



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL
CATARINENSE

Curso de Tecnologia em alimentos

Trabalho de Conclusão de Estágio



**Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Alecrim
(*Rosmarinus officinalis*) e Sálvia (*Salvia officinalis*) para aplicação em alimentos**

Tamires Silveira Cordeiro

Raquel Piletti¹

Resumo: Tendo em vista a crescente preocupação dos consumidores com a segurança dos alimentos aliada a uma alimentação saudável, é notória a necessidade de encontrar novos compostos naturais com propriedade antimicrobiana. Atualmente o uso dos óleos essenciais como aditivo em alimentos vem se difundido apresentando uma nova perspectiva de uso, com o objetivo de substituir alguns dos aditivos sintéticos, visando à conservação e conseqüentemente o aumento da vida de prateleira, além de proporcionar um sabor e aroma diferenciados. Neste trabalho os óleos essenciais de alecrim e sálvia foram avaliados a fim de verificar sua atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* utilizando o método de difusão em ágar e através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). As atividades antimicrobianas dos óleos essenciais de alecrim e sálvia apresentaram diferenças consideráveis quando submetidas ao teste de difusão em ágar, formando halos de inibição para a cultura de *Staphylococcus aureus* de 1,60 cm para sálvia e 2,65 cm ± 0,071 para o alecrim, comprovando a eficiência bacteriostática. Porém, não observou-se formação de halo em *Escherichia coli*. Os resultados do teste de concentração inibitória mínima comprovaram eficiência bacteriostática para ambos os óleos testados, possivelmente pelo fato de que neste teste ocorre um maior contato com a suspensão bacteriana. Esses resultados potencializam ainda mais a utilização de extratos naturais em alimentos por suas diversas propriedades.

Palavras-chave: óleos essenciais, alimentos, alecrim, sálvia, atividade antimicrobiana.

1. Introdução

O estudo de produtos naturais com potencial de aplicação em alimentos tem despertado cada vez mais interesse das indústrias pela necessidade de produzir alimentos com menos aditivos sintéticos, propriedades organolépticas preservadas e extensa vida de prateleira (STEURER, 2008). Esse interesse vem aumentando também

¹ Professora Orientadora.

devido à procura dos consumidores por alimentos saudáveis e mais próximos ao natural.

Os aditivos sintéticos utilizados pela indústria de alimentos são considerados seguros, mas sua utilização encontra cada vez mais restrições pela regulamentação internacional. Por essa razão, pesquisas são necessárias para que aditivos naturais e atóxicos possam ser utilizados em substituição aos aditivos sintéticos para prevenir a deterioração dos alimentos.

De acordo com Machado *et al.* (2011) e Souza *et al.* (2003), nas últimas décadas têm sido um desafio para os produtores de alimentos atender as exigências legais para garantir a segurança alimentar, como também corresponder as expectativas associadas às exigências dos consumidores particularmente preocupados com a saúde e conscientes dos possíveis efeitos dos aditivos sintéticos usados na conservação dos alimentos. Desta forma, estudam-se novos compostos que venham auxiliar na coerente substituição dos conservantes, constantemente utilizados no controle do crescimento microbiano, e que sejam possíveis de uma inclusão em um sistema de conservação de alimentos. Neste contexto, óleos essenciais de plantas condimentares já utilizados como flavorizantes e com elevado potencial antimicrobiano ganham uma nova perspectiva de uso.

De acordo com Souza *et al.* (2003), a indústria alimentícia visa à produção de alimentos inócuos e que apresentem vida longa de prateleira. A utilização de substâncias naturais de origem vegetal, torna o alimento mais atrativo ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas.

Além dos benefícios proporcionados à saúde, diversos estudos têm demonstrado o efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de microrganismos deterioradores e patogênicos veiculados por alimentos. (PEREIRA *et al.*, 2006).

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de sálvia e alecrim para possível aplicação em alimentos como alternativa de substituição a alguns aditivos antimicrobianos sintéticos.

