



INSTITUTO FEDERAL
Rondônia



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia

RENATA DA SILVA MAGALHÃES

**DESENVOLVIMENTO DE ANTIMICROBIANO UTILIZANDO *BLENDS* DE
OLEOS ESSENCIAIS PARA MICROORGANISMOS ISOLADOS EM SUPERFÍCIES
DE INOX DE BEBEDOUROS ESCOLAR**

Colorado do Oeste-RO
2021



RENATA DA SILVA MAGALHÃES

**DESENVOLVIMENTO DE ANTIMICROBIANO UTILIZANDO *BLENDS* DE
OLEOS ESSENCIAIS PARA MICROORGANISMOS ISOLADOS EM SUPERFÍCIES
DE INOX DE BEBEDOUROS ESCOLAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Campus Colorado do Oeste Rondônia, em cumprimento às exigências legais como requisito parcial à obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Doutor Nélio Ranieli Ferreira de Paula

Colorado do Oeste
2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Gerador de Ficha Catalográfica do IFRO,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Magalhaes, Renata da Silva.
Desenvolvimento de antimicrobiano utilizando blends de óleos
essenciais para microorganismos isolados em superfícies de inox de
bebedouros escolares / Renata da Silva Magalhaes, Colorado do
Oeste-RO, 2024.
26 f.

Orientador(a): Dr Nélio Ranieli Ferreira de Paula.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências
Biológicas) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de
Rondônia - IFRO, Colorado do Oeste-RO, 2024.

1. Contaminação. 2. Controle de qualidade. 3. Higienização. I.
Paula, Nélio Ranieli Ferreira de (orient.). II. Instituto Federal de
Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia - IFRO. III. Título.

Bibliotecário(a) Responsável: Juliana Machado da Silva Sasset, CRB-11/1140 (Campus Colorado do Oeste)



RENATA DA SILVA MAGALHÃES

**DESENVOLVIMENTO DE ANTIMICROBIANO UTILIZANDO *BLENDS* DE
OLEOS ESSENCIAIS PARA MICROORGANISMOS ISOLADOS EM SUPERFÍCIES
DE INOX DE BEBEDOUROS ESCOLAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Campus Colorado do Oeste Rondônia, em cumprimento às exigências legais como requisito parcial à obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado e aprovado em ___/___/___, pela seguinte Banca Examinadora:

Nélio Ranieli Ferreira de Paula (Orientador)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia

Nome do Prof convidado, Membro da banca - Examinadora
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte

Nome do Prof convidado, Membro da banca - Examinadora
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte



INSTITUTO FEDERAL
Rondônia



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia

*Dedico este trabalho a minha, por ela procuro
ser e oferecer o melhor.*



AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pois sem Ele nada sou. E tenho plena convicção que foi sua mão que me sustentou até aqui. A Ele seja todo meu louvor.



INSTITUTO FEDERAL
Rondônia



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia

“Os que se encantam com a prática sem a ciência
são como os timoneiros que entram no navio sem
timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu
destino”.

(Leonardo da Vinci)



RESUMO

Nos últimos tempos, o uso de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais, tem sido pesquisado cada vez mais pois apresentam atividade contra uma ampla variedade de microrganismos: vírus, fungos, protozoários e bactérias. Objetivou-se neste projeto desenvolver conservante biodegradável com ação antimicrobiana utilizando *blends* de óleos essenciais (cravo da Índia e hortelã-pimenta; canela e eugenol) contra *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* e Fungos filamentosos e Leveduriformes isolados de superfícies de inox de bebedouros de escola pública. O projeto foi realizado no Instituto Federal de Rondônia – Campus Colorado do Oeste, no laboratório de microbiologia de alimentos da agroindústria do Campus. Foram selecionados e identificados dois setores de pesquisa, setor A (Educação); setor B (Técnico). Para cada setor foram selecionados dois bebedouros para verificação da microbiota presente na superfície de inox. Ambas as amostras foram coletadas em superfícies de bebedouros provenientes de ambientes e ou local de fornecimento de água refrigerada e filtrada para estudantes, funcionários, técnicos e professores da Instituição. De acordo com os resultados os *blends* desenvolvidos com hortelã-pimenta e cravo da Índia (B1/B3) e eugenol e canela (B2/B4) apresentam ação antibacteriana para *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* e Fungos filamentosos e Leveduriformes isolados de superfícies de inox de bebedouros de escola pública, a frequência de higienização de bebedouros de inox contribuem para manutenção da qualidade e segurança no fornecimento de água potável sem risco de contaminação para a comunidade escolar.

Palavras-chave: Contaminação; Controle de qualidade; Higienização.

ABSTRACT

In recent times, the use of essential oils extracted from medicinal plants has been increasingly researched as they show activity against a wide variety of microorganisms: viruses, fungi, protozoa and bacteria. The objective of this project was to develop biodegradable preservative with antimicrobial action using blends of essential oils (Clove and peppermint; cinnamon and eugenol) against *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* and Filamentous fungi and Yeasts isolated from stainless steel surfaces of public-school drinking fountains. The project was carried out at the Federal Institute of Rondônia – Colorado do Oeste Campus, at the Campus agroindustry food microbiology laboratory. Two research sectors were selected and identified, sector A (Education); sector B (Technical). For each sector, two drinking fountains were selected to verify the microbiota present on the stainless-steel surface. Both samples were collected on surfaces of drinking fountains from environments and/or places where chilled and filtered water was supplied to students, employees, technicians and teachers of the institution. According to the results, the blends developed with peppermint and cloves (B1/B3) and eugenol and cinnamon (B2/B4) have an antibacterial action against *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* and Filamentous fungi and yeasts isolated from stainless steel surfaces of drinking fountains public school, the frequency of cleaning stainless steel drinking fountains contribute to maintaining the quality and safety of drinking water supply without risk of contamination for the school community.

Keywords: Contamination; Quality control; Sanitation.



