

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* (ORÉGANO) E *Ocimum basilicum* (MANJERICÃO) E SUA APLICAÇÃO EM MASSA CÁRNEA PARA EMBUTIDOS

GREYCE SILVEIRA MELLO¹; PATRÍCIA GOMES VIVIAN²
REBECA CAMARGO PORTO³; ELIEZER ÁVILA GANDRA⁴; CLÁUDIO DIAS
TIMM⁵

¹UFPEL-greycemello@gmail.com

²UFPEL-patigvivian@yahoo.com

³UFPEL-rebeca_porto@outlook.com

⁴UFPEL-gandraea@hotmail.com

⁵UFPEL-claudiotimm@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O número de consumidores que exigem alimentos com menor adição de conservantes químicos vem crescendo nos últimos anos e a indústria de alimentos tem interesse em agentes antimicrobianos naturais que possam prolongar a vida de prateleira dos produtos e combater microrganismos patogênicos (CALO et al., 2015). Assim, a literatura científica na área da ciência e tecnologia de alimentos tem mostrado um enfoque no estudo do potencial antimicrobiano das especiarias, considerando a sua inclusão nos sistemas de bioconservação de alimentos.

Os óleos essenciais de especiarias, através da combinação de sabor e aroma, são amplamente aceitos pelo consumidor (AYALA-ZAVALA et al., 2009), sendo referidos como um procedimento natural capaz de prover a extensão da vida útil e satisfatória segurança microbiológica de alimentos (FIORENTINI et al., 2001).

Os óleos extraídos de *Origanum vulgare* e *Ocimum basilicum* têm potencial antimicrobiano (SANTURIO, 2015). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade desses óleos essenciais frente à *Salmonella* e testar sua aplicação em massa cárnea para embutidos.

2. METODOLOGIA

Foram adquiridas folhas secas de *O. vulgare* e *O. basilicum* provenientes da empresa Luar Sul Indústria e Comércio, de Santa Cruz do Sul, Brasil. Para extração dos óleos essenciais, utilizou-se o processo de hidrodestilação com aparelho Clevenger, por 3 horas, segundo a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010). Após a extração, os óleos foram armazenados em frasco âmbar e mantidos a -18°C.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *O. vulgare* e de *O. basilicum* foi testada frente à *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Typhimurium (ATCC 13311) e Enteritidis (ATCC 13076). Culturas *overnight* a 37°C em Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia, Lansing, Michigan, USA) de cada cepa foram padronizadas para concentração aproximada de 10⁸ UFC/mL para posterior diluição seriada e uso nos testes.

Para a avaliação do efeito antimicrobiano foi utilizado o método de disco-difusão, de acordo com Caravic-Stanko et al. (2009). Também foi determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM), conforme preconizado pelo Clinical and

Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), com pequenas modificações. Foi realizada utilizando microplacas com 96 poços. Em cada poço, foram dispensados 50 µL de BHI com 1% de Tween 80. No primeiro poço, foram dispensados 50 µL do óleo essencial em teste. Retirando-se 50 µL do poço de maior concentração, foram feitas oito diluições seriadas nos poços consecutivos até a concentração final, de 1,95 µL/mL. No final, foram adicionados 50 µL da cultura *overnight* a 37°C em Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia, Lansing, Michigan, USA) com aproximadamente $5,0 \times 10^3$ células bacterianas em cada um dos poços. Poços sem adição do óleo e sem adição do inóculo foram utilizados para controles de multiplicação e de esterilidade, respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 h.

Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 5 µL de cada uma das cavidades e repicadas em placas de PCA. A ausência de crescimento bacteriano no meio de cultivo foi indício de que o óleo essencial testado não apresentou atividade bactericida. A CBM foi considerada como a menor concentração de óleo na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para teste da aplicação o produto, foram preparadas e pesadas amostras de 25g de massa cárnea, adicionadas de 0,5% de cloreto de sódio e homogeneizadas. Foram adicionados os óleos (*O. vulgare* e mistura em quantidades iguais de *O. vulgare* e *O. basilicum*) nas concentrações 0,5%, 1,0% e 1,5%. Como controles, alíquotas sem adição de óleo e sem adição de cultura também foram analisadas.

A massa cárnea foi experimentalmente contaminada com *Salmonella* sorotipos Typhimurium (ATCC 13311) e Enteritidis (ATCC 13076). Inóculos de diluições seriadas das culturas bacterianas foram preparados e adicionados na massa cárnea de forma a se obter a concentração final de 10^2 células bacterianas por grama de massa. Como controle, a massa não contaminada experimentalmente também foi analisada.

As alíquotas de massa cárnea contaminadas experimentalmente e os controles foram armazenados a 4°C e analisados após 0, 24, 48 e 72 horas. A pesquisa de *Salmonella* foi realizada de acordo com U.S. Food and Drug Administration – FDA (ANDREWS et al., 2016).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de disco-difusão, os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis em diferentes intensidades (Tabela 1).