2. Revisão de Literatura

2.1 Deterioração dos alimentos

Garantir a segurança, e ao mesmo tempo atender a demanda para a conservação de atributos nutricionais e de qualidade, têm resultado na crescente busca de conservantes naturais com potencial aplicação em alimentos que possam ser utilizados sozinhos ou em combinação com outra tecnologia. Todavia, a escolha do antimicrobiano deve ser baseada na compatibilidade química e sensorial deste com o alimento alvo, na sua efetividade contra microrganismos indesejáveis, segurança, dentre outras características (SETTANNI; CORSETTI, 2008).

De acordo com Souza *et al.* (2003), os compostos de natureza vegetal, em especial as especiarias e seus produtos derivados (óleos essenciais e extratos), apresentam um potencial relevante como agentes de inibição do crescimento de microrganismos, mostrando que elementos que se apresentavam apenas como vetores de aromas e gostos característicos, atualmente apresentam uma nova perspectiva de emprego.

Os alimentos, quer sejam industrializados ou não, mantêm-se em constante atividade biológica, manifestada por alterações de natureza química, física, microbiológica ou enzimática, levando a perda de qualidade e redução da vida de prateleira. Destas alterações, as que requerem atenção especial em relação à segurança do consumidor, são as microbiológicas e antioxidantes (HRAS *et al.*, 2000).

A deterioração causada por microrganismos é uma das principais preocupações para as indústrias de alimentos, pois esta ocorre por parâmetros intrínsecos, como pH e atividade de água e além disso, o crescimento microbiano se dá em função da temperatura e nutrientes disponíveis para o seu desenvolvimento. Portanto, alimentos ricos em proteínas, vitaminas e aminoácidos são mais susceptíveis a esse tipo de deterioração. Outro fator importante que leva a deterioração e perda de qualidade dos alimentos é a oxidação de lipídeos. Quando os lipídeos são expostos a fatores ambientais como oxigênio, luz e temperatura, reações de oxidação começam a produzir compostos indesejáveis, sabores e odores rançosos e perda de coloração (HRAS *et al.*, 2000).

O que direciona diversos estudos a verificarem o efeito antimicrobiano de alguns condimentos no desenvolvimento de microrganismos deterioradores e patogênicos veiculados por alimentos (PEREIRA *et al.*, 2006).

A presença de microrganismos patogênicos e suas toxinas, como *Escherichia coli* causa sérios problemas à saúde dos consumidores, além de reduzir a vida útil dos alimentos, provocando grandes perdas econômicas (Souza *et al.*, 2003).

A bactéria *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno devido à sua virulência, resistência aos antimicrobianos e associação a várias doenças, incluindo enfermidades. Esta bactéria habita a pele, a orofaringe e com frequência a nasofaringe do ser humano, a partir da qual pode facilmente contaminar as mãos do homem e contaminar o alimento, devido à falta de cuidado dos manipuladores, como a não obediência das boas práticas e lavagem incorreta das mãos (XAVIER *et al.*, 2007). Ainda de acordo com o mesmo autor, o *Staphylococcus aureus* é considerado o segundo ou terceiro mais comum patógeno causador de intoxicação alimentar, perdendo em número apenas para *Salmonella* sp. e competindo com o *Clostridium perfringens*.

2.2 Extratos naturais

A utilização de plantas aromáticas, possuidoras de óleos essenciais, geralmente com ações flavorizantes, comprovada ação antibacteriana e antioxidante, pode ser uma alternativa importante para a conservação de alimentos, diminuindo a concentração de aditivos sintéticos nesses produtos (MOREIRA *et al.*, 2005).

Pierozan *et al.* (2009), afirmam que os óleos essenciais extraídos de matrizes vegetais têm sido considerados como inibidores de agentes patogênicos humanos tais como *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Salmonella* sp., *Mycobacterium* sp., *Vibrio vulnificus*, entre outros.

