

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO (*THYMUS VULGARIS L.*) FRENTE À PATÓGENOS ALIMENTARES

BRUNA TIMM GONÇALVES¹; LETÍCIA ZARNOTT LAGES²; PÂMELA INCHAUSPE CORRÊA ALVES³; ELIEZER AVILA GANDRA⁴

¹Bolsista PIBIC/CNPq, Laboratório de Ciências dos Alimentos e Biologia Molecular (LACABIM), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – bruhutimm@gmail.com

²LACABIM, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos (PPGNA), UFPel – leticiazarnott@hotmail.com

³LACABIM, PPGNA, UFPel – pam.inchauspe@hotmail.com

⁴LACABIM, CCQFA, PPGNA, UFPel – gandraea@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OE) constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, relacionando-se diretamente com diversas funções necessárias à sobrevivência, exercendo ainda, papel fundamental na defesa microbiana da planta (SIQUI et al., 2000). Os OE constituem-se em complexas misturas, geralmente lipofílicas (SIMÕES & SPITZER, 1999), compostas por diversos componentes em diferentes concentrações, onde um dos compostos é farmacologicamente ativo e majoritário. *Thymus vulgaris L.*, popularmente conhecido como tomilho, trata-se de uma planta medicinal, aromática e condimentar, pertencente à família *Lamiaceae*, originária da Europa e cultivada no sul e sudeste do Brasil (SAKURAI et al., 2016). Esta planta, muito utilizada na medicina popular, possui OE já relatado como responsável por suas atividades anti-séptica, expectorante, carminativa e antiespasmódica (SIMÕES & SPITZER, 2004); sua atividade biológica relaciona-se intimamente com os seus principais constituintes, o timol e o carvacrol. O timol tem demonstrado efeitos antifúngicos, antibacterianos e anti-helmínticos e o carvacrol tem sido estudado por seus efeitos bactericidas (SAKURAI et al., 2016). O timol é o maior responsável pelo uso do OE do tomilho, uma vez que o mesmo assume o papel de composto majoritário (aproximadamente 40% de sua composição) (FARMACOPEIA ITALIANA, 1998).

Sabe-se que as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais despertam interesse na perspectiva de constituírem uma alternativa ao uso de aditivos químicos em alimentos e que, nos últimos anos, tem sido relatado que alguns OE são capazes de inibir bactérias de origem alimentar, prolongando a vida de prateleira de alimentos processados (KIM et al., 1995; SMITH-PALMER et al., 1998). As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são provocadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados, na maioria das vezes por bactérias, suas toxinas, vírus, parasitas e agentes químicos; os principais agentes envolvidos em surtos de DTAs no Brasil são *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2017). Também cabe ressaltar, que *Listeria monocytogenes* possui grande capacidade de multiplicação, tornando-se um grande problema nas indústrias alimentícias e na saúde pública, visto que as infecções causadas pela mesma apresentam altas taxas de mortalidade (cerca de 30% em imunodeprimidos) (FILHO, 2014).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a característica inibitória do OE de *Thymus vulgaris L.*, frente às espécies patogênicas *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado no Laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular do Centro de Ciências Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de Pelotas. A aquisição do OE (acondicionado em frasco âmbar, lacrado, com um volume total de 100 mL) de *Thymus vulgaris L.* deu-se comercialmente através da empresa Ferquima, Indústria e Comércio de Óleos Essenciais. O efeito antimicrobiano foi avaliado através do método de disco difusão frente a quatro cepas padrões: *Escherichia coli* O157:H (ATCC 43895), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832). As cepas encontravam-se mantidas sob congelamento em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v:v) e, para realizar a devida reativação, uma alçada da bactéria foi transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB), havendo uma incubação em estufa durante 24h a 37°C. Após uma alçada desse crescimento foi estriado em placas de Petri contendo meio seletivo para cada micro-organismos, para *Escherichia coli* utilizou-se ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), para *Listeria monocytogenes* ágar Orfoxd, para *Salmonella Typhimurium* - Trypticase Soy Ágar (TSA) e para *Staphylococcus aureus*, ágar Baird-Paker (BP). Após, realizou-se uma nova incubação por 24h a 37°C para o isolamento das colônias com morfologia característica.

