

## ACÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL FRENTE A CEPAS BACTERIANAS CONTAMINANTES DE ALIMENTOS

[Antimicrobial action of essential oil against bacterial strains of food contaminants]

Jorge Messias Leal do Nascimento<sup>1\*</sup>, Marielly Bastos Cavalcante<sup>2</sup>, Jarbas Freitas Amarante<sup>3</sup>, Carina da Costa Krewer<sup>4</sup>, Mateus Matiuzzi da Costa<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Discente (doutorado) do programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA, Brasil.

<sup>2</sup>Msc. em Ciência Animal (Produção Animal), Universidade Federal do Vale do São Francisco - Univasf, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, Brasil.

<sup>3</sup>Biólogo da Univasf, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, Brasil.

<sup>4</sup>Discente (mestrado) do programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife-PE, Brasil.

<sup>5</sup>Docente do colegiado de Zootecnia e Medicina Veterinária da Univasf, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, Brasil.

**RESUMO** – Objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana de óleo essencial obtido a partir de mix de alecrim, orégano e pimenta, em diferentes concentrações, sobre 30 isolados bacterianos, sendo eles: *Staphylococcus* spp. (n = 10), *Aeromonas* spp. (n = 10) e *Escherichia coli* (n = 10). Foram realizados testes de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração bactericida mínima (CBM) determinado pela técnica de microdiluição em caldo. Não foi possível avaliar os resultados da CIM do óleo utilizado, logo, o mesmo apresentou coloração turva dificultando a distinção entre o óleo e o crescimento bacteriano. Em relação aos resultados da CBM, observou-se que, a melhor atividade antimicrobiana para o óleo essencial ocorreu nas concentrações de 17,2 e 34,4 µg/mL, não havendo influência do metanol sobre os resultados obtidos. O óleo essencial avaliado apresenta atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados. Além disso, por se tratar de um produto natural não deixa resíduos prejudiciais aos alimentos.

**Palavras-Chave:** Aditivos; Indústria Alimentícia; Microbiologia; Plantas medicinais.

**ABSTRACT** - The objective was to evaluate the antimicrobial activity of essential oil obtained from mix of rosemary, oregano and pepper in different concentrations on 30 bacterial isolates, they being: *Staphylococcus* spp. (n = 10), *Aeromonas* spp. (n = 10) e *Escherichia coli* (n = 10). Tests were carried out for minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) determined by broth microdilution technique. It was not possible to assess the results of the MIC, which was attributed to the oil used, because it showed staining difficult blurred the distinction between the oil and bacterial growth. Regarding the results of CBM, it was observed that the best antimicrobial activity of essential oil happened to the concentrations of 17.2 and 34.4 µg/mL, with no influence of methanol on the results. The essential oil valued has antimicrobial activity against micro-organisms tested. In addition, because it is a natural product leaves no residue harmful to food.

**Keywords:** additives; Food Industry ; Microbiology; Medicinal plants.

---

\* Autor para correspondência. E-mail: jorge\_messias@ymail.com.

## INTRODUÇÃO

Durante o processo de preparo de alimentos constata-se a necessidade de adição de especiarias e seus derivados, entre esses têm-se, os óleos essenciais (OEs), os quais conferem aos alimentos características sensoriais, como sabor e aroma (Kim et al., 1995). No entanto, Lima (2002) afirma que, muitas dessas especiarias possam apresentar potencial sobre a estabilidade frente à ação de alguns micro-organismos, possibilitando a depreciação e comprometimento da qualidade e segurança alimentar.

Segundo Simões & Spitzer (2000), os OEs provenientes de espécies vegetais utilizadas como condimentos, representam grupo de antimicrobianos naturais tradicionalmente utilizados na produção de alimentos. Ressalta-se ainda que, os OEs podem apresentar atividade antimicrobiana, em especial, frente a micro-organismos resistentes a antibióticos e antifúngicos (Carson et al., 1995).

A ação antimicrobiana das especiarias e de seus OEs nos diferentes micro-organismos tem sido relatada em diversos estudos, principalmente devido ao aumento da resistência que os micro-organismos apresentam em relação aos antibióticos de uso comum utilizados nos tratamentos de diversas enfermidades (Ouattara et al., 1997).

Nesse sentido, alguns trabalhos reportam o potencial antimicrobiano significativo dos OEs frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos (Kalemba et al., 2002; Burt, 2004; Santurio et al., 2007; Mayaud et al., 2008), corroborando desta forma, o potencial uso dos OEs na inibição de cepas desses micro-organismos, garantindo menor contaminação dos alimentos associado à incrementos na segurança alimentar (Fiorentini et al., 2001; Ristori et al., 2002; Utama et al., 2002; Prashar et al., 2003).