Ainda de acordo com Pierozan *et al.* (2009), que definem óleos essenciais como misturas complexas, de substâncias voláteis, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, os quais contribuem para a sua caracterização e isolamento. Contendo uma combinação de terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, ou

mesmo de pesos moleculares baixos os hidrocarbonetos alifáticos (lineares, ramificados, saturados e insaturados), ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas e os compostos de azoto e de enxofre, exclusivamente, cumarines, e homólogos de *phenylpropanes*.

A literatura atual apresenta inúmeros relatos sobre atividade biológica de extratos vegetais, como ação antifúngica (Alaniis-Garza *et al.*, 2007; Korukluoglu *et al.*, 2008), ação antibacteriana (Zhang *et al.*, 2007; Al-Turki *et al.*, 2008), atividade anti-tumoral (Jiménez-Medina *et al.*, 2006; Kaileh *et al.*, 2007), ação antiinflamatória e analgésica (Bose *et al.*, 2007; Díaz- Viciado *et al.*, 2008) atividade antioxidante (Ferrerres *et al.*, 2007; Starzyniska-Janiszewska *et al.*, 2008), atividade antimicrobiana (Settanni; Corsetti, 2008), dentre outras.

Neste intuito, os elementos de natureza vegetal, em especial as especiarias e seus produtos provenientes, aparecem com relevante importância no seu possível uso como prováveis agentes inibitórios do crescimento microorgânico. Assim, estes elementos que antes se apresentavam principalmente, como agentes vetores de aromas e gostos característicos aos alimentos, apresentam agora uma nova perspectiva de emprego (SOUZA, 2003).

Rosmarinus officinalis o alecrim comumente conhecido, pertencente à família *Lamiaceae* é originária de países do mediterrâneo é também cultivada no Brasil. Entre as propriedades medicinais é conhecida a antiséptica. Estudos já realizados identificaram 33 compostos químicos no óleo essencial de alecrim, os principais foram α -pineno, 1,8-cineol, cânfora, verbenona e borneol, constituindo cerca de 80% do total do óleo (SANTURIO, 2011).

A sálvia (*Salvia officinalis*) tem sido extensivamente estudada e reconhecida por sua capacidade antioxidante relacionada aos seus compostos fenólicos. Povh *et al.* (2008), identificaram os constituintes antioxidantes da sálvia como sendo carnosol, rosmadial, ácido carnosínico, rosmanol e epirosmanol, previamente encontrados em alecrim, e notadamente conhecidos por suas propriedades antioxidantes.

O primeiro estudo sobre propriedades antimicrobianas, publicado em 1880, descreve a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de mostarda, cravo da Índia e canela. Extratos de alho, canela, curry, mostarda, manjeriço, gengibre e outras ervas exibem também essas propriedades. Extratos do cravo da Índia reduzem o número de *Escherichia coli* e outras bactérias durante a armazenagem de sucos, leites e chás (BOYLE 1995; KAUR, 1999 *apud* ERNANDES; GARCIA, 2007).

3. Materiais e Métodos

3.1 Análises microbiológicas

Segundo Tortora *et al.* (2005), as drogas antimicrobianas ou são bactericidas (matam o microrganismo diretamente) ou são bacteriostáticas (impedem o crescimento do microrganismo). Esta ação antimicrobiana pode ocorrer por vários modos de ação como, inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese proteica, dano a membrana plasmática, inibição da síntese de ácidos nucleicos e inibição da síntese de metabólitos essenciais.

Para avaliar a eficiência antimicrobiana dos extratos naturais de sálvia e alecrim, foram realizados os testes microbiológicos “Concentração Inibitória Mínima” (CIM) e Difusão em Ágar.

3.1.1 Teste Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM é determinada com uma sequência decrescente de concentrações do composto em um caldo, que é então inoculado com uma bactéria-teste (Tortora *et al.*, 2005). Considera-se a CIM a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento bacteriano, (fenômeno observado pela leitura da absorbância) após incubação a 37°C por tempo determinado (NCCLS, 2003).

