

## ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.) DA REGIÃO DA CAMPANHA GAÚCHA

BRUNA DA FONSECA ANTUNES<sup>1</sup>; LORENA AGUIAR DA SILVA<sup>2</sup>; PÂMELA INCHAUSPE CORRÊA ALVES<sup>3</sup>; VALESKA RODRIGUES ROQUE<sup>4</sup>; ELIEZER AVILA GANDRA<sup>5</sup>; RUI CARLOS ZAMBIAZI<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – brunafonsecaantunes@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – loaguarsilva@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – pam.inchauspe@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – lekaroque@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – gandraea@hotmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – zambiasi@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A Oliveira (*Olea europaea* L.) pertence à família botânica *Oleaceae* e os seus frutos, a azeitona, servem como matéria-prima para extração de azeite e produção de azeitona em conserva, que são produtos muito apreciados mundialmente (COUTINHO, 2007).

A oliveira também permite o uso de suas folhas, que são resíduos agroindustriais resultante da poda e/ou da colheita da azeitona, e são normalmente utilizadas na alimentação animal, como fertilizante orgânico e como fonte de extração de compostos para diversas aplicações. Assim, as folhas juntamente com o bagaço pós extração do azeite são considerados coprodutos da indústria oleícola (FERNÁNDEZ-BOLAÑOS et al., 2006; GUINDA, 2006).

Tem sido relatado na literatura que os extratos das folhas de oliveira apresentam um alto poder antioxidante, propriedades anti-inflamatórias, além de ação hipotensiva, hipoglicemiante, hipouracêmica, bem como ações farmacológicas benéficas a saúde como antimicrobiana, antiviral e antitumoral. Ademais, pesquisas apontam também que as folhas de oliveira inibem o aumento da fração LDL do colesterol (BISIGNANO et al., 1999; BENAVENTE-GARCIA et al., 2000; ANDRIKOPOULOS; ANTONOPOULON; KALIORA, 2002; MICOL et al., 2005; HAMDI; CASTELLON, 2005; AL-AZZAWIE; ALHAMDANI, 2006).

Essas atividades estão relacionadas principalmente com o elevado teor de compostos fenólicos presentes nas folhas, que são oriundos do metabolismo secundário das plantas, que se formam em condições de estresse como: infecções, ferimentos, radiações UV, entre outros; e são essenciais para o crescimento e reprodução da planta (NACZK; SHAHIDI, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Em face do exposto, o objetivo deste trabalho foi de avaliar a atividade antibacteriana de folhas de oliveira provenientes da Região da Campanha Gaúcha frente a duas cepas bacterianas, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

### 2. METODOLOGIA

Foram utilizadas folhas de oliveira de cinco cultivares (Arbequina, Koroneiki, Frontoio, Arbosana e Manzanilha) que foram adquiridas na Estância Guarda Velha, que fica localizada no município de Pinheiro Machado/RS. Após a colheita,

as folhas foram moídas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para a posterior realização da análise.

A análise de determinação do potencial antibacteriano foi realizada no Laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular (LACABIM), do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Localizado no Prédio 04 do Campus do Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) no município de Capão do Leão – RS.

O efeito foi avaliado frente a cepas padrão das espécies bacterianas *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832).

As bactérias utilizadas foram mantidas sob congelamento em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v:v). Para realizar a reativação, uma alçada dessas bactérias foi transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB) e incubadas em estufa durante 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após uma alçada de cada espécie foi estriada em placas de Petri com meios seletivos, sendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli*, e ágar Baird-Paker para *S. aureus*, e incubadas por 24/48 h a  $37^{\circ}\text{C}$ , para o isolamento das colônias.

A partir do crescimento bacteriano nas placas de Petri, foi extraída uma alçada e ressuspensa em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

A análise de disco difusão foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (2015) com pequenas modificações. Uma solução salina padronizada contendo inóculo bacteriano foi semeada com auxílio de um swab estéril na superfície de placas com ágar Muller-Hinton. Em seguida foram adicionados discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de 6 mm, e 10  $\mu\text{L}$  de extrato de folhas de oliveira na concentração de 0,008 g/ml foram aplicados sobre os discos de papel. Posteriormente, as placas foram incubadas por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição e os resultados expressos em centímetros.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de halos e seu tamanho indicam a suscetibilidade das bactérias frente aos extratos, quando estes halos forem menores que 0,7 cm são considerados não-ativos frente a bactéria, e quando apresentarem diâmetro maior que 1,2 cm são considerados de efeito inibitório satisfatório segundo Arora & Kaur (1999), em razão disto observa-se que os extratos de folhas de oliveira foram ativos frente as bactérias avaliadas, para determinadas cultivares (Tabela 1).