Desta forma, objetivou-se avaliar a ação antibacteriana de mistura de óleos essenciais de especiarias composto por orégano, pimenta e alecrim frente a algumas cepas bacterianas patogênicas e/ou deteriorantes de alimentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, localizado no *campus* de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf, município de Petrolina-PE, Brasil.

Foram utilizados 30 isolados bacterianos, constituído de 10 isolados de *Staphylococcus* spp., 10 de *Aeromonas* spp. e 10 de *Escherichia coli*.

O óleo essencial avaliado foi elaborado a partir de uma mistura de alecrim, orégano e pimenta (1:1:1). Foram utilizados dois gramas da mistura diluída em 20 mL de metanol, obtendo-se desta forma o óleo essencial como produto final. O mesmo apresentava a seguinte composição: gordura vegetal estabilizada (89,7%), óleo essencial de orégano, óleo essencial alecrim e óleo essencial de pimenta.

Para avaliação antibacteriana do óleo essencial frente aos isolados supracitados, procedeu-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. Nesse sentido, as amostras foram semeadas em meio de cultura TSA (Tryptone Soy Agar) e, após seu crescimento, foram inoculadas em tubos contendo 3 mL de meio caldo Mueller Hinton (caldo MH). Em seguida, os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas de acordo com CLSI (2006) até a obtenção de turvação a 0,5 na escala de Mac Farland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL).

Após a turvação, 0,1 ml da suspensão (MH + inóculo), foram inoculadas em tubos contendo 9,9 mL de caldo MH (NCCLS, 2002). Logo após, procedeu-se a microdiluição, sendo adicionados 200 µl de caldo MH puro e estéril em cada poço da microplaca, procedendo-se logo posteriormente a diluição do óleo essencial, inserindo 200 µl do óleo nos poços da primeira coluna transferindo-se, posteriormente, 200 µl dos poços da primeira coluna para os da segunda, e assim sucessivamente seguindo-se uma diluição de 1:2 e descartando-se os últimos 200 µl. Todo o procedimento foi realizado em triplicata com oito diluições, obtendo as concentrações finais de: 90; 45; 137,5; 68,8; 34,4; 17,2; 8,6 e 4,3 µg/ml.

Em seguida inoculou-se 10 µl de caldo MH contendo os micro-organismos em cada poço, além de separar poços contendo controles positivo e negativo. Também foi realizado o teste apenas com o metanol para avaliar sua influência, ou não, na inibição do crescimento dos micro-organismos. Após esses procedimentos, as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

A determinação das CIM consistiu em registrar a menor concentração do óleo essencial capaz de causar inibição total do crescimento bacteriano.

Além da determinação da CIM, procedeu-se a realização da Concentração Bacteriana Mínima (CBM), sendo após um período de 24 horas da inoculação nas microplacas, inoculou-se o conteúdo de cada poço em placas de petri, contendo meio Ágar Mueller Hinton (MH), para que em seguida, as placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37 °C. A menor concentração onde não foi

observado crescimento bacteriano no ágar foi considerada a Concentração Bactericida Mínima (CBM), seguindo metodologias de Lennette et al. (1985).

## RESULTADOS

O óleo essencial composto por alecrim, orégano e pimenta obtido a partir de diluição em metanol

adquiriu coloração turva, portanto não foi possível analisar a CIM nas microplacas para o crescimento bacteriano nas diferentes diluições (Tabela 1). Dessa forma, procedeu-se a avaliação da CBM, sendo constatado que os isolados bacterianos analisados demonstraram susceptibilidade variável frente ao metanol bem como às concentrações do óleo essencial testado (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do óleo essencial e metanol frente aos isolados de *Staphylococcus* spp., *Aeromonas* spp. e *E. coli* testados.

Atividade antimicrobiana – Óleo essencial									
Microrganismos	n	CBM (µg/ml)							
		550	275	137,5	68,8	34,4	17,2	8,6	4,3
<i>Staphylococcus</i> spp.	10	-	-	-	-	2	6	-	2
<i>Aeromonas</i> spp.	10	-	-	-	2	8	-	-	-
<i>E. coli</i>	10	-	-	-	-	1	9	-	-

  

Atividade antimicrobiana – Metanol									
Microrganismos	n	CBM (µg/ml)							
		550	275	137,5	68,8	34,4	17,2	8,6	4,3
<i>Staphylococcus</i> spp.	10	4	2	4	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas</i> spp.	10	1	2	7	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	10	2	1	7	-	-	-	-	-

Para a análise da sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp., foram testadas três amostras multirresistentes, identificadas como MRSA, ATCC 6538 e ATCC 25923, sendo que, as três apresentaram atividade para o óleo essencial na concentração de 34,4 µg/mL, demonstrando desta forma, atividade de 100 % para as amostras analisadas. Com isso, o óleo essencial apresentou atividade antimicrobiana sobre as cepas clínicas de MRSA e ATCC.