A avaliação da ação antimicrobiana foi realizada seguindo a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Do crescimento bacteriano nas placas de Petri, foi extraída uma alçada que ressuspendeu-se em solução salina (NaCl 0,85%), havendo uma padronização na concentração 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). A solução salina padronizada contendo o inóculo foi semeada com auxílio de um swab estéril na superfície de placas com ágar Muller-Hinton e, em seguida foram sobrepostos discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de 6 mm, seguidos da adição de 5 µL de óleo essencial de tomilho, sobre os discos de papel. Como controle negativo foi utilizado discos de papel filtro, esterilizados, embebidos em 5 µL de solução salina esterilizada. Incubaram-se as placas por 24h a 37 °C e, logo após este período, efetuou-se a medição dos halos de inibição, obtendo-se os resultados expressos em centímetros. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos (Figura 1) apontaram para uma sensibilidade maior de *S. aureus* (Gram +), seguida de *S. Typhimurium* (Gram -), demonstrando que houve inibição tanto de bactérias Gram positivas, quanto negativas. Os halos corresponderam em média a 2,2 cm para o patógeno *S. aureus* e 1,52 cm para o patógeno *S. Typhimurium*. Já para *L. monocytogenes* verificou-se halos de tamanho médio de 1,47 cm, e para *E. coli*, se obteve a formação de halos de 1,09 cm. A relação de halos formados pela ação do OE de tomilho frente aos quatro patógenos pode ser observada na figura 1.

Segundo NAZZARO et al. (2013), devido a presença da membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS) nas bactérias Gram -, estas demonstram-se mais resistentes a passagem de moléculas antibacterianas, necessitando de concentrações mais elevadas de OE. Em acordo a estes autores, o OE de tomilho apresentou maior ação inibitória sobre o patógeno *S. aureus*, do que sobre *E. coli*.

(Gram -), onde verificou-se os menores halos, devido provavelmente as suas características estruturais da parede celular com presença de membrana externa.

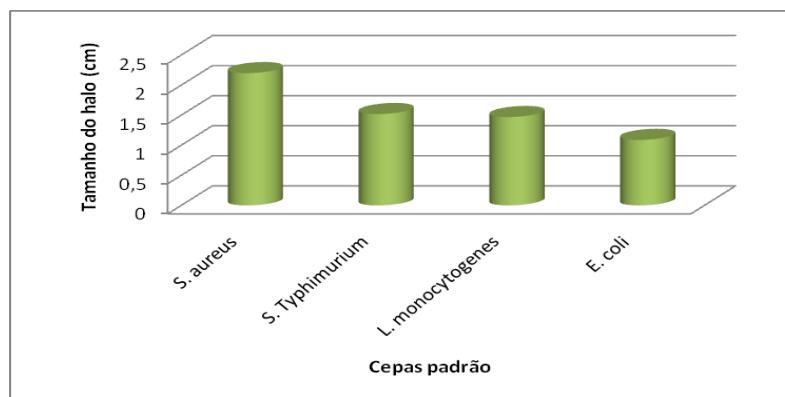


Figura 1 – Ação antibacteriana do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris L.*) através do método de disco difusão frente patógenos alimentares

Segundo Mothana e Lindequist (2005), os OE podem ser classificado quanto ao seu poder inibitório em função do tamanho de halo obtido. Para serem considerados com poder de ação moderadamente ativos, os mesmos devem formar de halos de inibição de 0,8 a 1,3 cm e, para serem considerados muito ativos, devem formar halos de inibição maiores que 1,4 cm. Seguindo estes critérios no presente estudo, observa-se que a única cepa que o OE de tomilho demonstrou-se moderadamente ativo foi frente *E. coli*. Já, frente as demais cepas, o OE demonstra-se muito ativo, demonstrando grande potencial para estudos mais aprofundados visando uma possível aplicação futura do óleo em alimentos.