SUMÁRIO

1. Introdução.....	9
2. Objetivo geral.....	11
2. Objetivo específicos.....	11
3. Materiais e metodos	12
3.1 Isolamento de bactérias, quantificação e a elaboração de <i>blends</i>	13
4. Resultados e discussão.....	15
6. Conclusão.....	22
7. Referências Bibliográficas.....	23

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos tempos, o uso de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais, tem sido pesquisado cada vez mais, devido às propriedades de conservar os alimentos e oferecer controle fitossanitário por métodos ecologicamente seguros, proporcionando o desenvolvimento de técnicas que reduzem os efeitos negativos de oxidantes, radicais livres e microrganismos causadores de grandes prejuízos às indústrias alimentícias. Eles vêm crescendo e conquistando os consumidores por apresentarem benefícios à saúde e menos prejuízos ao meio ambiente (PEREIRA et al., 2008) e, além disso, tem substituído os condimentos na forma natural, devido a sua uniformidade, estabilidade e higiene (ARAÚJO, 2011). Com esta preocupação, o consumo de plantas medicinais tem base na tradição familiar e tornou-se prática generalizada na medicina popular. Atualmente, muitos fatores têm contribuído para o aumento da utilização deste recurso, entre eles, o alto custo de produtos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência, nos dias atuais, ao uso de produtos de origem natural (SIMÕES et al., 1998).

O tratamento de infecções bacterianas e fúngicas são basicamente com ação sobre o agente etiológico, através de interferência sobre mecanismos celulares essenciais em sua sobrevivência, bem como ação corretiva ou supressora de fatores predisponentes à instalação de processo infeccioso. Um dos meios de controle antimicrobiano é o uso de conservantes industrializados e ou por meio de produtos naturais, o que neste sentido venham corroborar com o desenvolvimento de novos produtos inovadores e com características biodegradáveis além de promover ação antimicrobiana o mesmo não causa impacto ambiental quanto aos resíduos que podem ser liberados ao meio ambiente. Óleos essenciais são produtos voláteis presentes em vários órgãos vegetais (partes aéreas, cascas, troncos, raízes, frutos, flores, sementes e resinas) e estão relacionados ao metabolismo secundário das plantas exercendo diversas funções importantes à sobrevivência vegetal, como por exemplo, na defesa contra microrganismos (Lima et al., 2006).

Os óleos essenciais apresentam atividade contra uma ampla variedade de microrganismos: vírus, fungos, protozoários e bactérias. Os compostos e suas porcentagens presentes nos OE's variam de acordo com a espécie considerada, a condições de coleta e extração, e as partes da planta utilizadas. Os principais compostos isolados dos óleos essenciais são terpenos e seus derivados oxigenados, terpenoides, incluindo os compostos fenólicos (Solórzano-Santos & Miranda-Navales, 2011).

O OE é encontrado a partir de compostos químicos das plantas que consegue por meio do vapor hidro vaporização, destilação, etc. São extraídos de plantas aromáticas. A composição química depende de vários fatores, sendo como exemplos os climáticos, ação de predadores, idade da planta, etc. (Gobbo Neto & Lopes, 2007). A atividade antibacteriana vai depender do tipo, composição e concentração da espécie ou do óleo essencial, a composição do substrato, o processamento e condições de estocagem e tipo do microrganismo em questão (Bertini et al., 2005). Eles apresentam ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (Alvarenga et al., 2007) e ainda sobre leveduras (Hammer et al., 1999) e fungos filamentosos (Viegas et al., 2005).

Os efeitos antimicrobianos normalmente ocorrem devido aos danos estruturais e funcionais promovidos na membrana plasmática da bactéria, especialmente pela hidrofobicidade destes compostos presentes nos óleos essenciais (GOÑI et al., 2009). Os óleos essenciais podem desnaturar e coagular proteínas, afetando a estrutura da parede celular da bactéria, agindo como um mecanismo de ação que possui efeito antimicrobiano. Pode levar a morte da bactéria devido a alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática para íons de hidrogênio e potássio, que pode causar a interrupção dos processos vitais da célula que dependem de enzimas, como o transporte de elétrons, translocação de proteínas e fosforilação, o que causa a perda do controle quimiosmótico da célula afetada (DORMAN & DEANS, 2000).

O uso de óleos essenciais são uma boa opção para a substituição de aditivos químicos em alimentos, pois estes possuem um potente e amplo espectro de ação antibacteriana, reduzindo o efeito bacteriano (TRAJANO et al., 2009). Tajkarimi et al. (2010) concluíram que são necessários mais estudos detalhados sobre antimicrobianos naturais em alimentos, especialmente sobre a efetividade dos óleos essenciais, quando empregados individualmente e em combinação com outros extratos, óleos essenciais e tecnologias de processamento de alimentos. A composição química dos óleos essenciais pode variar de acordo com a cultivar e fatores ambientais, no entanto normalmente estão presentes compostos como: linalol, 1,8 cineol e eugenol (AQUINO et al., 2010). Segundo a Resolução nº 2/2007 da ANVISA (BRASIL, 2007), que aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes, os óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetais obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado).

Segundo GOBBO-NETO & LOPES (2007), alguns compostos majoritários podem ter seu acúmulo alterado em função do ritmo circadiano, ou seja, variações que ocorrem ao longo do dia. Os óleos essenciais utilizadas na pesquisa foram, óleo essencial de cravo da índia;

eugenol; óleo essencial canela e hortelã pimenta. Esta pesquisa tem como objetivo determinar a ação antibacteriana de seis óleos essenciais de acordo com a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e determinação de curvas de sobrevivência, quanto ao isolamento de microrganismos indicadores de higiene e contaminação ambiental de espécies de *Staphylococcus aureus* e *Enterobacteriaceae*, em superfícies de inox.

