



11ª Jornada Científica e Tecnológica do IFSULDEMINAS

& 8º Simpósio de Pós-Graduação

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA PATÓGENOS ALIMENTARES

Juliana B. REIS¹; Luana A. de FIGUEIREDO²; Giuliana M. CASTORANI³; Sandra M. O. M. VEIGA⁴

RESUMO

Este estudo tem como finalidade estudar a ação antimicrobiana de óleos essenciais das especiarias orégano, manjerona, tomilho, alecrim, gengibre, manjerição e pimenta-preta contra patógenos alimentares de importância epidemiológica, pelas técnicas de difusão em ágar-técnica do poço e microdiluição. Alguns dos óleos se mostraram efetivos contra esses micro-organismos, mostrando que os óleos essenciais podem atuar como aditivos alternativos.

Palavras-chave: Aditivos alternativos; Concentração microbiana mínima; Microdiluição; Microbiologia.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OE) de plantas vêm sendo estudados como aromatizantes e conservantes naturais pelas indústrias alimentícias (COSTA et al., 2015). Na sua condição de antimicrobianos naturais, têm potencial para serem usados no controle de micro-organismos, reduzindo a necessidade de aditivos (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Neste contexto, este estudo tem como finalidade estudar a ação antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias.

As informações sobre os óleos estudados seguem no quadro abaixo:

Especiaria	Orégano	Manjerona	Tomilho	Alecrim	Gengibre	Manjerição	Pimenta
Composição pelo laudo do fabricante (FERQUIMA®)	Carvacrol- 72%, Timol- 2%, γ -terpineno- 4,5%, p-cimeno- 4%, linalol- 4%.	Terpineno- 4-ol- 22%, sabineno- 16% e γ -terpineno - 13%.	Timol- 50%, p-cimeno- 30%, γ -terpineno- 6% linalol-5% carvacrol-5% α -pineno- 2%, mirceno- 2%.	1,8 cineol- 40%, cânfora-15%, alfa pineno-13% beta pineno- 7% e limoneno - 3%.	Alfa- zingiberen o- 33% , beta- sesquifelan dreno 13%.	Metilchavico 1-85%, eucaliptol- 3%, bergamoteno (2,7%), transo cimento- 2%, lilanol- 0,8% e eugenol, (0,6%).	Safrol- 82,0%), α -pineno- 0,6%, δ -3-careno 1,4% e α -terpinolen o-13,5%.

Fonte: FERQUIMA®

¹ Mestranda, IFSULDEMINAS – Campus Machado. E-mail: juborges_vet@yahoo.com.br.

² Discente UNIFAL- Faculdade de Ciências Farmacêuticas. E-mail: lua.29am@gmail.com

³ Discente UNIFAL- Faculdade de Ciências Farmacêuticas. E-mail: giuliana.castorani@hotmail.com

⁴ Orientadora, Docente UNIFAL- Faculdade de Ciências Farmacêuticas. E-mail: smveiga@gmail.com.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar-técnica do poço

Utilizaram-se cepas padrões de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* 14028 e *Listeria monocytogenes* 1/2 a.

Foram inoculados 100 µl de suspensão microbiana padronizada com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bactérias/ml) em placas de petri com ágar Mueller-Hinton (CLSI, 2012). Em cada placa, foram feitos quatro poços de 4 mm de diâmetro para inserir 50 µl do óleo essencial. Os óleos foram diluídos em salina adicionada de 1% de Tween 80, nas proporções de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5% e 4,0%. As placas foram incubadas em estufa a 37° C por 24 horas.

Para o controle negativo, foi inoculado em um poço apenas a solução salina estéril com Tween 80. O controle positivo usou discos de antibiótico com atividade comprovada contra o micro-organismo avaliado.

Teste de diluição em caldo – microdiluição

O inóculo foi padronizado também no padrão do tubo 0,5 da escala de McFarland (CLSI, 2012) e diluído até concentração de 3×10^5 UFC/ ml. A diluição foi calculada para que cada poço contivesse 20 µl, num total de 200 µl em cada microplaca. A concentração de cada óleo baseou-se nos resultados obtidos na técnica de difusão em ágar. A solução foi preparada em caldo Mueller Hinton e Tween 80 a 1%, variando de concentração em intervalos de 0,1 % ou seja, 3,0 %; 2,9 %; 2,8 %; 2,7 % e assim sucessivamente até 0,1 %. As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração de óleo essencial na qual não foi visualizado crescimento microbiano com o uso do revelador de viabilidade celular resazurina, que toma coloração rósea na presença de células viáveis.