Os testes foram realizados em triplicatas, iniciando-se com o preparo dos tubos de ensaio contendo o meio de cultura LB Broth e a suspensão bacteriana. Em cada tubo incorporou-se uma concentração 10 µL/mL dos óleos de sálvia e alecrim. Os tubos permaneceram em estufa de incubação a 37 °C por 24 horas, sendo mantida agitação

constante em um agitador Phoenix, AP -56 e posterior leitura em espectrofômetro Shimadzu, UV 1800, a 600 nanômetros (nm).

3.1.2 Teste de Difusão em àgar

O método empregado foi o de descrito por Althertum *et al.* (1999), que consiste na fixação de um papel filtro impregnado com um antimicrobiano ou na abertura de um poço devidamente preenchido com o antimicrobiano em questão, na superfície de um meio de cultura sólido apropriado previamente semeado com a bactéria teste, o crescimento bacteriano poderá ser inibido, formando-se então um halo de inibição em torno do disco ou poço (zona onde não há crescimento bacteriano), cujo diâmetro varia de acordo com a velocidade de difusão do antimicrobiano testado e a sensibilidade da bactéria.

Em cada poço da placa de petri contendo ágar PCA (*Plate Count Agar*) colocou-se 100µL dos óleos de sálvia Posteriormente às placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 2 horas. Após a incubação procedeu-se a medição dos halos com régua milimetrada, considerando-se a menor distância entre os halos.

O objetivo do teste foi avaliar a eficiência bacteriostática dos óleos de sálvia e alecrim através do diâmetro dos halos de inibição formados.

4. Resultados e Discussões

Os resultados indicaram que os óleos de sálvia e alecrim apresentaram halo de inibição consideráveis para a cultura de *Staphylococcus aureus*, sendo de 1,60 cm e 2,65 cm ± 0, 071 respectivamente, comprovando assim efeito bacteriostático, mas ambos os óleos testados não apresentaram formação de halo para a cultura de *Escherichia coli* (conforme figuras 1, 2 e 3).

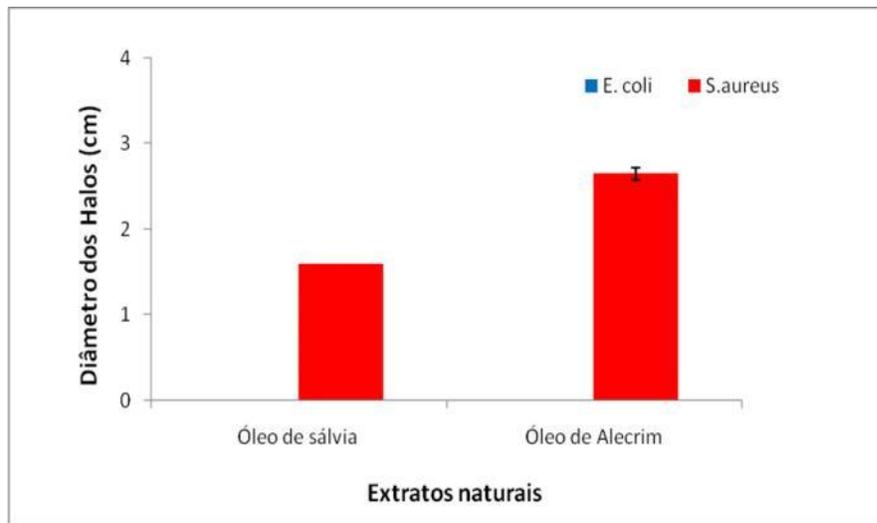


Figura 1 - Média do diâmetro dos halos de inibição do teste de difusão em ágar para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

De acordo com Burt (2004), este resultado pode ser atribuído ao fato de que as bactérias Gram – positivas, *Staphylococcus aureus* são mais sensíveis que as Gram – negativas, *Escherichia coli*, devido à presença da membrana externa que restringe a difusão dos compostos hidrofóbicos através dos lipopolissacarídeos.

