

## ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Allium sativum* L. CONTRA *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*

LETÍCIA KLEIN SCHEIK<sup>1</sup>; BRUNA WENDT BOHMER<sup>2</sup>; MARCELLE OLIVEIRA GARCIA<sup>2</sup>; GABRIEL OLLÉ DALMAZO<sup>2</sup>; LEONARDO NORA<sup>2</sup>; WLADIMIR PADILHA DA SILVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – leticiascheik@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – bruna\_bohmer@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – marcelle\_garcia@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – gdalmazo@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – l.nora@me.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – wladimir@pq.cnpq.br

### 1. INTRODUÇÃO

Devido à crescente demanda por alimentos livres de aditivos e antimicrobianos sintéticos e que, mesmo assim, sejam considerados seguros ao consumidor, torna-se necessária a busca por substâncias naturais que em determinadas concentrações, assegurem a inocuidade do produto final. Concomitantemente, a substância natural adicionada ao alimento não deve modificar as características sensoriais originais do produto final, a menos que essa alteração seja desejável, como é o caso da adição de condimentos e especiarias, que além de realçarem o sabor, também possuem princípios ativos voláteis conhecidos como óleos essenciais, que apresentam ação antimicrobiana (MALLET, 2011).

Óleos essenciais (OE) são produtos obtidos de partes de plantas (flores, folhas, raízes, frutos, sementes, entre outros) mediante destilação por arraste de vapor ou hidrodestilação, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (ISO, 1997). São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, em concentrações que variam de acordo com a localização do OE na planta, as quais também são influenciadas pela época da colheita, das condições climáticas e do solo (MALLET, 2011).

A atividade antimicrobiana do OE vai depender do tipo, composição, concentração, processamento e das condições de estocagem do produto, bem como das características dos micro-organismos testados (BERTINI et al., 2005). Diversos estudos têm analisado a ação antimicrobiana de OE de condimentos como orégano, alecrim, açafrão, alho, manjericão, pimenta, tomilho, entre outros (MALLET, 2001).

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria que apresenta forma esférica (coco) Gram-positiva, anaeróbia facultativa, presente no ambiente e alimentos, sendo os humanos e os animais seus principais reservatórios. Este patógeno produz uma grande variedade de fatores de virulência, como as enterotoxinas, que são as principais causadoras de intoxicação alimentar estafilocócica (Forsythe, 2002).

*Escherichia coli* é um bastonete Gram-negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo, que habita naturalmente o trato gastrointestinal de humanos e animais. As linhagens patogênicas de *E. coli* são divididas em seis patotipos de acordo com os sintomas clínicos e com os mecanismos de patogenicidade. Destes patotipos, pode-se destacar *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que pode causar diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, entre outros sintomas (Forsythe, 2002). *Escherichia coli* O157:H7 é o sorotipo mais importante pertencente ao patotipo EHEC, e é transmitida ao homem, principalmente, através

do consumo de alimentos contaminados, tais como carne moída crua ou mal cozida e leite cru (WHO, 2011).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial extraído de alho (*Allium sativum* L.), contra *S. aureus* e *E. coli* O157:H7.

## 2. METODOLOGIA

O OE de alho foi extraído de folhas escamiformes (*dentes de alho*) por hidrodestilação durante 2 h em equipamento Clevenger. Em seguida, a fase oleosa foi retirada e armazenada sob refrigeração. Foram utilizadas as cepas *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* O157:H7 NCTC 12900, pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas. A avaliação da atividade antibacteriana do OE foi realizada através da técnica de difusão em ágar, preparando-se os inóculos de cada bactéria a ser testada em solução salina 0,85%, de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland ( $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), os quais foram semeados em superfícies de placas de Petri contendo ágar Muller Hinton (MH). Posteriormente, 2 µL de OE foram inoculados em discos de papel filtro esterilizados, com 6 mm de diâmetro e, após a secagem dos discos, esses foram colocados sobre as placas contendo MH, as quais foram incubadas a 37 °C por 24 h. Para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM), utilizou-se a técnica de micro-diluição, seguindo as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), com modificações. Adicionou-se caldo Brain Heart Infusion contendo 1% de Tween 80 (agente emulsificante) nas cavidades de microplacas e, após, foram adicionadas concentrações de OE de alho variando de 1% a 10%, juntamente com os inóculos bacterianos. Também foram incluídos controles positivo e negativo. As microplacas foram incubadas a 37 °C, e a densidade óptica à 630 nm (DO<sub>630</sub>) foi medida nos tempos 0 h, 24 h e 48 h de incubação em espectrofotômetro modelo Spectra Max 190 (Molecular Devices®), sendo a atividade antibacteriana avaliada como a diferença entre a DO<sub>630</sub> no fim (48 h) e no início (0 h) do período de incubação. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de restringir a multiplicação bacteriana para um nível mais baixo do que 0,07 de DO<sub>630</sub>. A partir dos resultados da CIM, realizou-se a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), definida como a menor concentração do OE capaz de inibir 99,9% do inóculo bacteriano. As concentrações que atingiram a CIM foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Brain Heart Infusion, e incubadas a 37°C por 24h. Os ensaios de difusão em ágar foram realizados em triplicata e os da CIM e CBM em duplicata.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste da difusão em ágar, a cepa de *S. aureus* utilizada neste estudo demonstrou resistência ao OE de alho testado, enquanto *E. coli* O157:H7 mostrou sensibilidade ao OE (Figura 1). Estes resultados são diferentes dos obtidos por SANTOS et al. (2011) que, utilizando a mesma técnica, observaram que o óleo essencial de alho não inibiu cepas ATCC e nem isolados de *E. coli*.