Dos poços que permaneceram sem crescimento microbiano foram inoculados 20 µl em placas com ágar Mueller-Hinton e foram incubadas a 37° C, por 24 horas. O crescimento em placa indica que, na concentração avaliada, houve a inibição do crescimento, contudo sem matar o micro-organismo. O não crescimento em placa caracteriza a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Difusão em ágar-técnica do poço

A tabela a seguir apresenta as médias dos halos de inibição encontrados, em mm, com os respectivos desvios padrão. Os OE de alecrim e pimenta preta não foram efetivos contra nenhum dos micro-organismos testados. O óleo essencial de gengibre foi efetivo apenas contra *L. monocytogenes*, e somente nas três concentrações mais altas, não sendo estes incluídos no quadro.

Média dos halos de inibição dos OE (em milímetros) frente a patógenos, com o desvio padrão:

	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>
OE: Orégano				
Concentração	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP
0,5			0	17 ± 3,5
1	13 ± 0	9 ± 0,7	1 ± 1	20 ± 0,7
1,5	20 ± 6,3	10 ± 0,6	10 ± 0,6	16 ± 6,4
2	21 ± 4	12 ± 4,9	11 ± 1,5	20 ± 0
2,5	22 ± 4,2	13 ± 2,3	12 ± 1,7	16 ± 3,6
3	23 ± 6,6	14 ± 3,5	11,7 ± 1,5	16,7 ± 6,1
3, 5	11 ± 7,9	17,7 ± 3,2	12 ± 1,5	15,7 ± 1,2
4	31 ± 8,9	19 ± 3,1	13 ± 0,6	11 ± 13,9
OE: Manjerona				
Concentração	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP
0,5	NA	NA	NA	14 ± 0
1	NA	NA	NA	11 ± 0
1,5	NA	10 ± 0	NA	12 ± 0
2	NA	9 ± 1	NA	15 ± 0
2,5	NA	14 ± 3,2	9,7 ± 1,2	15 ± 0
3	NA	11 ± 1	9 ± 0,6	13 ± 4,2
3, 5	NA	16 ± 2,5	11 ± 0,6	13 ± 1,4
4	NA	16 ± 3,2	11,7 ± 1,5	20 ± 4,2
OE: Tomilho				
Concentração	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP
0,5	NA	NA	10 ± 0,6	NA
1	NA	NA	0,00	NA
1,5	NA	18 ± 9,9	10 ± 0,6	NA
2	NA	20,5 ± 13,44	10 ± 0	NA
2,5	NA	9 ± 2,8	10 ± 0	15 ± 1,4
3	NA	9,5 ± 2,1	10 ± 0,6	13 ± 2,8
3, 5	NA	12 ± 0	10 ± 0,6	13 ± 2,8
4	14	12,5 ± 3,5	12 ± 0,6	13 ± 0
OE: Manjerição				
Concentração	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP
0,5	NA	NA	NA	NA
1	NA	9 ± 14	NA	NA
1,5	NA	13,5 ± 9,2	NA	NA
2	NA	13 ± 07	NA	NA
2,5	NA	12 ± 1,0	13 ± 4,9	NA

3	NA	12 ± 1,0	13 ± 1,4	NA
3, 5	13 ± 2,1	15 ± 4,2	16 ± 0,5	NA
4	14 ± 4,2	16 ± 1,5	16 ± 0,7	NA

NA= não ativo/não formou halo

O óleo essencial de orégano apresentou melhor desempenho, seguido dos OE de manjerona, manjerição e tomilho. O óleo essencial de gengibre apresentou fraca atividade.

Microdiluição

A partir dos halos de inibição obtidos na técnica de difusão em ágar, foi possível determinar a menor concentração em que o óleo inibiu cada micro-organismo, sendo esta a partida para a microdiluição, resultando na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM), que são listadas no quadro a seguir:

Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima dos óleos essenciais estudados frente aos patógenos alimentares.

Óleo essencial	<i>S. aureus</i>		<i>E.coli</i>		<i>Salmonella</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	CIM	CMB	CIM	CMB	CIM	CMB	CIM	CMB
Orégano	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Manjerona	0,9 1,0%	>3,0%	0,2 - 0,3%	0,4 - 0,5%	ND	ND	1,6 - 1,7%	>4,0%
Tomilho	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gengibre	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA
Manjerição	1,5 - 1,6%	> 2,5%	0,6 - 0,7%	1,6 - 1,7%	1,0 - 1,1%	>4,0%	ND	ND

NA= não ativo ND=não definido

Pelo teste de microdiluição, os óleos essenciais de manjerona (especialmente) e manjerição apresentaram elevada atividade antimicrobiana. O óleo de gengibre não obteve resultado satisfatório.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que alguns óleos essenciais poderiam ser empregados na indústria de alimentos, como aditivos alternativos para controle microbiológico. Para comprovar essa viabilidade são necessárias mais pesquisas, associando a ação antimicrobiana às análises sensoriais e de toxicidade, além da interação com a matriz alimentar e do custo-benefício.

REFERÊNCIAS

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 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, Set., 2010.