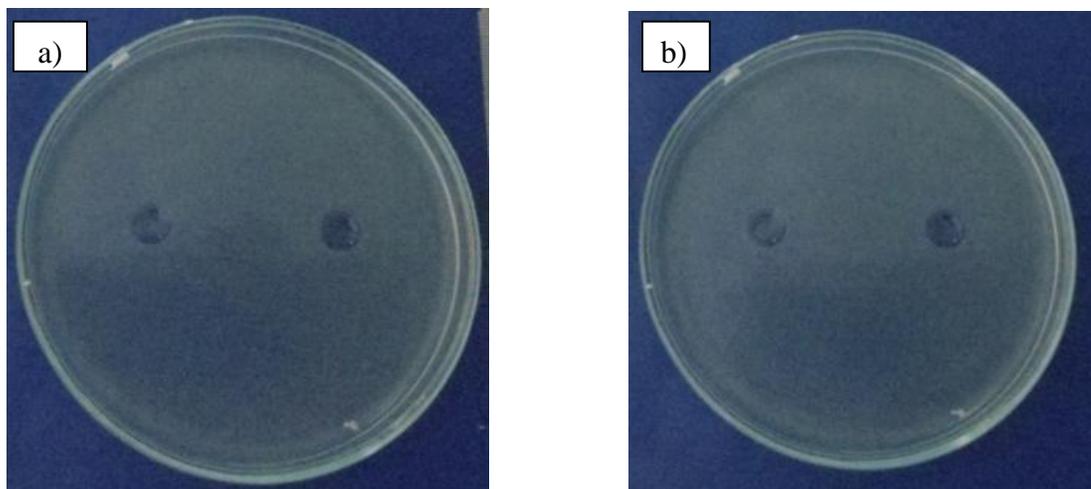


Figura 2 - Difusão em ágar para os óleos essenciais de alecrim (a) e sálvia (b) para a bactéria *E. coli*.

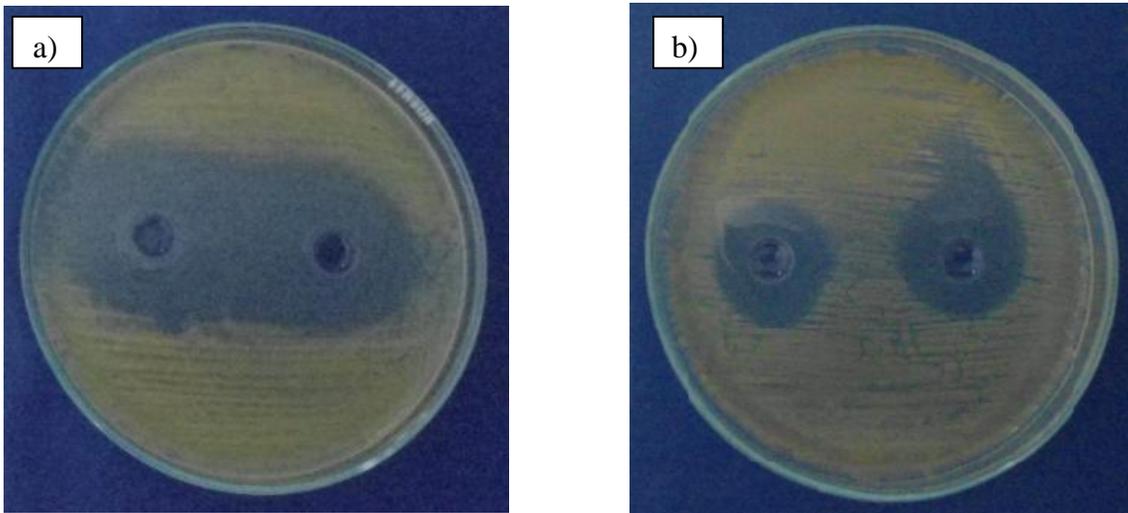


Figura 3 - Difusão em ágar para os óleos essenciais de alecrim (a) e sálvia (b) para a bactéria *S. aureus*

A figura 4 mostra os resultados do teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os óleos de alecrim e sálvia. Pode-se perceber que os valores da absorbância das amostras contendo os óleos essenciais foram menores quando comparadas a da amostra controle, indicando uma redução no crescimento bacteriano.