Tabela 1 - Tamanho dos halos (mm) de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, detectada no teste de disco-difusão

Sorotipo	<i>O. vulgare</i>	<i>O. basilicum</i>	<i>O. vulgare</i> + <i>O. basilicum</i>
Typhimurium	12,6a	7,4b	9,4ab
Enteritidis	9,0b	6,8c	12,0a

Os dados referem-se à média de triplicatas. Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

O. vulgare apresentou atividade antimicrobiana mais intensa quando comparada com os halos de inibição do óleo essencial de *O. basilicum*, indicando

baixa ação antimicrobiana do *O. basilicum*. Quando analisado o efeito antimicrobiano da mistura dos dois óleos essenciais, nota-se que pode ter ocorrido efeito sinérgico, pois a mistura dos óleos frente à *Salmonella* Enteritidis induziu a formação de halos maiores que os halos de qualquer um deles individualmente. Também Barbosa et al. (2016), em um dos raros estudos utilizando mistura de óleos, verificaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* misturado com óleo de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) pelo teste de disco-difusão e observaram interação sinérgica frente a agentes patogênicos como *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella* Enteritidis.

Os resultados da CBM (Tabela 2) relativos a *O. basilicum* estão de acordo com os resultados obtidos nos testes de disco-difusão, nos quais esse óleo essencial apresentou fraco efeito inibitório.

Tabela 1 - Concentração bactericida mínima ($\mu\text{L/mL}$) dos óleos essenciais de *O. vulgare*, de *O. basilicum* e da mistura dos dois óleos

Sorotipo	<i>O. vulgare</i>	<i>O. basilicum</i>	<i>O. vulgare</i> + <i>O. basilicum</i>
Typhimurium	31,25	SE*	31,25
Enteritidis	15,5	250	31,25

Os testes foram realizados em triplicata e os valores foram os mesmos nas três repetições.

* SE = sem efeito antimicrobiano.

O óleo de *O. vulgare* foi efetivo contra *Salmonella* Enteritidis em concentrações relativamente baixas. O efeito inibitório deste óleo, na disco-difusão, foi menor do que o da mistura dos óleos, entretanto, na CBM, a mistura necessitou de concentrações mais elevadas do que o óleo de *O. vulgare* isoladamente para exercer seu efeito bactericida sobre *Salmonella* Enteritidis. Estes resultados indicam que o efeito sinérgico verificado no teste de disco-difusão frente a *Salmonella* Enteritidis não foi observado na CBM e que o efeito inibitório observado na disco-difusão não tem relação direta com o efeito bactericida determinado pela CBM.

Na aplicação da massa cárnea, o óleo essencial de *O. vulgare*, na concentração de 1,5%, apresentou efeito bactericida sobre ambos os sorotipos do microrganismo. Entretanto, esse mesmo óleo, quando misturado em quantidades iguais ao óleo de *O. basilicum*, perdeu seu efeito bactericida sobre o sorotipo Typhimurium. Por outro lado, o mesmo não ocorreu em relação à *Salmonella* Enteritidis, que não foi recuperada do alimento experimentalmente contaminado tanto quando misturado ao óleo de *O. vulgare* a 1,5% como quando adicionado da mistura dos óleos a 1,5%, mas foi recuperada do alimento com óleo de *O. vulgare* a 1%, mesmo após 72 horas de armazenamento. Estes resultados sugerem a ocorrência de sinergismo entre os dois óleos, o que também foi observado nos testes de disco-difusão e CBM.

4. CONCLUSÕES

O óleo essencial de *O. vulgare* apresenta atividade antimicrobiana contra os sorotipos Typhimurium e Enteritidis de *Salmonella*. Esta atividade é amplificada, frente à *Salmonella* Typhimurium, quando misturado em quantidades iguais de óleo essencial de *O. basilicum*, o qual isoladamente apresenta pouca ação antimicrobiana.

O óleo essencial de *O. vulgare* tem CBM relativamente baixa para *Salmonella* Enteritidis. Já o óleo essencial de *O. basilicum* mostrou ser um fraco antimicrobiano. O óleo essencial de *O. vulgare* e a mistura dos óleos essenciais quando adicionados na massa cárnea na concentração de 1,5% são capazes de eliminar *Salmonella* Enteritidis do produto. Porém a eliminação de *Salmonella* Typhimurium somente é obtida quando o óleo essencial de *O. vulgare* é aplicado isoladamente nas mesmas concentrações.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, W.H; WANG, H; JACOBSON, A; HAMMACK, T. **Salmonella**. U.S. Food and Drug Administration. Microbiological Methods & Bacteriological Analytical Manual (BAM). 2016. Acesso em 10/08/17. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070149.htm>

AYALA-ZAVALA, J.F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A.; DEL-TORO-SÁNCHEZ, L. Enhancing safety and aroma appealing of fresh-cut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils. **Journal Food Science**, Chicago, v. 74, n. 7, p. 84-91, 2009.

BARBOSA. M. I.; MEDEIROS, C. A. J.; OLIVEIRA, R. A. K.; NETO, G. J. N.; TAVARES, F. J.; MAGNANI, M.; SOUZA, L. E. Efficacy of the combined applization of Orégano and Rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables. **Food Control**, v. 59, p. 468-477, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, v. 2 Brasília: Anvisa, 2010, 904p.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; CORLISS, A. O.; STEVEN C. R. Essential Oils as Antimicrobials in Food Systemas- A Review, **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CARAVIC-STANKO, K.; ORLIC, S.; POLITEO, O.; STRIKIC, F; KOLAK, I.; MILOS, M.; SATOVIC, Z. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v. 119, p. 196-201, 2009.

CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. CLSI document M07-A9. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

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-lie of refrigerated bovine meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 42-46, 2001.

SANTURIO, F. D. **Uso de óleos essenciais de especiarias para controle de coliformes em linguagem toscana**. 2015, 62f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia em Alimentos) – Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.