Os óleos essenciais são aditivos antimicrobianos naturais, ricos em compostos biologicamente ativos, obtidos principalmente por destilação a partir de várias fontes vegetais. A atividade antimicrobiana de óleos essenciais tem sido muito estudada e demonstrada contra vários micro-organismos, principalmente *in vitro* (LÓPEZ ET al., 2005). Tem alcançado êxito na inibição do crescimento microbiano, exercendo efeitos bacteriostáticos, bactericidas e também atividade inibitória contra fungos e leveduras (LANG, 2011). A muito tem se falado em soluções biológicas para quase todos os problemas no meio ambiente causado por microorganismo.

2.0 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver conservante com ação antimicrobiana utilizando *blends* de óleos essenciais (cravo da índia e hortelã pimenta; canela e eugenol) contra *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* e Fungos filamentosos e Leveduras isoladas de superfícies de inox de bebedouros de escola pública.

2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desenvolvimento de um conservante ou um sanitizante biodegradável para higienização de superfícies de inox;
- Apresentar um antimicrobiano biológico de baixo custo a partir da união dos óleos essências de cravo e hortelã pimenta; canela e eugenol;
- Computar a atividade antimicrobiana em superfícies de inox em diferentes períodos de tempo e concentrações;
- Avaliar o halo de inibição de *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* e Fungos filamentosos e Leveduras.

3.0 MATERIAI E METODOS

O projeto foi realizado no Instituto Federal de Rondônia – *Campus* Colorado do Oeste, no laboratório de microbiologia de alimentos da agroindústria do Campus. Foram selecionados e identificados dois setores de pesquisa, setor A (Educação); setor B (Técnico). Para cada setor foram selecionados dois bebedouros para verificação microbiota presente na superfície de inox. Ambas amostras foram coletadas em superfícies de bebedouros provenientes de ambientes e ou local de fornecimento de água refrigerada e filtrada para estudantes, funcionários, técnicos e professores da Instituição, vale destacar que estes bebedouros de água gelada estão localizados em ambientes abertos sujeitos a contaminação ambiental, Figura 1.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

A pesquisa foi realizada em esquema fatorial com duas coletas, dois bebedouros, em dois ambientes (educacional e técnico), com 6 tratamentos sendo 2 controles e quatro *blends* (B1, B2, B3 e B4) em três repetições separada por períodos de coletas a cada 6 dias com avaliações a cada 24 horas após cada coleta de amostras de *suwab* em superfície de inox. Desta maneira, após a primeira avaliação houve a necessidade de reformular à concentração de óleos essenciais selecionados para a elaboração de *blends* com propriedades antimicrobianas para superfície de inox em bebedouros escolar. Os óleos essenciais utilizados foram hortelã pimenta, eugenol, cravo da índia e canela ambos produzidos pelo laboratório da Sigma – Aldrich®. Os óleos adquiridos foram acondicionados em frascos de vidros revestidos com papel alumínio, esterilizados (GUIMARÃES et al., 2008), e armazenados em temperatura de 10°C até serem utilizadas para avaliar a atividade antibactericida de cada *blend*.

3.1 Isolamento de bactérias, quantificação e a elaboração de *blends*

As diferentes bactérias pesquisadas, caracterizadas, isoladas e quantificadas foram *Enterobactérias*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Fungos e leveduras através de amostragem e coleta de amostras em bebedouros pelo método de *suwab* de diferentes partes de superfícies de inox localizadas em bebedouros (frontal, lateral, dentro da cuba e também próximo à vazão de água. Sendo realizados análises microbiológicas quanto a quantificação e isolamento de bactérias foram realizadas segundo as metodologias propostas pela *International Commission on Microbiological Specification for Foods Method* - ICMSF (1983) e Silva et al. (2007).

Para os testes microbiológicos foram utilizadas as placas de Petrifilm™ de identificação de Coliformes Totais (Petrifilm™ CC), *Enterobacteriaceae* (Petrifilm™ EB) e *Staphylococcus aureus* (Petrifilm™ STX). Para a contagem dos microrganismos, o meio de cultivo do Petrifilm™ contém nutrientes do Ágar Padrão para contagem (PCA). O Petrifilm™ é apresentado na forma de cartões de papel, chamados de placas Petrifilm, revestidos pelo meio de cultivo desidratado, contendo corante indicador e agentes geleificantes solúveis em água. As placas são cobertas por uma película transparente, que tem voltada para a placa um gel hidrossolúvel e o corante indicador. A película protetora é marcada por quadros de 1 cm² (Figura 2).

FIGURA 2: Avaliação de crescimento microbiano em Petrifilm™ de identificação de Coliformes Totais (Petrifilm™ CC), *Enterobacteriaceae* (Petrifilm™ EB) e *Staphylococcus aureus* (Petrifilm™ STX)



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Foram realizadas diluições seriadas em água peptonadas utilizando peptona de caseína a 4% entre 10^{-1} cicloslog a 10^{-4} cicloslog provenientes de amostras de *suwabs* coletadas em diferentes superfícies de bebedouros sendo logo após esta etapa todos tubos foram homogeneizados e em seguida, foi pipetado 1000 μL de cada diluição anterior sendo transferido para placas de petri em duplicadas contendo o meio de cultura específico de avaliação e identificação de microrganismos indicadores como Enterobactérias, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Fungos e leveduras. Esta avaliação (tratamento) foi considerada como tratamento controle, ou seja, representa o resultado da presença de microrganismos encontrados nestes bebedouros provenientes destes setores identificados na escola.

Os tratamentos com óleos essenciais serão compostos pela combinação dos arranjos dados pela interação das diferentes concentrações de *blends* dos óleos essenciais elaborados para cada setor. Foram elaborados dois *blends* com diferentes misturas de óleos essenciais para o *Blend 1*, foi realizado a junção de óleo essencial de hortelã pimenta e óleo essencial de cravo da Índia, na proporção de 1:1 ou seja 100 μL de cada óleo. foi desenvolvido *blend* com 200 μL de óleo essencial juntamente com 800 μL caldo de TSB com emulsificante de leite em pó (0,6%). Após esta etapa foram distribuídos 100 μL para cada placa de petri contendo 20 mL de meio de cultura conforme cada microrganismo avaliado. Para a segunda avaliação do mesmo *Blend 1* (óleo essencial de hortelã pimenta e óleo essencial de cravo da Índia) foi realizada nova formulação de concentração ficando 50 μL de hortelã pimenta e 150 μL de cravo de cravo da Índia.