Figura 1. Atividade antibacteriana de óleo essencial de alho contra *S. aureus* (esquerda) e *E. coli* (direita) pelo método de ágar difusão

Os valores da zona de inibição obtidos no teste de difusão em ágar condizem com os resultados encontrados no teste da CIM e CBM, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação da atividade antimicrobiana de óleo essencial de alho contra *S. aureus* e *E. coli* por difusão em ágar, Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

| Bactéria         | Difusão em ágar | CIM | CBM             |
|------------------|-----------------|-----|-----------------|
| <i>S. aureus</i> | NI*             | 4%  | Bacteriostático |
| <i>E. coli</i>   | 10 mm           | 3%  | Bactericida     |

\*NI: não apresentou halo de inibição; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima.

O resultado de atividade do OE de alho contra *E. coli* (Tabela 1) mostra-se promissor, tendo em vista que outros autores, como INDU et al. (2006), relataram que o OE dessa planta apresentou atividade antibacteriana excelente contra diferentes isolados de *E. coli* em todas as concentrações acima de 25% que foram testadas.

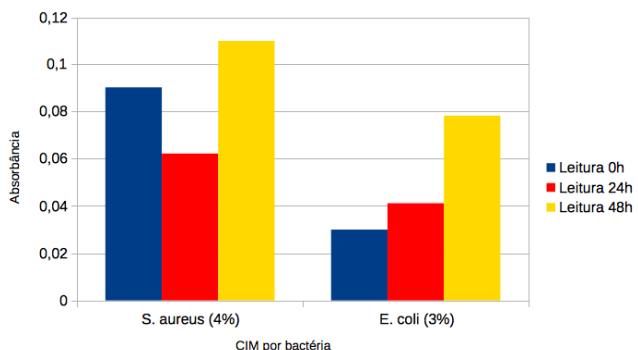


Figura 2. Média das absorbâncias das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) por bactéria nos três períodos de leitura

A lipofilicidade dos OE permite a sua passagem através da parede celular e membrana citoplasmática das bactérias, rompendo a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos, degradando-os e alterando a permeabilidade. Portanto, a atividade antibacteriana do OE de alho sobre a bactéria Gram-negativa testada neste trabalho pode ser devida a capacidade desses compostos hidrofóbicos de chegarem ao citoplasma dessas bactérias, passando pelos poros de proteínas presentes em sua membrana externa. Segundo BURT (2004), geralmente os OE são mais ativos contra bactérias Gram-positivas do que contra bactérias Gram-negativas, diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho, bem como por USHIMARU et

al. (2007) que, ao estudarem a ação antimicrobiana dos extratos metanólicos de cravo-da-índia e alho em bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *Salmonella* spp.) e Gram-positivas (*S. aureus* e *Enterococcus* sp.), verificaram que o extrato metanólico de cravo-da-índia foi mais eficaz para Gram-positivas e o extrato metanólico de alho, mais eficaz contra as Gram-negativas.

#### 4. CONCLUSÕES

O OE de alho testado tem atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* O157:H7, embora seja mais eficaz contra *E. coli* O157:H7, demonstrando potencial de utilização como bioconservantes em alimentos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTINI, L.M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L de L. 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.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Holanda, v. 94, n. 3, p. 223-253, ago. 2004.
- CLINICAL ANDLABORATORY STANDARDS INSTITUTE –CLSI, 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically.Vol.32, 9th ed., **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne.
- FORSYTHE, S. J. - **Microbiologia da Segurança Alimentar** – Porto Alegre: ARTMED, 2002.
- INDU, M. N.; HATHA, A. A. M.; ABIROSH, C.; HARSHA, U.; VIVEKANANDAN, G. Antimicrobial activity of some of the South-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 153- 158, apr./jun. 2006.
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. ISO 9235: Aromatic Natural raw materials – Vocabulary. Genebra. 1997.
- MALLET, A. C. T. **Utilização de óleos essenciais de condimentos na conservação de queijos tipo Quark**. 2011. 132p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2011.
- SANTOS, J.C., CARVALHO FILHO, C.D., BARROS, T.F., GUIMARÃES, A.G.. Atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão contra bactérias patogênicas isoladas do vângole. Semina: **Ciências Agrárias**, v: 32, n:4, p.1557-1564, 2011.
- USHIMARU, P. K.; SILVA, M. T. N.; DI, S. C.; BARBOSA, L.; FERNANDES JUNIOR, A. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 717-719, oct./dec. 2007.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2011. *Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC)*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>> Acesso em: 27 jul. 2016.