

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* E *Ocimum basilicum* FRENTE A BACTÉRIAS PATOGENICAS

REBECA CAMARGO PORTO¹; PATRÍCIA GOMES VIVIAN²; GREYCE SILVEIRA MELLO³; ELIEZER GANDRA AVILA⁴; CLÁUDIO DIAS TIMM⁵

¹ Universidade Federal de Pelotas – rebecca_porto@outlook.com

² Universidade Federal de Pelotas – patigvivan@yahoo.com

³ Universidade Federal de Pelotas – greycemello@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – gandraea@hotmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas - timm@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, as doenças relacionadas à ingestão de alimentos contaminados com agentes microbianos vêm se tornando a principal preocupação sobre segurança dos alimentos, uma vez que a presença de patógenos no alimento pode levar a surtos de toxinfecções. (GODINHO, 2010). Os microrganismos comumente envolvidos são *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, dentre outros, sendo os alimentos mais envolvidos nestes surtos os provenientes de animais, produtos derivados e alimentos altamente manipulados (RIBEIRO, 2011).

O número de consumidores que exigem alimentos com menor adição de conservantes sintéticos vem crescendo e, conseqüentemente, vem aumentando o interesse das indústrias em agentes antimicrobianos naturais que possam prolongar a vida de prateleira e combater patógenos (CALO et al., 2015). Os óleos essenciais, que são normalmente utilizados como aromatizantes vêm sendo utilizados também por suas propriedades antimicrobianas para controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes (BAJPAI et al., 2012).

Origanum vulgare (orégano) e *Ocimum basilicum* (manjerição) são temperos comumente utilizados para conferir sabor e aroma aos alimentos (KOKKINI e VOKOU, 1989). Ambos apresentam em sua composição timol, eugenol e carvacrol, constituintes que conferem potencial atividade antimicrobiana a estes condimentos (SANTURIO, 2015).

Portanto, o objetivo do trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Ocimum basilicum* (manjerição) frente à *Escherichia coli* O157: H7, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

2. METODOLOGIA

Folhas secas de *O. vulgare* e *O. basilicum* foram adquiridas na empresa Luar Sul Industria e Comércio, de Santa Cruz do Sul, Brasil. Para extração dos óleos essenciais, utilizou-se processo de hidrodestilação por arraste a vapor com um aparelho Clevenger, durante 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 foi testada frente aos seguintes microrganismos: *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644). 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 10^8 UFC/mL para posterior diluição seriada e uso nos testes. Utilizou-se o método de disco-difusão, de acordo com Caravic-Stanko et al. (2009) no qual 0,1 mL de cultura em BHI de cada isolado foi semeado na superfície de placas contendo ágar Mueller-Hinton (Acumedia, Lansing, Michigan, USA). Discos de papel filtro estéreis impregnados com os óleos essenciais e a mistura dos mesmos (5 µL por disco) foram depositados sobre o meio inoculado, que foi incubado a 37°C por 24 h. O diâmetro da zona de inibição, incluindo o diâmetro do disco, foi medido em milímetros. As médias dos halos obtidos no teste de disco-difusão foram comparadas pelo teste de Tukey com uso do programa Statistix® (2003).

Determinou-se também a Concentração Bactericida Mínima (CBM), conforme preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), com pequenas modificações. A determinação da CBM foi realizada utilizando microplacas com 96 poços. Em cada poço, foram dispensados 50 µL de BHI com 1% de Tween 80, utilizado para diminuir a tensão superficial no contato do óleo (apolar) com o meio de cultura (polar). 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, após a adição da cultura bacteriana, de 1,95 µL/mL. No final, foram adicionados 50 µL da cultura com aproximadamente $5,0 \times 10^3$ células bacterianas em cada poço. Poços sem adição do óleo e sem adição do inoculo 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 contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA, Acumedia, Lansing, Michigan, USA) para verificar a viabilidade das cepas. 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais avaliados no teste de disco-difusão produziram halos de inibição, indicando atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 em diferentes intensidades (Tabela 1).

O. vulgare apresentou atividade antimicrobiana mais intensa. Já os halos de inibição do óleo essencial de *O. basilicum*, apresentaram diâmetro inferior, indicando baixa ação antimicrobiana.

Tabela 1 - Tamanho dos halos (mm) de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.