Para a elaboração do *Blend 2* foram utilizados também duas concentrações diferentes, para primeira avaliação foi utilizado se 50 μL de eugenol para 150 μL de canela homogeneizados com 800 μL caldo de TSB com emulsificante de leite em pó (0,6%). Para a segunda análises do *blend 2* foram utilizados a concentração de 1:1 ou seja 100 μL de eugenol para 100 μL de canela homogeneizados com 800 μL caldo de TSB com emulsificante de leite em pó (0,6%). Após esta etapa foram distribuídos 100 μL para cada placa de petri contendo 20 mL de meio de cultura conforme cada microrganismo avaliado.

A padronização dos inóculos bacteriano foram realizados mediante curva de crescimento. Foi realizado a reativação de culturas, em tubo contendo TSB, incubada na estufa a 37°C por 24 horas, posteriormente foram transferidos 100 μL desse tubo para 100 mL de caldo TSB e incubadas a 37°C, por período *over night*. Foram realizadas leituras periódicas da absorbância (600nm) em espectrofotômetro (BEL SP-2000). As culturas foram padronizadas em aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹, para ser aplicado na avaliação do efeito antimicrobiana dos óleos essenciais avaliados como: ***Blend 1*** (100 μL de óleo essencial de

hortelã pimenta e 100 µL de óleo essencial de cravo da Índia) e **Blend 2** (50 µL de óleo essencial de eugenol com 150 µL óleo essencial de canela). **Blend 3** (50 µL de óleo essencial de hortelã pimenta e 150 µL de óleo essencial de cravo da Índia). **Blend 4** (100 µL de óleo essencial de eugenol com 100 µL óleo essencial de canela).

Foi utilizado o método de difusão em ágar na qual consistiu de aplicar em placas de petri contendo 20 mL do meio de cultura TSA e Ágar Hektoen Enteric, em duplicata. Foram pipetados primeiramente 100 µL a concentração de *blends* dos óleos essenciais ou compostos majoritários, logo após foram espalhados até secar com uma alça de drigalski e posteriormente foi pipetado 30 µL da suspensão bacteriana, e espalhar até secar também. As placas foram colocadas na estufa por 24 horas a 37°C para posterior avaliação da atividade antimicrobiana para as diferentes concentrações de *blends*, avaliando se houve crescimento ou não de colônias nas placas.

As observações consistiram na avaliação de presença de microrganismos desenvolvidos no meio de cultura específico, contado o número de colônias de bactérias e Fungos Filamentosos e Leveduriformes (UFC/cm² de superfície de inox), de interesse presentes em cada parcela e comparados com as diferentes concentrações de *blends* de óleos essenciais e diluições. Os dados foram submetidos à análises de variância com auxílio do programa Estatística e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados no Gráfico 1, setor educacional e Gráfico 2 setores técnico, todos *Blends* desenvolvidos mostraram efeitos superiores aos controles (ausência de antimicrobianos) durante seis tempos de avaliação de 144 horas, ambos mostraram diminuição de crescimento de *Staphylococcus aureus* em superfícies de inox de bebedouros escolar. No Gráfico 3, podemos visualizar que os *blends* desenvolvidos e aplicados após o isolamento de *Staphylococcus aureus* em superfícies de inox de bebedouros no setor Técnico, promoveram ação antimicrobiana significativamente superior ao setor Educacional ($p > 5\%$).

Vale destacar que houve sinergismo e efeito semelhante entre as combinações aplicadas contra *Staphylococcus aureus* isolados em superfícies de inox de bebedouros escolar pois o *Blend 1* (Hortelã pimenta/Cravo da Índia) e *Blend 2* (Eugenol/Canela) nos primeiros 4 dias (96 Horas) de avaliação apresentaram respostas semelhantes, porém a partir de 120 Horas tanto o *Blend 1* quanto o *Blend 2* mostraram redução significativa em relação ao tratamento controle. A mistura entre hortelã pimenta e cravo da Índia na mesma proporção 1:1

mostrou melhor eficácia no controle de *Staphylococcus aureus* em superfícies de inox de bebedouros no setor Educacional, Gráfico 1. Semelhantemente no setor técnico houve menor quantificação de *Staphylococcus aureus* em superfícies de inox de bebedouros porem ambos tratamentos, *blends* 1 e 2, apresentaram o mesmo padrão de controle durante 6 dias de avaliação. Neste sentido podemos dizer que a combinação de óleo essencial de (Eugenol/Canela) na concentração de 1:3 também mostrou efetividade no controle de *Staphylococcus aureus* em superfícies de inox de bebedouros do setor técnico, Gráfico 2.

GRAFICO 1 – Apresenta avaliação de crescimento de *Staphylococcus aureus* em superfícies de inox de bebedouros em UFC/cm² apos o uso de antimicrobiano/ Setor Educacional

