

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO FRENTE A ISOLADOS DE *Salmonella* spp. E *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVOS

MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA¹; ELISA ISQUIERDO DA LUZ²;
MARCELLE OLIVEIRA GARCIA³; JULIANA FERNANDES ROSA⁴; NATACHA
DEBONI CERESER⁵; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS DA CONCEIÇÃO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – maria.fernanda.fs97@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas– elisaisquierdo@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marcelle_garcia@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – ju_fernandes.r@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - natachacereser@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas– ritinhaconceicao@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais têm sido utilizados pela indústria de alimentos como conservantes naturais para prevenir a deterioração, aumentar a vida de prateleira de produtos e controlar o desenvolvimento de patógenos, visto que um grande problema de saúde pública são as doenças transmitidas por alimentos (SOLÓRZANO-SANTOS & MIRANDA-NOVALES, 2012). Óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal, obtidos por um processo físico como destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado (BRASIL, 2007). São aditivos antimicrobianos naturais e ricos em compostos biologicamente ativos, obtidos a partir de várias fontes vegetais.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido muito estudada e demonstrada contra vários microrganismos, principalmente *in vitro* (LÓPEZ et al., 2005; ROTA et al., 2008). Dentre os microrganismos patogênicos que podem estar presentes no produto final destacam-se *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. A contagem de *Staphylococcus* em alimentos pode ser feita com dois objetivos diferentes, um por ser uma indicação de perigo potencial à saúde pública, devido a enterotoxina estafilocócica e outro relacionado à sanificação questionável, principalmente quando o processamento envolve a manipulação de alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Vários fatores podem levar a contaminação do produto final. A ordenha constitui-se em uma etapa fundamental para a obtenção de um produto lácteo com qualidade, sendo que fatores relacionados a higiene dos tetos dos animais e dos equipamentos utilizados na ordenha podem levar a contaminação do leite (MIGUEL et al., 2012).

Diversos compostos naturais têm sido analisados quanto à atividade antimicrobiana, sendo o óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho branco) um deles. *Thymus vulgaris* L. é uma planta da família Lamiaceae que compreende 150 gêneros, com cerca de 2800 espécies distribuídas em todo mundo, sendo a região do Mediterrâneo o maior centro de dispersão. Muitas das espécies introduzidas no Brasil são plantas medicinais e produtoras de óleos essenciais, sendo utilizadas como condimentos ou como flores ornamentais (JAKIEMIU et al., 2010). Baseado no exposto, este trabalho teve por objetivo verificar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (Tomilho branco) frente a isolados de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivos.

2. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem animal da Universidade Federal de Pelotas (LIPOA/UFPel). Neste estudo foram utilizados cinco isolados de *Salmonella* spp., obtidos de linguças frescas, comercializadas na região de Pelotas e quinze isolados de *Staphylococcus* coagulase positivos obtidos de leite, equipamentos e utensílios envolvidos na ordenha. O óleo de *Thymus vulgaris* L. (tomilho branco) foi obtido comercialmente, em frasco âmbar, lacrados, com volume de 100 mL (Ferquima – Indústria e Comércio de Óleos Essenciais).

A suscetibilidade dos isolados ao óleo foi avaliada pelo método de disco-difusão de BAUER et al. (1966). Inicialmente, os isolados foram semeados em caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI, Acumedia) e incubados a 37°C/24 horas. Após incubação, a densidade ótica de cada cultivo bacteriano foi padronizada com o auxílio de um espectrofotômetro, sendo esta equivalente ao padrão 0,5 da Escala de McFarland. Os isolados de *Salmonella* spp. e de *Staphylococcus* produtores da enzima coagulase foram semeados com o auxílio de um swab estéril em placas contendo ágar Mueller-Hinton (Acumedia, USA). Em cada placa foi semeado 200 µL do cultivo com densidade ótica padronizada, como mencionado anteriormente. Discos de papel filtro (6 mm) foram colocados nas placas e em seguida, 5 µL do óleo essencial foram adicionados em cada disco para a difusão do mesmo no meio de cultivo. O experimento foi realizado em triplicata para cada isolado, sendo que papel filtro embebido com solução salina estéril foi utilizado como controle negativo. Após incubação por 24 horas em estufa bacteriológica a 37°C, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro e a atividade antibacteriana do óleo de tomilho foi considerada quando os halos formados apresentavam diâmetro superior a 12 mm (ROTA et al., 2008). Duas cepas ATCC foram usadas, sendo uma de *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 e uma de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (tomilho branco) teve uma ação inibitória em todos os isolados (100%) testados, inclusive nas cepas ATCC, como pode ser observado nas Tabelas 1 e 2. Segundo ROTA et al. (2008), a ação inibitória pode ser classificada como tendo uma forte atividade bacteriana (quando a zona de inibição foi igual ou superior a 20 mm), atividade moderada (quando a zona de inibição foi entre 12-20 mm) e nenhuma atividade inibitória (quando a zona de inibição foi menor que 12 mm). A maioria dos isolados testados apresentou um halo superior a 20 mm, demonstrando uma forte atividade inibitória, baseado na classificação mencionada, sendo estes diâmetros encontrados em 12 (80%) isolados de *Staphylococcus* e em três (60%) de *Salmonella* e também nas cepas ATCC usadas no experimento (Tabelas 1 e 2).