Microrganismo	<i>O. vulgare</i>	<i>O. basilicum</i>	<i>O. vulgare</i> + <i>O. basilicum</i>
<i>S. aureus</i>	12,0 a	7,0 b	11,4 a
<i>L. monocytogenes</i>	9,5 a	7,5 b	7,75 ab
<i>E. coli</i> O157:H7	9,1 a	7,7 b	7,5 ab

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

Quando analisado o efeito antimicrobiano da mistura dos óleos essenciais, observou-se que houve duas situações em que a mistura apresentou ação diferente dos óleos separadamente. Frente a *S. aureus* a mistura manteve a mesma ação apresentada pelo óleo de *O. vulgare* isoladamente, apesar deste

óleo estar com a concentração pela metade. Isto significa que o óleo de *O. vulgare* mantém a mesma atividade inibitória tanto quando utilizados 5 µL (quantidade de óleo usada isoladamente) como 2,5 µL (quantidade de óleo na mistura) ou que houve um efeito sinérgico entre os óleos que permitiu a manutenção da ação inibitória mesmo com a metade da concentração de *O. vulgare*.

Um dos raros estudos utilizando mistura de óleos foi realizado por Barbosa et al. (2016), que verificaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* misturado com óleo de *R. Officinalis* (alecrim) pelo teste de disco-difusão. Neste estudo, os óleos demonstraram interação sinérgica e foram efetivos frente a agentes patogênicos como *L. monocytogenes* e *E. coli*.

O óleo essencial de *O. basilicum* não apresentou efeito bactericida nas concentrações testadas (*S. aureus*, *L. monocytogenes*) ou apresentou apenas em altas concentrações (*E.coli* O157:H7) (Tabela 2), o que está de acordo com os resultados obtidos nos testes de disco-difusão, nos quais este óleo apresentou fraco efeito inibitório. Resultados semelhantes ao nosso foram obtidos por Aquino et al. (2010), que também verificaram ação antimicrobiana do óleo de *O. basilicum* frente a *E. coli*.

Tabela 2 - Concentração bactericida mínima (µL/mL) dos óleos essenciais de *O. vulgare*, de *O. basilicum* e da mistura dos dois óleos

Microrganismo	<i>O. vulgare</i>	<i>O. basilicum</i>	<i>O. vulgare</i> + <i>O. basilicum</i>
<i>S. aureus</i>	125	SE*	62,5
<i>L. monocytogenes</i>	125	SE*	250
<i>E. coli</i> O157:H7	62,5	500	125

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

*SE = sem efeito antimicrobiano.

O óleo essencial de *O. vulgare* apresentou ação bactericida mais intensa quando comparado com o *O. basilicum*, corroborando mais uma vez com os resultados dos testes de disco-difusão. Quando utilizada a mistura dos dois óleos, não foi observada ação bactericida de *O. basilicum*, pois foi necessário o dobro da concentração da mistura, ou seja, a mesma concentração de *O. vulgare* usado isoladamente, para inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7. Provavelmente houve sinergismo entre os óleos quando testados frente às cepas de *S. aureus*, visto que o efeito bactericida foi observado com concentrações inferiores àquelas obtidas com uso isolado de *O. vulgare*.

4. CONCLUSÕES

O óleo essencial de *O. vulgare* apresenta atividade antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Esta atividade se mantém, em relação a *S. aureus*, quando misturado em quantidades iguais de óleo essencial de *O. Basilicum*.

O óleo essencial de *O. vulgare* é bactericida para todas as bactérias testadas. Já o óleo essencial de *O. basilicum* mostrou ser um fraco antimicrobiano, não apresentando efeito bactericida para maioria das bactérias testadas ou necessitando altas concentrações para eliminar os microrganismos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 manjeriço frente a bactérias de carnes bovinas. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara v. 21, n. 4, p. 529-535, 2010

BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734, 2012.

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 application 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 Systems- 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, 2010.

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.

GODINHO, V. M. Investigação de bactérias patogênicas por técnicas moleculares em um sistema de tratamento de esgotos compostos por reator UASB e lagoas de polimento. 2010. Dissertação (Mestrado em Saneamento) - Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2010.

KOKKINI, S.; VOKOU, D. Carvacrol-rich plants in Greece. **Flavour and fragrance journal**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 1989.

RIBEIRO, S. D. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) frente a bactérias isoladas de alimentos: Estudos in vitro e em matriz alimentícia. 103f. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal da Bahia. Bahia, 2011.

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