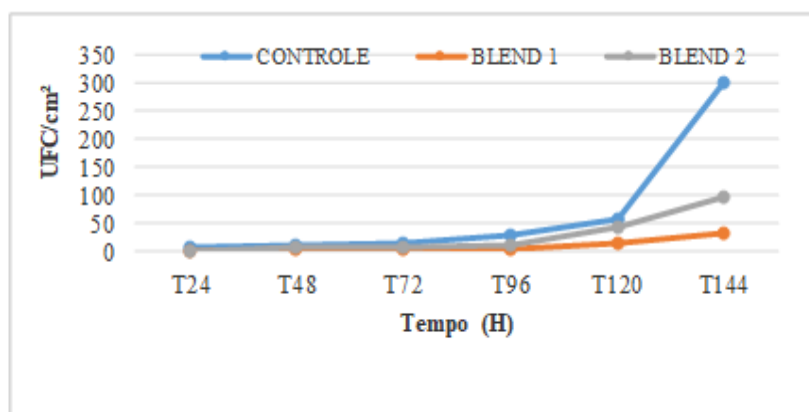
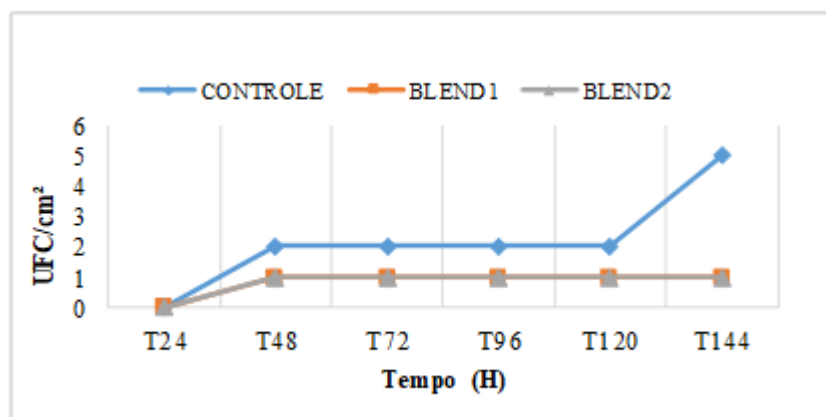


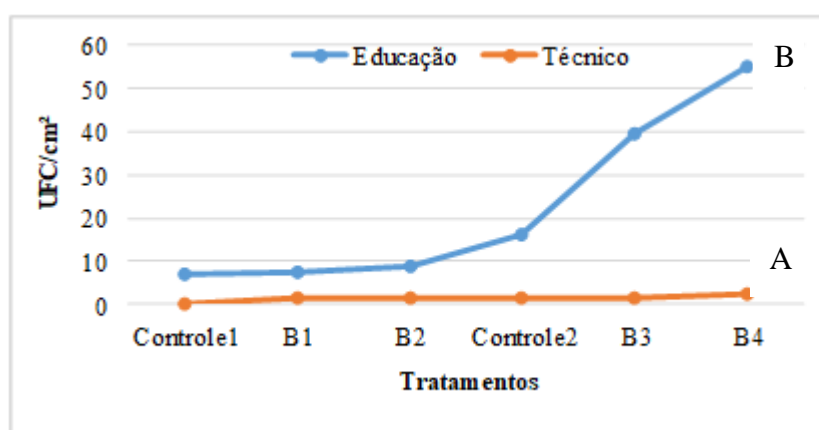
GRAFICO 2 – Apresenta a avaliação de crescimento de *Staphylococcus aureus* em superfícies de inox de bebedouros em UFC/cm² após o uso de antimicrobiano /Setor Técnico



No Gráfico 3, apresenta o efeito das misturas de óleos essenciais (*Blends*) nos setores de Educação e setor Técnico provenientes de 4 *blends*: B1 é semelhante a B3, porém houve apenas alteração em suas concentrações de óleos essenciais ficando na proporção de 1: 3 ou seja 50µL de OE de hortelã pimenta para 150µL de OE de cravo da índia. Da mesma forma o *blend* B2 é semelhante ao *Blend* B4 ficando com a mesma proporção de OE de eugenol e OE de canela, com 100µL para cada óleo. No setor técnico todas as formulações (*Blends*)

mostraram efeito bactericida e bacteriostático, ficando semelhante ao controle quanto aos sanitizantes utilizados para a higienização de bebedouros neste setor. Porém no setor Educacional foi verificado aumento da contagem bacteriana com a alteração na proporção da concentração de óleos essenciais utilizados para a elaboração dos novos *blends* descritos acima principalmente o B3 e B4, veja abaixo no Gráfico 3.

GRAFICO 3 - Apresenta a avaliação de *Staphylococcus aureus* após a aplicação de diferentes *blends* sob a superfície de inox de bebedouros (UFC/Cm²) em dois setores (Educação) e (Técnico)

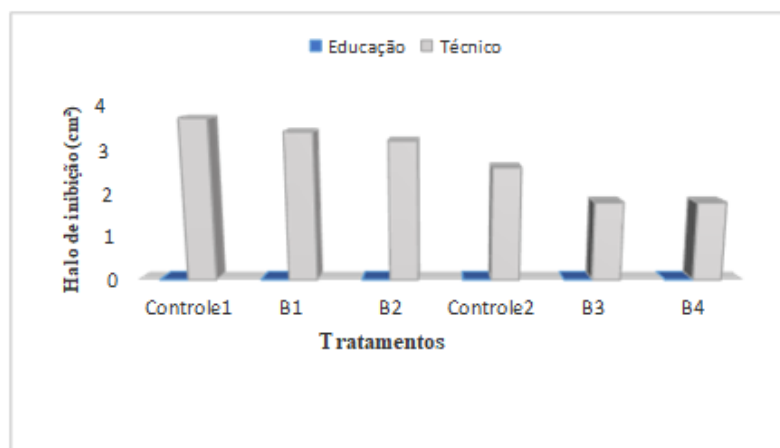


Os autores Silva et al. (2009), avaliando a concentração mínima inibitória (CIM) para *Staphylococcus aureus*, verificaram que potencial inibidor decrescente dos óleos foi: canela > gengibre > capim-limão > cravo da Índia > hortelã pimenta > alecrim. A ação antibacteriana dos componentes dos óleos essenciais pode ocorrer de três formas: pela interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular; pelo aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; e por alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos, incluindo aqueles envolvidos na produção de energia celular e síntese de componentes estruturais ou por inativação e destruição do material genético, Kalemba & Kunicka, (2003). De acordo com Ernandes & Garcia-Cruz (2007) o óleo essencial de cravo da Índia mostrou 43,3% de halos de inibição bacteriana, enquanto o de hortelã apresentou 37,5%, sendo as bactérias gram positivas mais sensíveis ao efeito dos óleos com 44,2% de frequência de halos formados em relação às Gram negativas com 36,7%. Conforme Silvestri et al. (2010) mostrou que a composição química dos óleos essenciais de cravo-da-Índia possui o eugenol como composto majoritário 90,3%, além de β -cariofileno 4,83% e acetato de eugenol 1,87%. De acordo com o Gráfico 4, as combinações de OE utilizados para elaboração de *blends* B3 e B4 aplicadas no setor técnico mostraram resultados semelhantes quanto à redução do crescimento de

