concentration

mL - mililitro

mm - milímetro

NIST - National Institute of Standards and Technology

°C - graus Celsius

OE - Óleo Essencial

PAM - Plantas Aromáticas e Medicinais

sp. - Espécie

spp. - Espécies

subsp. - Subespécie

UFC - Unidade Formadora de Colónias