Os valores encontrados para amostra controle de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram de $1,578 \pm 0,006$ e $1,546 \pm 0,060$ respectivamente.

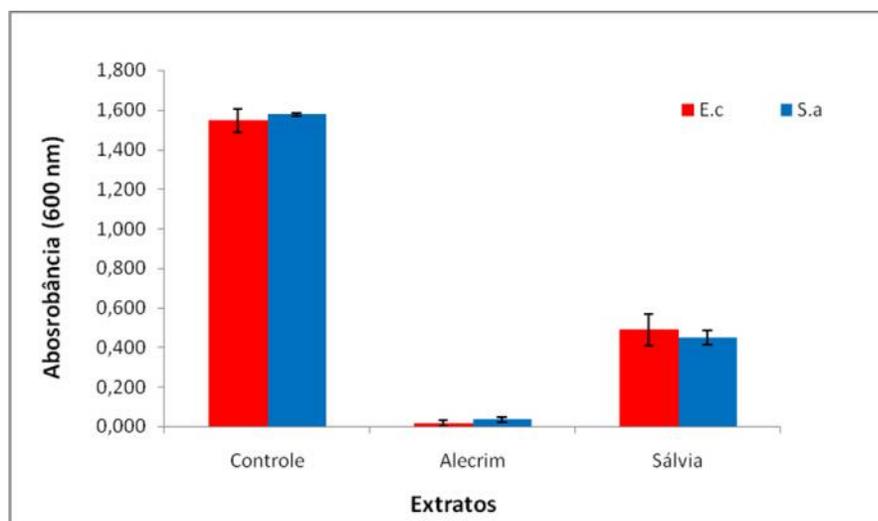


Figura 4 - Teste de Concentração Inibitória Mínima – CIM para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Além disso, quando comparados os resultados de absorvência das amostras contendo os óleos observa-se que o melhor resultado é para o óleo de alecrim ($0,035 \pm 0,014$) e ($0,018 \pm 0,015$) sendo este o mais efetivo contra bactérias do que o óleo de sálvia ($0,450 \pm 0,037$) e ($0,490 \pm 0,078$), evidenciando quase total inibição de crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente.

Resultados semelhantes foram encontrados em estudos de efeitos antimicrobiano de alguns óleos por Poiana *et al.* (2008), que também observaram a eficiência bacteriostática do óleo essencial de alecrim, e que assim como outros óleos, por possuir como principais constituintes em sua composição compostos como 1,8 cineol, cânfora e borneol, apresentam ação antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Após a realização dos testes microbiológicos observou-se que os resultados encontrados foram confrontantes quando comparados a não formação de halos e a redução da absorvência das amostras com os óleos essenciais frente à bactéria *Escherichia coli*. Este resultado é explicado ao fato de que no teste de difusão em ágar a formação de halo é proporcional a difusão dos óleos, e que por ter sido relativamente baixa não foi suficiente para inibir o crescimento da *E. coli*, que conforme citado anteriormente, possui maior resistência em comparação a *S. aureus*. Já para o teste de concentração inibitória mínima, o contato entre os óleos e a suspensão bacteriana é maior, e proporciona o efeito para ambas as bactérias.

De acordo com Moreira *et al.* (2010) e Steurer (2008), a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é clara, mas o mecanismo de ação antimicrobiana ainda não está completamente entendido. Há consenso de que os compostos aromáticos e fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana, onde exercem seus efeitos diretamente na membrana citoplasmática, provocando alterações na sua estrutura e funções. Os mesmos autores afirmam que componentes presentes em menor quantidade também desempenham seu papel importante, envolvendo-se em interações sinérgicas com os compostos fenólicos. Ainda de acordo com Steurer (2008), esses mecanismos não funcionam como alvos separados e podem ocorrer em consequência dos outros.