Enterobactérias e menores halos de contaminação, média de 1,5 cm² de crescimento bacteriano avaliados nas superfícies de inox de bebedouros deste setor. Porém vale destacar que não houve isolamento de *Enterobactéria* nos bebedouros do setor Educacional para todos *blends* aplicados, pois *obtiveram* respostas semelhantes ao controle no setor de Educação durante 144 horas de avaliação, ou seja, estes *blends* (B1, B2, B3 e B4) apresentaram potencialmente efeito bacteriostático e bactericida no controle de *Enterobactérias* em superfície de inox de bebedouro escolar durante este período de avaliação.

Óleos ricos em compostos fenólicos possuem atividade antimicrobiana sobre bactérias da família *Enterobacteriaceae* (PEÑALVER et al., 2005). Duarte et al. (2007) que avaliaram 29 óleos essenciais contra diferentes sorotipos de *E. coli*, observaram que os óleos de *M. piperita*, *O. basiculum*, *O. vulgare* e *Thymus vulgaris* apresentaram concentrações mínimas inibitórias acima de 1000 µg/mL, valores considerados elevados pelos autores. As bactérias gram-negativas (como *Escherichia coli* e *Salmonella*) contém lipopolissacarídeos na membrana externa o que forma uma superfície hidrofílica. Isso cria uma barreira a substâncias hidrofóbicas, como os óleos essenciais, tornando essas bactérias resistentes a esses aditivos (DORMAN & DEANS, 2000).

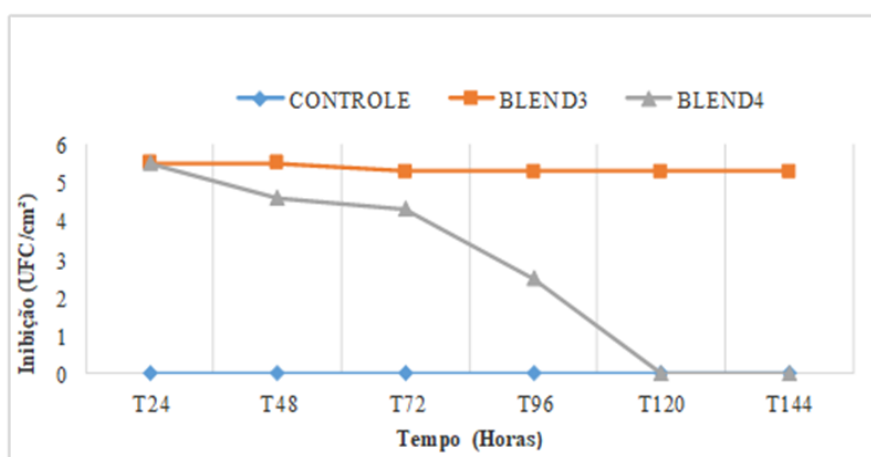
GRAFICO 4 – Apresentação o efeito da inibição no halo de crescimento de *Enterobactérias* após a aplicação de *blends* (B1, B2, B3 e B4) contra microrganismo isolados de superfícies de inox de bebedouros de setores escolar



No Gráfico 5 mostra o efeito da inibição quanto a redução de halo (*Blend 4*) em cm²/24h de *Enterobactérias* em função do tempo de avaliação 144 horas após aplicação de antimicrobiano no controle de microrganismos isolados de superfícies de inox de bebedouros escolar no setor Técnico. Verificamos para o tratamento controle ausência de inibição durante todos dias de avaliação, do contrário o *Blend 3* (50µL de óleo essencial de hortelã pimenta e

150 μ L de óleo essencial de cravo da Índia) apresentou melhor estabilidade e eficiência no controle de *Enterobactérias* por cm² em superfície de inox durante as 144 horas de avaliação. Já o *Blend 4* mostrou gradativamente a redução de inibição entre 48 horas à 120 horas com ausência total de inibição de *Enterobactéria* em superfície de inox de bebedouro escolar no período de 5 dias de avaliação.

GRAFICO 5 – Mostra o efeito da inibição em cm²/24h de *Enterobactérias* em função do tempo de avaliação após aplicação de antimicrobiano no controle de microrganismos isolados de superfícies de inox de bebedouros escolar no setor técnico.



Devi et al. (2010) relatam que o mecanismo primário de ação do eugenol, em concentração bactericida, promoveu a ruptura da membrana citoplasmática bacteriana, aumentando a sua permeabilidade não específica. Esta hiperpermeabilidade promoveu o extravasamento de íons e a perda excessiva de outros componentes celulares, incluindo as proteínas intracelulares, resultando, finalmente, em morte celular. Craveiro et al. (1981), complementa que o eugenol provoca inibição na produção de amilase e proteases pela célula, bem como sua deterioração e lise. Greay; Hammer (2015) citam alguns dos mecanismos por meio dos quais os monoterpenos atuam sobre células bacterianas. Os autores relatam que monoterpenos interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória. O óleo essencial de cravo da Índia (*Caryophyllus aromaticus* L. - Myrtaceae) está presente na planta em grande quantidade, entre 15 e 25% e é utilizado na culinária, nas indústrias de alimento e também na medicina. O principal constituinte deste óleo é o ácido cinâmico (70% a 80%) e eugenol (4% a 7%) (Matan et al., 2006) e a ação antimicrobiana é relatada frente a inúmeros microrganismos (Dorman & Deans, 2000).