Entretanto, em um estudo de Millezi et al. (2012) o óleo de tomilho não demonstrou atividade antibacteriana sobre *E. coli*, ao passo que para Rota et. al. (2008) o resultado foi similar ao do presente estudo, uma vez que encontraram atividade antimicrobiana do OE contra as bactérias *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. entérica Enteritidis* e *S. aureus*.

Outros estudos ainda demonstraram que o OE de tomilho está entre os antimicrobianos mais ativos (DIMITRIJEVIĆ et al., 2007); segundo Moreira et. al. (2005), isso está relacionado ao seu caráter lipofílico, que liga a bicamada fosfolipídica da membrana celular aumentando sua permeabilidade e disseminando o conteúdo intracelular ou prejudicando o sistema enzimático da célula, uma vez que, pequenas alterações que ocorram na estrutura da membrana citoplasmática podem afetar o metabolismo.

4. CONCLUSÕES

Verificou-se através da técnica de disco difusão em ágar que o OE de tomilho (*Thymus vulgaris L.*) apresentou ação antibacteriana frente aos patógenos *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS.** 2017. Acessado em 20 de agosto de 2018. Online. Disponível em: <<http://portalsauda.saude.gov.br/index.php/ministerio/principal/secretarias/svs/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta>>.

- CLSI, 2015. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard — Nona edição.
- DIMITRIJEVIĆ, S. I.; MIHAJLOVSKI, K. R.; ANTONOVIĆ, D. G.; MILANOVIC-STEVANOVIĆ, M. R.; MIJIN, D. Ž. Um estudo dos efeitos aneristeriais sinérgicos de uma dose subletal de ácido láctico e óleos essenciais de *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. e *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, v.104, p. 774-782. 2007.
- FARMACOPEA UFFICIALE DELLA REPUBLICA ITALIANA. X Edizione. Roma: Instituto Poligrafico e Zecco dello Stato, V.I, p.206-210. 1998.
- FILHO, H. H. **Efeito do óleo essencial de gengibre e do pH sobre crescimento e indução de tolerância em *Listeria monocytogenes***. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, p. 85, 2014.
- KIM, J. M.; MARSHALL, S. R.; CORNELL, J. A.; PRESTON, J. F.; WEI, C. I. Atividade antibacteriana do Carvacrol, Citral e Geraniol contra *Salmonella typhimurium* em meio de cultura e em cubos de peixe. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 1364-1368, 1995.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L. De. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals** p.1451–1474, 2013.
- MILLEZI, A. F.; CAIXETA, D. S.; ROSSONI, D. F.; CARDOSO, M. G.; PICCOLI, R. H. P. Propriedades antimicrobianas in vitro de óleos essenciais de plantas *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* e *Laurus nobilis* contra cinco importantes patógenos veiculados por alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol.32 nº.1 Campinas Mar. 2012 Epub 24 de fevereiro de 2012.
- MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; VALLE, dC; ROURA, I. E. Parâmetros inibitórios de óleos essenciais para reduzir um patógeno veiculado por alimentos. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, p. 565-570, 2005.
- MOTHANA, R. A.; LINDEQUIST U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqatra. **Journal of Ethnopharmacology Etnopharmacology**, 96:177-181. 2005.
- ROTA, M. C.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R. M.; SOTOMAYOR, J. A.; JORDÁN, M. J.; Atividade antimicrobiana e composição química de óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* e *Thymus hyemalis*. **Food Control** , v.19, 681-687, 2008.
- SAKURAI, F. N. K.; ESTRELA, C. A.; TAMAYO, M. S.; CASSEB, M. O.; NAKASATO, M. **Caracterização das propriedades funcionais das ervas aromáticas utilizadas em um hospital especializado em cardiopneumologia**. Demetra: Alimentação, nutrição e saúde; 11(4); 1097-1113. 2016. Acessado em 19 de agosto de 2018. Online. Disponível em <<http://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/demetra/article/viewFile/18170/19102>>.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS, p.467-95. 2004.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS. Cap.18, p.387-416. 1999.
- SIQUEI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. **Óleos essenciais - potencial anti inflamatório**. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. 16: 38-43. 2000.