Com relação à sensibilidade para os 10 isolados dessa mesma espécie, nas oito diluições realizadas para o óleo essencial, a CBM obtida para seis (60 %) isolados foi 17,2 µg/ml. Por outro lado, as concentrações obtidas no menor número de isolados foram de 34,4 e 4,3 µg/ml com dois (20 %) isolados para cada uma dessas concentrações.

Em relação à sensibilidade para o metanol, quatro (40 %) isolados demonstraram sensibilidade à concentração de 137,5 µg/ml, por outro lado, também foi verificado que quatro (40 %) isolados não apresentaram sensibilidade ao metanol. Dessa forma, o crescimento de isolados na maior concentração indica que não houve efeito da substância testada.

Para os isolados de *E. coli*, a CBM do óleo essencial obtida para nove (90 %) isolados foi 17,2 µg/ml. Apenas um isolado (10 %) apresentou sensibilidade na concentração de 34,4 µg/ml. Enquanto que para o metanol, foi observada sensibilidade em sete (70 %) isolados na

concentração de 137,5 µg/ml, sendo que dois (20 %) isolados não exibiram sensibilidade ao metanol.

Para os isolados de *Aeromonas* spp., a CBM obtida foi de 34,4 µg/ml para oito (80 %) isolados. Apenas dois (20 %) isolados apresentaram sensibilidade na concentração de 68,8 µg/ml. Com relação ao metanol, sete (70 %) isolados apresentaram sensibilidade na concentração de 137,5 µg/ml, sendo que apenas um (10 %) isolado não conferiu sensibilidade ao metanol.

## DISCUSSÕES

Analisando os resultados para o óleo essencial e o metanol avaliado, observa-se que, o primeiro não sofreu influência do metanol, pois no teste controle, o metanol foi menos efetivo que o óleo essencial, pois inibiu o crescimento bacteriano em uma concentração maior que o antimicrobiano natural.

Constataram-se atividades variáveis entre as diluições analisadas. Segundo Martins et al. (1998) e Ferreira et al. (2006) esse fato pode ocorrer devido ao agravamento da resistência bacteriana que está associada ao uso frequente e indiscriminado de antimicrobianos, bem como através de alterações na parede celular por meio da presença de genes que expressam resistência a múltiplos antimicrobianos. Sendo assim, no presente estudo, as atividades variáveis das diferentes diluições podem ter ocorrido em função da susceptibilidade dos isolados avaliados.

Além disso, foi observado que as bactérias Gram negativas não apresentaram sensibilidade nas duas menores concentrações testadas. Porte & Godoy (2001) e Hentz & Santim (2007) reportam que esse grupo de bactérias são menos sensíveis aos óleos essenciais presentes em “condimentos” em relação as bactérias Gram positivas, corroborando com o presente estudo.

Santoyo et al. (2005) avaliando a atividade antimicrobiana do óleo essencial composto apenas de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), relatam um grande potencial desses sobre as bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e bactérias Gram negativas (*E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Porém, em trabalho realizado por Trajano et al. (2009) o óleo essencial de alecrim avaliado só foi ativo contra bactérias Gram positivas (*Bacillus subtilis*).

Stoyanova et al. (2006) demonstraram uma atividade antimicrobiana significativa dos óleos essenciais de pimenta preta (*Piper nigrum*) e gengibre (*Zingiber officinalis*) contra as bactérias Gram positivas. Além disso, também observaram um efeito do óleo essencial de gengibre contra *Klebsiella pneumoniae*. Entretanto, Trajano et al. (2009) demonstraram que o óleo essencial de pimenta preta só não foi ativo contra bactérias Gram positivas, enquanto o óleo essencial de gengibre foi ativo apenas contra *S. aureus*.

Ohno et al. (2003), afirma que é necessário examinar cada componente do óleo essencial separadamente, bem como a sua combinação, para averiguar se eles realmente apresentam ação bactericida isolados ou em combinação.

A grande incidência de infecções causadas por bactérias de alimentos, principalmente as de maior patogenicidade aumenta a importância da procura por compostos terapêuticos alternativos. Em função disso, o estudo das plantas medicinais está sendo bastante desenvolvido, comprovando as qualidades medicinais das mesmas, sendo que, essas vêm ganhando um maior espaço nas prateleiras de farmácias e casas especializadas do mundo inteiro, mostrando ter propriedades úteis, porém, ainda pouco exploradas, representando um importante fator na melhoria da saúde pública.