Quanto à quantidade de óleos essenciais a ser empregada Burt (2004), afirma que varia muito conforme o sabor e, além disso, a eficiência relativa muda conforme a composição do produto, bem como a metodologia empregada nos ensaios também gera dificuldades de comparação entre os resultados obtidos.

5. Considerações finais

Diante dos resultados obtidos nos testes microbiológicos, pode-se concluir que os óleos essenciais de sálvia e alecrim apresentam-se como alternativa promissora para aplicação em alimentos, visando prevenir a deterioração e conseqüente aumento da vida de prateleira. Podem ser usados principalmente para auxiliar na prevenção da contaminação proveniente da manipulação de alimentos, sobretudo para a bactéria *Staphylococcus aureus* que é encontrada na pele dos seres humanos.

As principais vantagens da utilização de extratos naturais em alimentos é que além da atividade antimicrobiana, proporcionam ao consumidor uma opção pela escolha de um alimento com substâncias conservadoras naturais, não apresentam efeito tóxico mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas.

Pode-se concluir também que são necessários mais testes microbiológicos para avaliar as concentrações a serem utilizadas, com atividade antimicrobiana, mas sobretudo sem alterar as características sensoriais dos alimentos.

6. Referências Bibliográficas

ALTERTHUM, Flavio TRABULSI, Luiz Rachid; GOMPERTZ, Olga Fischman. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586 p.

BURT, S.A. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

ERNANDES, Fernanda Maria Pagane Guerreschi; GARCIA-CRUZ, Crispin Humberto. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. **B.CEPPA**, v. 25, n. 2, p. 193-206, 2007.

HRAS, A. R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbylpalmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 229-233, 2000.

MACHADO *et al.* Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. **Embrapa Agroindustrial Tropical ISSN**, v. 2179-8184, n. 145, p. 31, 2011.

Moreira, M. R., Ponce, A. G., Valle, C. E., & Roura, S. I. (2005), *apud* BARBOSA, Lidiane Nunes. Propriedade **antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e amburguer bovino e testes de aceitação**. 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Instituto de Biocências, Universidade Estadual Paulista, 2010.

NCCIS Testes de susceptibilidade antimicrobiana de *Acinetobacter* spp. pelo NCCLS Microdiluição caldo e difusão em disco. **J Clin Microbiol**, v.42, n. 11, p. 5102-5108, 2008.

PEREIRA; M.C.; VILELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N.; PICCOLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PIEROZAN *et al.* Caracterização química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies de *Sálvia* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Vol. 29, nº 4.2009.

POIANA *et al.* Antimicrobial Effect of Some Essential Oils. **Journal of Essential Oil Research**, v.20 p. 373-379, 2008.

POVH, J. A; ONO, E.O. Crescimento de plantas de *Salvia officinalis* sob ação de reguladores de crescimento vegetal. **Ciênc. Rural**, v. 38, n. 8, 2008.

SANTURIO, D.F. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos sobre *Escherichia coli* isoladas de suínos, aves e bovinos**. 2011. 56 f. Dissertação

(Mestrado) Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria RS, 2011.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 123-138, 2008. *apud* MACHADO, T. F. Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. Embrapa Agroindustrial Tropical, ISSN 2179-8184, 145, 2011.

SOUZA, Evandro Leite *et al.* Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene Alimentar**, v.17, n.113, p. 38-42, 2003.

STEURER. F. **Especiarias: aplicações e propriedades**. 2008. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Química de alimentos, Universidade Federal de Pelotas RS, 2008.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8.ed Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

XAVIER et al. Prevalência de *Staphylococcus aureus* em manipuladores de alimentos das creches municipais da cidade de Natal. **RBAC**, vol. 39, nº3, p. 165-168, 2007.