

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO E DE ALECRIM E DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS CONTRA *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*

### Resumo Expandido

Leticia Cordeiro<sup>1</sup>  
Douglas Stanguerlin<sup>2</sup>  
Fernanda Copatti<sup>3</sup>  
Greiz Roberta Oliveira Santanar<sup>4</sup>  
Ivan de Marco<sup>5</sup>  
Liziane Schittler<sup>6</sup>

### Resumo

A utilização de conservantes naturais que inibem ou minimizam a multiplicação de bactérias deteriorantes e patógenos indesejáveis é uma técnica alternativa para a indústrias de alimentos garantir a segurança dos produtos. Podem ser utilizadas culturas de micro-organismos com atividades antimicrobianas e óleos essenciais com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antioxidantes. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano e alecrim bem como de três isolados de bactérias ácido láticas contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A atividade dos óleos essenciais foi avaliada através do método de difusão em disco e a ação das BAL foi realizada pela técnica *spot-on-the-lawn*, de acordo com a atividade antimicrobiana. Como resultado encontrado observou-se que dos óleos essenciais, o orégano se mostrou, um ótimo inibidor do crescimento das culturas de *E. coli* e *S.aureus*, e o *Lactococcus casei* foi o único dos isolados que apresentou potencial antimicrobiano em relação as bactérias patogênicas.

**Palavras-chave:** Biopreservação. Antibacteriano. Orégano.

### Fundamentação/Introdução

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são as principais causas de enfermidades e mortes , só no ano de 2018 foram notificados 597 surtos, com 8.406 doentes, 916 hospitalizados e 9 óbitos relacionados às DTAs, dentre os micro-organismos

---

1Discente Mestrado Acadêmico em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), leticiacordeiro.mv@gmail.com

2Discente Mestrado Acadêmico em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), douglas\_stanguerlin@hotmail.com

3Discente Mestrado Acadêmico em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), fernandakruger19@hotmail.com

<sup>4</sup> Discente Mestrado Acadêmico em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), grezroberta12@gmail.com

<sup>5</sup> Discente Mestrado Acadêmico em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), ivandemarco22@gmail.com

<sup>6</sup> Docente Mestrado Acadêmico em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), lizianeschittler@gmail.com

envolvidos podemos citar a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Novas pesquisas veem sendo desenvolvidas com o intuito de aplicar compostos naturais oriundos de metabólitos microbianos ou de plantas na conservação de alimentos.

Dentre os compostos naturais de origem vegetal, destaca-se os óleos essenciais na conservação. Estes apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antioxidantes características de importância para a indústria alimentícia. Os óleos extraídos de plantas são constituídos por uma mistura complexa de compostos como alcaloides, flavonoides, isoflavonas, monoterpenos, ácidos fenólicos, carotenoides e aldeídos (BAKKALI *et al.*, 2008) que evidenciam o sabor e aroma bem como a atividade antimicrobiana dos mesmos. De acordo com Nascimento *et al.*, 2007, os óleos essenciais de plantas, são considerados mais seguros que os aditivos químicos e sintéticos para conservar os alimentos.

Na composição do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) predominam compostos como timol e o carvacrol (LI *et al.*, 2018). Já no óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), predomina os compostos borneol, verbenona, ácido rosmarínico e carnosol (ARAUJO, 2008).

As bactérias ácido lácticas, por sua vez, são bactérias que podem produzir compostos com atividade antimicrobiana (GÓMEZ *et al.*, 2000). Dentre os gêneros, destaca-se os *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*, que se caracterizam como Gram-positivas, não esporuladas (DUARTE *et al.*, 2013) e possuem como característica de principal produto da fermentação a produção de ácido láctico durante o metabolismo homofermentativo e heterofermentativo (BALCIUNAS *et al.*, 2013). As heterofermentativas, além de ácido láctico, formam outras substâncias antimicrobianas, como dióxido carbono, ácido acético, e etanol a partir da fermentação da glicose (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

