

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE PATÓGENOS ALIMENTARES

VOLÇÃO, LISIANE MARTINS¹; MARQUES, JULIANA de LIMA¹; RIBEIRO, GLADIS AVER²

¹UFPEL – CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS; ²LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA – DEMP – IB/UFPEL. lisi.volcao@hotmail.com.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Silva et al. (2008), é crescente na sociedade moderna o interesse em terapias alternativas e o uso terapêutico de produtos naturais. A atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos de plantas tem tido muitas aplicações, incluindo conservação de alimentos crus e processados, produtos farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais (HAMMER *et al.* 1999).

Na literatura são descritas diversas plantas com propriedades medicinais como espécies pertencentes à Família Lamiaceae, composta por aproximadamente 200 gêneros, incluindo *Melissa officinalis* (erva-cidreira), *Ocimum basilicum* L. (alfava) e a *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), tema deste estudo, e que segundo Joly (1993), Porte e Godoy (2001), Sartorato *et al.* (2004) e Adiguzel et al. (2005) apresentam propriedades estimulantes, antiespasmódicas, anti-sépticas, antifúngicas e antibacterianas. As substâncias antimicrobianas das plantas são detectadas, principalmente, por meio da observação da sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos expostos a estes compostos; os resultados, no entanto, sofrem influências dos métodos e microrganismos testados (SOUZA; AVANCINI; WIEST, 2000).

O alecrim é uma especiaria conhecida desde a antiguidade por seus efeitos medicinais. Atualmente, diversos estudos têm apontado tal especiaria como antioxidante e antimicrobiana (AFONSO *et al.*, 2008). Nascimento *et al.* (2000) relataram a ação antimicrobiana de extratos de alecrim frente a bactérias sensíveis e resistentes a antibióticos sintéticos, verificando sinergismo entre antibióticos e os extratos usados, possibilitando que antibióticos ineficazes apresentassem ação sobre bactérias resistentes. Packer e Luz (2007) demonstraram atividade bacteriostática e fungistática do alecrim empregando a técnica do orifício em Agar. Serpa et al. (2006) demonstraram atividade do óleo essencial de *Rosmarinus* frente a bactérias Gram-negativas propondo que compostos do óleo tem capacidade de romper ou penetrar na estrutura lipídica externa destas bactérias.

O objetivo deste presente trabalho foi avaliar o potencial bactericida e bacteriostático do óleo essencial de alecrim frente a três patógenos alimentares bacterianos: *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterococcus faecalis*.

2 METODOLOGIA

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) foi cedido pelo Laboratório de Bacteriologia do IB/UFPEL.

As bactérias testadas foram *Escherichia coli* O157:H7, e cepas isoladas de alimentos como *Enterococcus faecalis* e *Enterobacter aerogenes*, todas

pertencentes à Bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da UFPEL. As cepas foram mantidas em ágar-conservação, e recuperadas em Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI - Acumedia®), sendo incubadas a 36°C por 24h.

Para a determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim foi utilizada a técnica de Microdiluição em caldo, utilizando-se de placas estéreis de microtitulação compostas por 96 cavidades, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003). O meio utilizado foi o caldo BHI (Acumedia®), acrescido do emulsificante Tween 80 (T80-Vetec®) a 0,5%. Foram feitas 8 diluições dos óleos no meio obtendo-se concentrações entre 100 µl/ml e 0,781 µl/ml.

Alíquotas de 100µl de meio+óleo+T80 foram adicionadas as cavidades. Os inóculos (100µl) de cada uma das bactérias testadas foram ajustadas em solução salina à escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), logo foram feitas diluições de 1:20 em BHI visando obter concentração bacteriana final de aproximadamente 10^5 a 10^6 UFC/mL e em seguida adicionados às cavidades com as diluições do óleo e controles. Foram realizadas trélicas para cada cepa bacteriana analisada. Foi utilizado um controle negativo (meio+T80+óleo essencial) e um positivo (meio+T80+inóculo) para cada repetição. As placas foram então incubadas a 36°C por 24h. Para a leitura adicionou-se 20µl de Cloreto de 2,3,5 – Trifenil Tetrazólio, que após vinte minutos e 36°C de incubação, indicou atividade celular bacteriana, com mudança na coloração de transparente para vermelho. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada como sendo a menor concentração do óleo a qual inibiu completamente o crescimento bacteriano no meio líquido.