Os resultados obtidos neste experimento são similares aos encontrados por outros pesquisadores (PEREIRA et al., 2014; ROTA et al., 2008). PEREIRA et al. (2014) verificaram a ação inibitória deste óleo essencial frente a cepas bacterianas, como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis que foram submetidas a um processo de desinfecção utilizando o óleo de tomilho e o contato com este promoveu uma redução no número de células viáveis. Diferenças encontradas na atividade antibacteriana existente entre os óleos essenciais de diferentes espécies de plantas são atribuídas aos seus compostos químicos (TAJKARIMI et al., 2010). A eficácia do óleo depende do pH da solução e da concentração e tipos de componentes ativos (BURT, 2004). O óleo utilizado neste estudo foi obtido comercialmente e o composto majoritário segundo o fabricante é o timol (Ferquima – Indústria e Comércio de Óleos Essenciais), sendo talvez o



responsável pela atividade inibitória demonstrada. O timol é um composto fenólico com atividade antimicrobiana efetiva, que desorganiza a estrutura celular, promovendo a desnaturação de enzimas essenciais (BURT, 2004).

Tabela 1. Ação antimicrobiana do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. frente a isolados de *Staphylococcus* coagulase positivos.

Identificação dos Isolados	Densidade Ótica (A_{600})	Diâmetros dos Halos (mm)*
1377	0,574	33
1342	0,525	25
1380	0,529	40
1237	0,565	19
1378	0,509	38
1236	0,530	26
1207	0,594	30
1210	0,512	16
1216	0,529	22
1180	0,555	30
1190	0,501	36
1192	0,596	31
1197	0,576	32
1201	0,519	19
1246	0,586	38
Cepa ATCC 25923	0,566	21

*: os resultados representam as médias da triplicata.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana de *Thymus vulgaris* L. frente a isolados de *Salmonella* spp.

Identificação dos Isolados	Densidade ótica (A_{600})	Diâmetro dos Halos (mm)*
065	0,530	29
066	0,535	15
068	0,542	23
101	0,559	34
156	0,528	16
Cepa ATCC 13311	0,535	28

*: os resultados representam as médias da triplicata.

Além da composição química, outro fator que é preponderante na atividade antimicrobiana está relacionado aos microrganismos testados. Segundo OUSSALAH et al. (2007), bactérias Gram positivas são mais sensíveis aos óleos essenciais que as bactérias Gram negativas. A resistência pode ser atribuída à estrutura da parede celular das bactérias Gram negativas, principalmente em relação à presença de lipoproteínas e de polissacarídeos, que formam uma barreira por restringir a entrada de compostos hidrofóbicos. Com este objetivo de avaliar a ação inibitória do tomilho frente a bactérias Gram negativas e Gram

positivas, bactérias do gênero *Salmonella* e *Staphylococcus* foram selecionadas para serem usadas neste experimento e como pode ser observado, o tomilho teve uma forte ação inibitória nestes microrganismos testados.

4. CONCLUSÕES

Todos os isolados testados foram sensíveis ao óleo de *Thymus vulgaris* (tomilho branco) utilizado, apresentando halos de inibição que variaram de 15 a 40 mm de diâmetro. Estes resultados demonstram a possibilidade de o óleo de tomilho ser um potencial candidato para ser usado na indústria de alimentos, como um conservante natural.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUER, A.W.; KIRBY, E.; SHERRIS, E.M.; TURK, M. Antibiotic by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Regulamento sobre Aditivos Aromatizantes. Diário Oficial da União, DF, 2007.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008.
- JAKIEMI, E.A.R.; SCHEER, A.P.; OLIVEIRA, J.S.; CÔCCO, L.C.; YAMAMOTO, C.I.; DESCHAMPS, C. Estudo da composição e do rendimento do óleo de essencial de tomilho. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p. 683-688, 2010.
- MIGUEL, P.R.R.; POZZA, M.S.S.; CARON, L.F.; ZAMBOM, M.A.; POZZA, P.C. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.1, p.403-416, 2012.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, n.5, p.414-29, 2007.
- PEREIRA, A.A.; PICCOLI, R.H.; BATISTA, N.N.; CAMARGOS, N.G.; OLIVEIRA, M.M.M. Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* Enteritidis por óleos essenciais. **Ciência Rural**, v.44, n.11, p.2022-28, 2014.
- ROTA, M.C.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R.M.; SOTOMAYOR, J.A.; JORDÁN, M.J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v.19, p.681-686, 2008.
- SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 136-141, 2012.
- TAJKARIMI, M.M.; IBRAHIM, S.A.; CLIVER, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v.21, n.9, p.1199-1218, 2010.