## Objetivos

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano e alecrim bem como de BAL contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

## Delineamento e Métodos

Para as avaliações realizadas neste estudo, foram utilizadas as cepas patogênicas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, como indicadoras, recuperadas em Caldo Cérebro Coração a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h. Os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) foram adquiridos prontos no comércio da cidade de Pinhalzinho – Santa Catarina. As BAL foram isoladas de leite *in natura*, obtendo-se *Enterococcus faecalis* (fair 77), *Lactobacillus casei* e *Leuconostoc mesenteroides* recuperados em caldo Man Rogosa Shape (MRS) a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  por 24h. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia (MicroLab) do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) /Pinhalzinho–SC.

A atividade dos óleos essenciais de orégano e de alecrim foram avaliadas frente. *coli* e *S. aureus* utilizando método de difusão em disco, segundo método descrito por Ostrosky *et al.* (2008). Com auxílio de *swab*, inoculou-se  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> das culturas indicadoras em ágar Mueller-Hinton. Em seguida, adicionou-se discos de papel de filtro 6 mm e aplicou-se sobre os mesmos 15 µL dos óleos essenciais.

As placas foram incubadas a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Utilizou-se como controle positivo os antibióticos ampicilina 10  $\mu\text{g}$  e cloranfenicol 30  $\mu\text{g}$ .

Para avaliar a capacidade inibitória dos isolados de BAL contra os micro-organismos patogênicos foi utilizada a técnica *spot-on-the-lawn* adaptada de Fleming; Etchells; Costilow. (1975). Alíquotas de 2 $\mu\text{L}$  das culturas BAL foram inoculadas em placas contendo 10 mL de ágar MRS e incubadas a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h. Após adicionou-se uma sobrecamada de 8 mL de ágar BHI semi-sólido (0,8g.100 mL<sup>-1</sup> de ágar) contendo 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> das culturas de indicadores. Incubou-se a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h.

Os tamanhos dos halos de inibição, foram medidos utilizando paquímetro (Digimess®) e os resultados expressos em milímetros (mm) e os valores de referência para definição de resistência e inibição foram baseados segundo a metodologia de Mosbah *et al.*, 2018.

## Resultados e Discussão

O óleo essencial de orégano apresentou atividade contra *E. coli* e *S. aureus* produzindo halos de inibição de 25 mm (Tabela 1). Resultados semelhantes foram observados por Araújo e Longo (2016) que avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano, o qual apresentou atividade contra *E. coli* e *S. aureus*. Santos *et al.* (2011) observou que o óleo de orégano apresentou maior atividade antimicrobiana do que os óleos essenciais de alho e de cravo, com formação de halos inibitórios de 27 e 22 mm contra *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente.

Tabela 1 – Tamanho dos halos (mm) de inibição produzidos pela atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano e de alecrim e das BAL contra *E. coli* e *S. aureus*.

Material	Micro-organismos indicadores	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
	Tamanho do halo (mm)	
Óleo essencial Orégano	25,0	25,0
Óleo essencial Alecrim	00,0	00,0
<i>L. mesenteroides</i> (BAL)	00,0	0,00
<i>E. faecalis</i> (BAL)	00,0	00,0
<i>L. casei</i> (BAL)	15,0	15,0
Ampicilina (10 $\mu\text{g}$ )	15,0	20,0
Cloranfenicol (30 $\mu\text{g}$ )	10,0	15,0

Fonte: Elaborada pelos autores, 2019

A composição química dos óleos essenciais está diretamente relacionada com atividade antimicrobiana. O óleo essencial de orégano possui o carvacrol e o timol que são substâncias que apresentam ação antibacteriana (POZZO *et al.*, 2011). Estes compostos desestabilizam a membrana celular das bactérias, modificando sua permeabilidade e facilitando a morte celular, como pela formação de poros na membrana celular pela ação do carvacrol, que altera o gradiente de pH do interior da bactéria (BURT, 2004).