Já a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada de acordo com os resultados do CIM. Alíquotas de 5µl de cada diluição que inibiu o crescimento bacteriano foram semeadas em ágar BHI e incubadas a 36°C durante 24h. A CBM foi determinada como sendo a concentração mínima que não apresentou crescimento bacteriano no meio de cultura após o período de incubação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os valores da CIM e da CBM do óleo essencial de alecrim para as três cepas testadas. Para a *E. coli* O157:H7 houve apenas inibição na maior concentração (100 µl/mL) e sem ação bactericida, resultado que corrobora com os obtidos por Porte e Godoy (2001), onde nenhum ou pouco efeito antimicrobiano foi verificado contra bactérias Gram-negativas. Ainda no mesmo artigo, os autores demonstram alta sensibilidade por parte de bactérias Gram-positivas frente ao óleo essencial de alecrim, dados obtidos no presente trabalho, onde houve efeito inibitório de crescimento de *Enterococcus faecalis* em três concentrações (100 µl/mL, 50 µl/mL e 25 µl/mL) e ação bactericida na concentração de 50 µl/mL. *Enterobacter aerogenes* apresentou inibição no crescimento em duas concentrações, de 100 µl/mL e 50 µl/ml, mas apenas foi bactericida na máxima concentração do óleo.

De acordo com Silveira *et al.* (2007) pela metodologia do CMI, o óleo de alecrim é ativo frente a *Escherichia coli* na concentração de 0,1 mg/mL. No trabalho desenvolvido por Carvalho e colaboradores (2010), também foi observada baixa sensibilidade de *E. coli* quando utilizada a técnica da CIM. Este trabalho observa a baixa atividade antibacteriana do óleo essencial de alecrim frente a *E. coli*. Apesar de Koyama *et al.* (1997) observar que muitos compostos do óleo essencial de alecrim têm habilidade de romper ou penetrar na estrutura lipídica presente na

membrana externa de bactérias Gram-negativas, este fato não foi observado neste trabalho para *E. coli*.

Tabela 1 – Valores das concentrações mínima inibitória (CMI) e das concentrações bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. sobre as cepas testadas.

Bactérias	CMI	CBM
<i>E. coli</i> /O157:H7	100 µ l/mL	> 100 µ l/mL
<i>Enterococcus faecalis</i>	25 µ l/mL	50 µ l/mL
<i>Enterobacter aerogenes</i>	50 µ l/mL	100 µ l/mL

4 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram maior atividade antibacteriana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre a bactéria Gram-positiva, *Enterococcus faecalis* e o bacilo Gram-negativo *Enterobacter aerogenes*. Revelou também inibição do crescimento de *Escherichia coli* O157:H7 na maior concentração do óleo essencial testada. Perante maiores estudos que comprovem a atividade antimicrobiana do óleo, o mesmo pode constituir uma perspectiva para a obtenção de antibióticos naturais.

5 REFERÊNCIAS

ADIGÜZEL A.; GÜLLÜCE, M.; SENGÜL, M., OGUTCU, H., SAHIN, F.; KARAMAN, I. Antimicrobial Effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) Extract. **Turkish Journal of Biology**. v. 29, p. 155-160, 2005.

AFONSO, M. S. et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em filés de tilápia (*Oreochromis ssp*) salgados secos durante o armazenamento congelado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 12-17, 2008. Disponível em: <http://www.ibb.unesp.br/servicos/publicacoes/rbpm/pdf_v10_n2_2008/artigo3.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2011.

CARVALHO, T. M.; TOSTA, T. F.; SARMENTO, R. R.; BEGNINI, L. M.; OKURA, M. H. Verificação da atividade antibacteriana in vitro dos óleos essenciais *Cinnamomum zeylonicum* e *Rosmarinus officinalis* em bactérias causadoras de infecção do trato urinário. **RBAC**, vol.42(3): 213 – 215, 2010.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86 p.985-990,1999.

JOLY, A. B.. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 11^a ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993. 777 p.

KOYAMA, S.; YAMAGUSHI, Y.; TANAKA, S.; MOTOYASHIMA, J. A new substance (yoshiksol) with an interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanese traditional tree (kisohinoki), *Chamaecyparis obtuse*. **General Pharmacology**, 1997, 28, p.797-804.

NASCIMENTO, G. G. F. ; LOCATELLI, J. ; FREITAS, P. C. ; SILVA, G. L. E. . Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A6, 2003.

PACKER, J. F. ; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 102-107, 2007.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. Curitiba, v. 19, n. 2, p. 193-210 jul./dez., 2001.

SARTORATTO, A. ; DUARTE, M. C. T. ; DELARMELENA, C. ; REHDER, V. L. G.; FIGUEIRA, G. M. ; MACHADO, A. L. M. . Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SERPA, R.; CASTELLI, R. M.; BOBROWSKI, V. L.; RIBEIRO, G. A. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. sobre patógenos veiculados por alimentos. In: **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 15., 2006, Pelotas. *Anais do XV Congresso de Iniciação Científica (XV CIC)*, Pelotas: UFPEL, 2006. 1 CD-ROM.

SILVA, M. S. A. et al. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Rev. Bras. Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, abr./jun. 2008.

SILVEIRA, L. M. S. & et al. – Antibacterial activity of gervao extract against *Staphylococcus aureus* oxacillin-sensible and oxacillin-resistant strains isolated from biological samples. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, 39 (4): 299-301, 2007.

SOUZA, A. S.; AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. – Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 37, n. 6, dec. 2000.