Tabela 1. Halos de inibição obtidos pelo método de disco difusão por aplicação de extrato de folhas de oliveira frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Cultivares	Halo de inibição (cm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Frantoio	0,00 $\pm$ 0,00	0,73 $\pm$ 0,09
Koroneike	0,58 $\pm$ 0,11	0,00 $\pm$ 0,00
Manzanilha	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Arbosana	0,78 $\pm$ 0,11	0,00 $\pm$ 0,00
Arbequina	0,35 $\pm$ 0,49	0,00 $\pm$ 0,00

\*Média e desvio padrão

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que a *Escherichia coli* foi inibida pelas cultivares Koroneike, Arbosana e Arbequina, com halos que variaram de 0,35 a 0,78 cm, sendo a Arbequina a cultivar que obteve o maior halo de inibição. Já a bactéria *Staphylococcus aureus* foi inibida somente pela cultivar Frantoio com um halo de inibição de 0,73 cm.

Um estudo realizado por Lee & Lee (2010), que avaliaram a atividade antimicrobiana das folhas de oliveira, frente as mesmas bactérias, não obtiveram halos de inibição. ALIABADI et al. (2012), também constatou que as folhas de oliveira não inibiram as mesmas bactérias na mesma concentração do extrato avaliada neste trabalho, porém em concentrações maiores de extrato obtiveram halos de inibição de até 0,9 cm para a *Staphylococcus aureus* em concentração de 50 mg/ml e para a bactéria *Escherichia coli* obtiveram halos de inibição de até 0,82 cm também na concentração de 50 mg/ml.

De maneira geral, a capacidade antimicrobiana dos compostos fenólicos é bem conhecida. Nas folhas de oliveira, os polifenóis hidroxitirosol e oleuropeína são os principais compostos fenólicos responsáveis pelas propriedades antimicrobianas das mesmas (PUUPPONEN-PIMIÄ, 2001; PEREIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007).

São encontrados estudos em que o hidroxitirosol e a oleuropeína demonstraram inibir ou atrasar a taxa de crescimento de vários agentes patogênicos intestinais ou respiratórios em humanos, como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio alginolyticus* (BISIGNANO et al., 1999).

No presente estudo o extrato das folhas de oliveira inibiu as bactérias testadas, sugerindo atividade antimicrobiana dos extratos. Certamente, a composição química das folhas de oliveira condicionou os efeitos antimicrobianos observados. O alto teor de oleuropeína e os outros compostos fenólicos presentes nas folhas podem ter contribuído para suas propriedades antimicrobianas.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicaram que extratos de folhas de oliveira apresentam potencial antibacteriano frente a *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832).

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-AZZAWIE, H. F.; ALHAMDANI, M. S. S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. **Life Sciences**, v. 78, p. 1371- 377, 2006.
- ALIABADI, M.A.; DARSANAKI, R.K.; ROKHI, M.L.; NOURBAKHSH, M.; RAEISI, G. Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. **Annals of Biological Research**, v.3, n.8, p.4189-4191, 2012.
- ANDRIKOPOULOS, N.; ANTONOPOULOU, S.; KALIORA, A. Oleuropein inhibits LDL oxidation induce by cooking oil frying by-products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 35, p. 479-484, 2002.
- ARORA, D. S.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. Internation. **Journal of Antimicrobials Agents**, v.12, p.257-262, 1999.
- BENAVENTE-GARCIA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 68, p. 457-462, 2000.

- BISIGNANO, G.; TOMAINO, A.; LO CASCIO, R.; CRISAFI, G.; UCCELLA, N., SAIJA, A. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.51, p.971–974, 1999.
- CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Metodologia dos testes de sensibilidade antimicrobiana. **CLSI documento M07-A06**, v. 23, n. 2, 2005.
- COUTINHO, E. F. **A cultura da Oliveira**. 1 ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007.
- FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.; RODRÍGUEZ, G.; RODRÍGUEZ, R.; GUILLÉN, R.; JIMÉNEZ, A. Potential use of olive by-products, Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste, **Grasas y Aceites**, v.57, p.95-106, 2006.
- GUINDA, A. Use of solid residue from the olive industry. **Grasas Y Aceites**. v.57, p.107-115, 2006.
- HAMDI, H. K., CASTELLON, R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton distrupctor. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 334, p. 769-778, 2005.
- LEE, O.H.; LEE, B.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresource Technology**, v.101, p.3751–3754, 2010.
- MICOL, V. et al. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSH). **Antiviral Research**, v. 66, p. 129-136, 2005.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal Chromat. A.**, Washington, v. 1054, n. 1/2, p. 95-111, 2004.
- PEREIRA, A.P.; FERREIRA, I.; MARCELINO, F.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L.; BENTO, A.; PEREIRA, J.A. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa). **Leaves Molecules**, v.12, p.1153-1162, 2007.
- PEREIRA, J.A.; PEREIRA, A.P.G.; FERREIRA, I.C.F.R.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L.; BENTO, A. Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. **J. Agric. Food Chem**, v.54, p.8425-8431, 2006.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN- CALDENTY, K.-M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **J. Appl.Microbiol**, v.90, p.494-507, 2001.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 820, 2004.