De acordo com Hammer e Carson (2011), a difusão passiva da molécula do óleo essencial, por meio da parede celular de bactérias Gram-positivas e fungos ou membrana

externa de bactérias Gram-negativas é a interação inicial entre os componentes dos óleos essenciais e a célula microbiana. La Storia et al. (2011), demonstraram também que pode ocorrer interação de constituintes dos óleos essenciais com a membrana externa de bactérias Gram-negativas. O aumento da fluidez da membrana parece estar entre os primeiros efeitos antimicrobianos causados pelo tratamento dos microrganismos com óleos essenciais. A membrana citoplasmática representa barreira eficaz entre o citoplasma e o ambiente externo. A importação e exportação dos metabólitos e íons essenciais para todas as atividades que ocorrem na célula microbiana ocorre através da membrana citoplasmática.

Turina et al. (2006) enfatiza que o efeito de íons específicos sobre a membrana plasmática tem forte efeito sobre a força próton motriz e atividade global de células microbianas, como transporte de solutos e processo de regulação do metabolismo. De acordo com os Gráficos 6 e 7 apresentados abaixo, foram obtidos os resultados de crescimentos ($\text{cm}^2/24\text{h}$) de Fungos e Leveduras em superfícies de inox de bebedouros escolar após o isolamento e aplicação de antimicrobiano tanto no setor Educacional quanto no setor Técnico durante 6 dias de avaliação. Desta maneira, tanto no setor Educacional quanto no setor Técnico foi verificado melhor ação antifúngica para o B3 (*blend 3*), durante 144 horas de avaliação e do contrário, B4 (*blend 4*) mostrou resposta antagônica uma vez que foi verificado aumento de Unidade Formadora de Colonias de Fungos e Leveduras (UFC) após 48 horas (setor Educacional) e 120 horas (setor Técnico) de avaliação.

GRÁFICO 6 - Avaliação de crescimento ($\text{cm}^2/24\text{h}$) de Fungos e Leveduras em superfícies de inox de bebedouros escolar após o isolamento e aplicação de antimicrobiano/Setor Educacional.

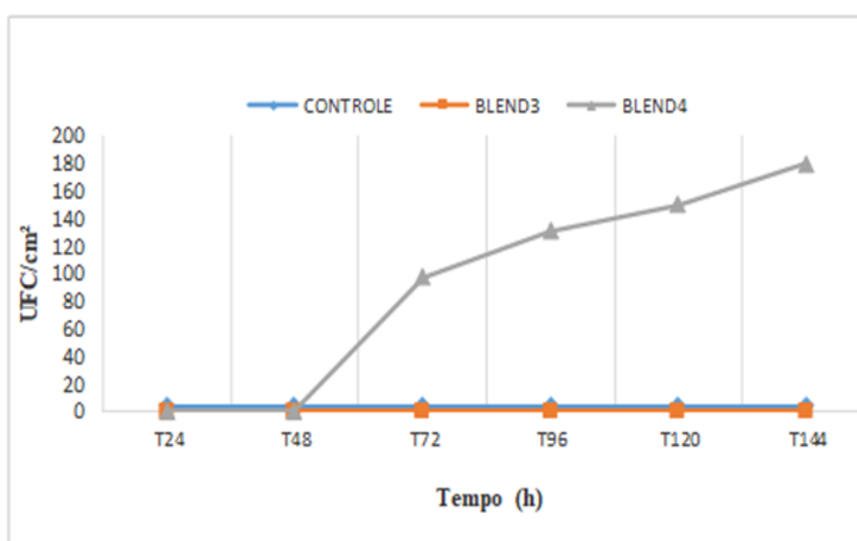
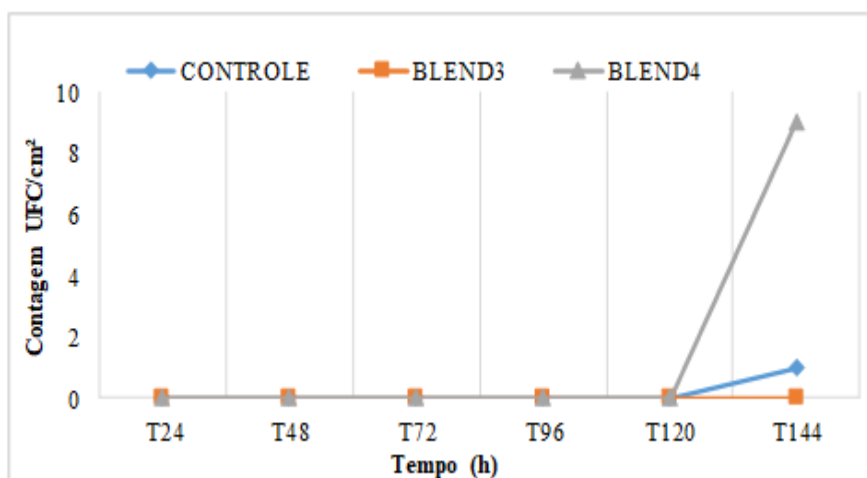


GRAFICO 7 - Avaliação do crescimento (cm²/24h) de Fungos e Leveduras em superfícies de inox de bebedouros escolar apos o isolamento e aplicação de antimicrobiano/ Setor de Técnico.



Diversos trabalhos corroboram com estes resultados apresentados nesta pesquisa pois de acordo com (SINGH et al., 2011) o óleo essencial de hortelã-pimenta é extraído de talos e folhas e possui atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica, devido a presença dos compostos mentol, mentona, acetato de metila, iso-mentona. A concentração do composto majoritário mentol no óleo pode variar entre 28% a 42%. Isto sugere que a presença de hortelã pimenta no *blend* 3, promove o aumento de eficiência no controle de fungo de leveduras em superfícies de inox de bebedouros escolar agindo simbioticamente com óleo essencial cravo da índia pois possui odor fortemente aromático, sabor ardente e característico. Neste sentido das sementes de cravo da índia extrai-se o óleo essencial à qual é incolor e de sabor picante, cujo composto majoritário é o eugenol. Da mesma maneira Costa et al. (2011), avaliaram a ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* sobre fungos e observaram que o componente majoritário do óleo foi o eugenol (83,6%).