Os compostos antimicrobianos dos óleos essenciais podem variar em menor ou maior concentração em razão das condições climáticas e geográficas, da plantação, técnicas de colheita, extração do óleo e armazenamento (ALEXOPOULOS *et al.*, 2011). Na Tabela 1, podemos verificar que o óleo essencial

de alecrim não apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus* (Tabela 1).

Resultados semelhantes foram retratados por Castro Guimarães *et al.* (2017) e Haida *et al.* (2007) onde avaliaram a atividade antimicrobiana de oito extratos de plantas incluindo o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) contra *E. coli* e *S. aureus*. Os halos de inibição produzidos pelo extrato de alecrim foram de aproximadamente 6 e 7mm de diâmetro contra *E. coli* e *S. aureus*, considerado baixa ação inibitória deste composto.

Os compostos antimicrobianos dos óleos essenciais podem variar em menor ou maior concentração em razão das condições climáticas e geográficas, da plantação, técnicas de colheita, extração do óleo e armazenamento (ALEXOPOULOS *et al.*, 2011). Essas diferenças podem estar relacionadas com a positividade de antagonismo relatada por outros autores e nossos resultados, onde o alecrim não apresentou capacidade inibitória.

Dos três isolados de BAL, somente a *L. casei* apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus* produzindo halos de inibição de 15 mm (Tabela 1). Resultados inferiores foram relatados por Silva & Souza (2018), onde avaliaram isolados de *L. casei* e produziram halos de inibição de 4,0 a 9,0 mm contra *E. coli* (SILVA e SOUZA, 2018). Já Guimarães *et al.*, (2018), avaliou isolados de *Lactobacillus* sp contra *E. coli* e verificou a formação de halos de inibição de 14 mm.

A produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas podem influenciar na inibição de patógenos. Autores como Souza (2016), Duarte *et al.* (2016), Figueroa-Gonzalez *et al.*, 2010) o antagonismo de *L. casei* contra *S. aureus* provavelmente se deve a produção de metabolitos como ácido láctico, peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono, acetaldeído e bacteriocinas com atividade antimicrobiana.

Considerando que de acordo com Mosbah *et al.* (2018) a zona de inibição com tamanho entre 11,0 e 15,0 mm corresponde alta atividade e 12,0 - 20,0 mm muito alta atividade, o *L. casei* e o óleo essencial de orégano apresentam alta atividade e muita alta atividade antimicrobiana.

### Considerações Finais

O óleo essencial de orégano apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*. Essa inibição deve-se pelo fato de o óleo de orégano possuir em sua composição constituintes como carvacrol e timol em maiores concentrações, que geram ação antibacteriana sobre esses microrganismos patogênicos.

Dos três isolados de BAL de leite *in natura*, o *L. casei* apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus* com observação apenas das diferenças no crescimento e formação de halos. A atividade antagonista se deve provavelmente pela produção de ácidos orgânicos, de peróxido de hidrogênio, de diacetil, de dióxido de carbono, de acetaldeído e de bacteriocinas pelo *L. casei*.

Como observado, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano sugere o uso potencial deste óleo como uma alternativa aos antimicrobianos e conservantes sintéticos. A aplicação de BAL, com ênfase na produção de bacteriocinas é uma técnica de bioconservação bastante promissora, que possibilita estender a vida útil dos alimentos e aumentar a sua segurança por meio da aplicação de uma microbiota protetora. Nossos resultados foram positivos para a produção de substância antagonista pelo *L. casei* contra micro-organismos patogênicos.

O uso de BALs e de óleos essenciais são importantes alternativas de conservação. Podem agir inibindo bactérias de origem alimentar que causam DTAs e prolongam a vida de prateleira de alimentos processados, disponibilizando aos consumidores alimentos seguros, minimizando riscos de infecções microbiológicas.