## CONCLUSÕES

O óleo essencial provindo da mistura de orégano, pimenta e alecrim apresentam atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados. Além disso, por se tratar de um produto natural não deixa resíduos prejudiciais aos alimentos.

Como perspectiva futura, sugere-se a realização de estudos com óleos essenciais isolados individualmente de cada especiaria testada no presente trabalho. Nesse sentido, possibilita-se a ampliação do conhecimento da atividade antimicrobiana dessas especiarias em combinação ou isoladamente para as cepas bacterianas analisadas.

## REFERÊNCIAS

- Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, n.03, p.223-253, 2004.
- Carson, C.F.; Riley, T.V. Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Bacteriology*, v.78, n.03, p.264–269, 1995.
- CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standards*. Document CLSI M7-A7, CLSI, Wayne, Pennsylvania. 2006.
- Ferreira, L.M.; Nader Filho, A.; Oliveira, E.; Zafalon, L.F.; Souza, V. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de caso de mastite subclínica bovina. *Ciência Rural*, v.36, n.4, p.1228-1234, 2006.
- Fiorentini, A.M.; Sant’Anna, E.S.; Porto, A.C.S.; Mazo, J.Z.; Franco, B.D.G.M. Influence of bacteriocins produced by *Lactococcus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.32, n.1, p.42-46, 2001.
- Hentz, S.M.; Santim, N.C. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. *Evidência*, v.7, n.02, p.93-100, 2007.
- Kalemba, D.; Kusewicz, D.; Świąder, K. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai. *Phytotherapy Research*, v.16, n.3, p.288-291, 2002.
- Kim, J.M.; Marshall, M.R.; Cornell, J.A.; Preston, J.F.P.; Wei, C.I. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against salmonella typhimurium in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*, v.60, n.6, p.1364-1368, 1995.
- Lennette, E. H.; Balows, A.; Hausler, W. J.; Shadomy, H. J. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1985.
- Lima, E.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. p. 482-501. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. *Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Agros. 2002.
- Martins, S.C.S.; Albuquerque, L.M.B.; Matos, J.H.G.; Martins Neto, J. Isolamento e caracterização de bactérias e diferentes ambientes hospitalares. Perfil da sensibilidade a quimioterápicos. *Higiene Alimentar*, v.12, n.56, p.45-48, 1998.
- Mayaud, L.; Carricajo, A.; Zhiri, A.; Aubert, G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*, v.47, n.03, p.167-173, 2008.
- NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne: NCCLS, 2002. p.133.

- Ouattara, B.; Simard, R.E.; Holley, R.A.; Piette, G.J.P.; Bégim, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, v.37, n.2-3, p.155-162, 1997.
- Ohno, T.; Kita, M.; Yamaoka, Y.; Imamura, S.; Yamamoto, T.; Mitsufuji, S.; Kodama, T.; Kashima, K.; Imanishi, J. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, v.8, n.03, p.207-215, 2003.
- Porte, A.; Godoy, R.L.O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v.19, n.02, p.193-210, 2001.
- Prashar, A.; Hili, P.; Veness, R.G.; Evans, C.S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, v.63, n.05, p.569-575, 2003.
- Ristori, C.A.; Pereira, M.A.S.; Gelli, D.S. The effect in vitro of ground black pepper on contamination with *Salmonella rubislaw*. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.62, n.02, p.131-133, 2002.
- Simões, C.M.O.; Spitzer, V. Óleos voláteis. In: Simões, C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000. Cap.18.
- Santoyo, S.; Cavero, S.; Jaime, L.; Ibañez, E.; Señoráns, F.J.; Reglero, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *rosmarinus officinalis* l. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, v.68, n.04, p.790-795, 2005.
- Santurio, J.M.; Santúrio, D.F.; Pozzatti, P.; Moraes, C.; Franchim, P.R.; Alves, S.H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. *Ciência Rural*, v.37, n.03, p.803-808, 2007.
- Stoyanova, A.; Z, Denkova.; Nenov, A.; Slavchev, A.; Jirovetz, J.; Buchbauer, J.; Lien, H.N.; Schmidt, E.; Geissler, M. C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>F<sub>4</sub>-SCFE-oleoresins of black pepper (*Piper nigrum* L.) and ginger (*Zingiber officinale* (L.) Rosc.) from Vietnam: Antimicrobial testings, gas chromatographic analysis and olfactoric evaluation. *EJEACHE*, v.5, n.5, p.1615-1623, 2006.
- 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.03, p.542-545, 2009.
- Utama, I.M.; Wills, R.B.; Ben-Yehoshua, S.; Kuek, C. *In vitro* efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetal decay microorganisms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.50, n.22, p.6371-6377, 2002.