De acordo com (NASCIMENTO et al., 2000) ele apresenta efeito anti-inflamatório, cicatrizante e antifúngico, com propriedades antibactericidas também usado como antisséptico. Podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. O óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume - Lauraceae) é utilizado como flavorizante aromatizante e conservante natural de alimentos. Estudos mostraram a capacidade de inibir o crescimento de fungos (Lima et al., 2006) e de bactérias (Matan et al., 2006). Foram identificados 23 constituintes no óleo essencial obtido de folhas de canela, sendo o eugenol o composto que apresentou maior percentual (60%). A

partir de galhos foram identificados 36 compostos com predominância de monoterpenos α e β -pineno, α -felandreno, p -cimeno, limoneno, linalol, sequiterpenos α -copaeno, β -cariofileno, óxido de cariofileno e os alilbenzenos ϵ -cinamaldeído e aceto de ϵ -cinamila (Lima et al., 2005). Óleo essencial de Hortelã Pimenta (*Mentha piperita*), tem sido também relatado por possuir atividade, antibacteriana, antiviral e antifúngica, sendo esta atividade associada principalmente aos compostos majoritários mentol, mentona, acetato de metila, iso-mentona (Singh, et al., 2011).

5. CONCLUSÃO

Os *blends* desenvolvidos com hortelã pimenta e cravo da Índia (B1) e eugenol e canela (B2) apresentam ação antibacteriana de *Staphylococcus aureus* em superfícies de bebedouros de inox avaliados no ambiente escolar, setor técnico (ação bactericida) e setor educacional (efeito bacteriostático) a frequência de higienização de bebedouros de inox, contribuem para manutenção da qualidade e segurança no fornecimento de água potável sem risco de contaminação para a comunidade escolar.

Os *blends* desenvolvidos com hortelã pimenta e cravo da Índia (B1/B3) e eugenol e canela (B2/B4) apresentam ação antibacteriana para *Enterobactéria*, porém o Blend 3 (50 μ L de óleo essencial de hortelã pimenta e 150 μ L de óleo essencial de cravo da Índia) apresentou melhor estabilidade e eficiência no controle e inibição do desenvolvimento de *Enterobactérias* por cm² em superfície de inox durante as 144 horas de avaliação.

O blend 3 (hortelã pimenta e cravo da Índia) apresentou melhor eficiência quanto a ação antifúngica em superfícies de bebedouros de inox avaliados no ambiente escolar tanto no setor de produção quanto no setor educacional durante 6 dias de avaliação, esta formulação desenvolvida demonstra possibilidade inovadora de desenvolvimento de conservantes biodegradável para superfície de ambientes com alta umidade com exposição ambiental na promoção de segurança, saúde e sustentabilidade quanto a higienização de bebedouros de inox tanto em setor de técnico quanto no setor educacional.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, A.L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.4, p.86-91, 2007.

AQUINO, L. C. L.; SANTOS, G. G.; TRINDADE, R. C.; ALVES, J. A. B.; SANTOS, P. O.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; CARVALHO, L. M. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjerição frente a bactérias de carnes bovinas. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, v. 21, n. 4, p 529-535, 2010.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos**: teoria e prática. 5. ed. Viçosa: UFV, 2011, 601p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Regulamento sobre Aditivos Aromatizantes. Diário Oficial da União, DF, 2007.

BERTINI, L.M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Revista Infarma**, v.17, n.314, p.80-3, 2005.

COSTA, A. R. T.; AMARAL, M. F. Z. J.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A. M.; 708 FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Ação do 709 óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de 710 alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 711 Botucatu, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.308-316, 2000.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an 1718 essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by 1719 disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107–1720 115. 2010.

DUARTE, M.C.T. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on 1742 *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.197–201, 2007.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. **Atividade Antimicrobiana de Diversos Óleos Essenciais em Microrganismos Isolados do Meio Ambiente**. B.CEPPA, Curitiba v. 25, n. 2, p. 193-206 jul./dez. 2007.

GOBBO-NETO, L., & LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, p. 374-381. 2007.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p.982-989, 2009.

GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- 1755 and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, v. 1756 14, p. 1-6, 2015.

GUIMARAES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; ZACARONI, L. M.; LIMA, R. K. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C) STAPF). **Química Nova**, v.31, n.6, p.1476-1480, 2008.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, n.6, p.985-90, 1999.

HAMMER, K.A.; CARSON, C. F. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: THORMAR, H. (Ed.). **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. West Sussex: J. Wiley. p. 255-306, 2011.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos**: características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, 1998. 606 p.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial e antifungal properties of oil Essentials. **Current Medicinal Chemistry**, Shipol, v.10, p. 813-829, May. 2003.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, Chichester, v. 27, p. 13-39, 2011.

LASTORIA, A.; ERCOLINI, D.; MARINELLO, F.; DI PASQUA, R.; VILLANI, F.; MAURIELLO, G. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, v.162, n. 2, p. 164-172, 2011.

LIMA, I.O. et al. Atividade antifúngica e óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.16, n.2, p.197-201, 2006.

LÓPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERIN, C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n.17, p. 6939-6946, 2005.

MATAN, N. et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, n.2, p.180-5, 2006.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31 p.247-256, 2000.

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.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.877-893, 2008.

SINGH, R.; SHUSHNI, M.A.M.; BELKHEIR, A. Antibacterial and anti oxidant activity of *Menthapiperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, v.4, n.1, p.1-20, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. 1102 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Varela. 2007.552 p.

SILVA, M. T. N.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; CUNHA, M. L. R. S.; FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 257-262, 2009.

SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v.57, n.5, p.589-594, 2010.

SOLÓRZANO-SANTOS, F. & MIRANDA-NOVALES, M. G.; Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, 2011.23, 1-6.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p. 1199 – 1218, 2010.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

TURINA A.V.; NOLAN, M.V.; ZYGADLO, J.A.; PERILLO, M.A . Natural 983 terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 984 122, p.101-113, 2006.

VIEGAS, E.C. et al. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus* **Revista Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.915-9, 2005.