## Referências

- ALEXOPOULOS, A. *et al.* Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Anaerobe**, v. 17, n° 6, p. 399-402, Dec. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996411000497> Acesso em: 02/06/2019.
- ARAUJO, M. A. J. Química dos alimentos-teoria e prática. 4. ed. Viçosa: UFV, 2008. p. 596.
- ARAUJO, M. M.; LONGO, P. L. *In vitro* antibacterial activity of *Origanum vulgare* (oregano) essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. **Arquivo do Instituto Biológico**, vol. 83, São Paulo, 2016. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1808-16572016000100220](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572016000100220) Acesso em: 01/06/2019
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – a review. **Food Chemical Toxicological**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BALCIUNAS, E.M. *et al.* Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p.134-142,2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512006275> Acesso em: 27/05/2019.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil – Informa 2018**. Secretaria de Vigilância e Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Maio, 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf> . Acesso em 11 jul. 2019.
- 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. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504001680> Acesso em: 02/06/2019
- CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12546196> Acesso em : 27/05/2019.
- CASTRO GUIMARÃES, C. *et al.* A. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-india (*Caryophyllu saromaticus* L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n° 2, 2017.
- DUARTE, M. C. K. H. *et al.* Ação antagonista de bactérias lácticas frente ao crescimento de estirpe patogênica. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v.9, n.16, p.25, Goiânia, 2013.
- DUARTE, M. C. K. H. *et al.* Lactobacillus *acidophilus* antagonistic action against pathogenics trains inoculated in the fermented milk. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 03, n. 1, p.1-10, 2016.
- FIGUEROA-GONZALEZ, I. *et al.* Antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403. **Revista Mexicana de Engenharia Química**, v. 9, n. 1, p. 11-16, Abr., 2010.
- FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from Cucumber brines. **Applied Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1040-1042, 1975. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC376587/> Acesso em: 02/06/2019.



GUIMARÃES, F. *et al.* Selection of lactic bacteria with probiotic potential from fermented bovine transition milk. **Interciência**, vol. 43, n.2, 2018.

GÓMEZ, R.M.J. *et al.* Las bacteriocinas de las bacterias lacticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Revista de tecnología e higiene de los alimentos**. v.37, n.314, p.59-66, 2000.

HAIDA, K. S. *et al.* Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivo de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 11, n. 3, 2007.

LI, J. *et al.* Combined effects of octenyl succination and orégano essential oil on sweet potatoes tarch films with na emphasison water resistance. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.115, n1, p.547–553, China, 2018.

NASCIMENTO, P. F. C. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

OLIVEIRA, V.E.C. *et al.* Inibição de *Staphylococcus aureus* em caldo e caldo de carne utilizando sinergias de fenólicos e ácidos orgânicos. **Revista Internacional de Microbiologia de Alimentos**. v.137, n.2-3,p.312-316,2010.

OSTROSKY, E.A. *et al.* Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, São Paulo, 2008.

POZZO, M. D. *et al.* Antimicrobial activities of essential oils extracted from spices against *Staphylococcus* spp isolated from goat mastites. **Ciência Rural**, vol. 41, n.4, Santa Maria, Apr, 2011.

SANTOS, J. C. *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from oregano, garlic, clove and lemon against pathogenic bacteria isolated from *Anomalocardia brasiliiana*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1557-1564, out./dez. 2011.

SILVA, C. P; SOUZA, S. M. O. **Evaluation of the probiotic and antagonista potential of lactic acid bacteria isolated of milk raw búfala**. Anais do 14° Simpósio de TCC e 7° Seminário de IC da Faculdade ICESP, vol. 14, p. 1404-1413, 2018.

SOUZA, R. F. S. **Implicação das sortases de *Lactobacillus casei* na inibição da internalização de *Staphylococcus aureus* em células epiteliais mamárias bovinas**. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. 2016. p. 167. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUOS-APMP2D> Acesso em: 25/05/2019.