

Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) contra *Salmonella sp.*

Sonia Maria Hentz*
Nei Carlos Santin**

Resumo

Os extratos de Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) são famosos por suas propriedades antioxidantes e conservantes. O valor condimentar de uma planta está quase sempre associado ao teor de óleos essenciais, os quais são compostos químicos, produtos secundários do metabolismo, gerados durante seu desenvolvimento. Considerando as informações a respeito da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim, do interesse por sua aplicação em substituição a aditivos químicos e a importância do gênero *Salmonella* associado à toxi-infecções, há necessidade de avaliação da atividade, concentrações e efeitos do óleo essencial de alecrim sobre *Salmonella*, bem como avaliação das técnicas biotecnológicas capazes de facilitar e melhorar o processo de produção, extração e aplicação desses compostos. No presente estudo foi avaliada a ação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de Alecrim (*R. officinalis L.*) contra *Salmonella sp.* Foi utilizado o método de disco de papel filtro para avaliar a ação de inibição do óleo essencial comercial. Os resultados indicaram que a inibição do óleo essencial puro contra *Salmonella sp.* foi menor que a inibição do antibiótico usado como controle positivo. Concluiu-se que o óleo essencial comercial de Alecrim inibe *Salmonella sp.* apenas na sua forma pura (sem diluição).

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis L.* Antimicrobianos. *Salmonella sp.*

* Biotecnóloga Industrial pela Universidade do Oeste de Santa Catarina (Unoesc) Campus de Videira; Rua Paese, 198, Bairro Universitário, 89560-000, Videira, SC; btisonia@gmail.com

** Farmacêutico-Bioquímico; Mestre em Ciência de Alimentos; professor do Curso de Farmácia da Universidade do Oeste de Santa Catarina Campus de Videira.

1 INTRODUÇÃO

Como relatam Silva et al. (2008) é crescente, na sociedade moderna, o interesse em terapias alternativas e uso terapêutico de produtos naturais. Desde a antiguidade as plantas são utilizadas nas sociedades humanas com propósitos terapêuticos; suas propriedades tóxicas ou curativas foram descobertas ao acaso, durante a busca por alimentos.

Com o aperfeiçoamento de novas técnicas de extração e identificação, é possível elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificadas. Os metabólitos secundários vegetais apresentam grande valor socioeconômico.

Segundo Porte e Godoy (2001), apesar de o alecrim ser cultivado em quase todo o território brasileiro e importado como condimento para o consumo interno, poucos estudos têm sido realizados sobre a atividade antimicrobiana exercida em alimentos nos quais é utilizado.

Substâncias antimicrobianas de plantas são detectadas, principalmente, por meio da observação de sua capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos expostos a estes compostos; os resultados sofrem influências dos métodos e micro-organismos utilizados (SOUZA; AVANCINI; WIEST, 2000).

As bactérias do gênero *Salmonella* são amplamente distribuídas pelo mundo e correntes nos ambientes de produção animal, constituindo-se potencial problema sanitário à saúde pública. Responsáveis pela maioria das infecções toxicoalimentares pela forma de contágio, dada pela ingestão de água ou alimentos contaminados.

Considerando as informações a respeito da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim, do interesse pela sua aplicação e a importância do patógeno *Salmonella* é evidente a necessidade de avaliação da atividade, determinação dos tipos de compostos secundários, concentrações e efeitos sobre bactérias desse gênero.

Em virtude da incipiência da segurança e da efetividade do uso do óleo essencial de alecrim como agente antimicrobiano, visou-se aprofundar o estudo em relação à aplicação do óleo de alecrim na inibição de patógenos, especialmente *Salmonella* sp. Assim, este estudo avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp.

1.1 FAMÍLIA LAMIACEA

O alecrim, pertencente à Família Lamiaceae, 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).

A espécie *Rosmarinus officinalis* L., conhecida usualmente como alecrim, é procedente da Região Mediterrânea e possui porte subarborescente lenhoso, ereto e pouco ramificado de até 1,5 m de altura. As folhas, muito aromáticas, medem de 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura (LORENZI; MATOS, 2006).

Os compostos ativos presentes no *Rosmarinus* são considerados como biomoléculas secundárias. As partes utilizadas das plantas são as folhas e as sumidades floridas, de onde é obtido o óleo essencial (CARVALHO; ALMANÇA, 2003). Na farmacologia é empregado *in natura*, como outras drogas vegetais ricas em óleos voláteis, na preparação de infusões, na forma de preparações galênicas ou na aromatização de fórmulas destinadas ao uso oral (FURLAN, 1998).

Variações no clima, solo, exposição ao sol e extração interferem na composição química da planta e nas indicações terapêuticas. A parte utilizada para o preparo do óleo essencial e do subtipo (ecotipo) da planta têm influência na composição química do preparado (FARIA, 2005).

Segundo De La Cruz ([entre 1997 e 2003]), o uso de plantas aromáticas é tão antigo como a história da humanidade. O valor condimentar de uma planta está quase sempre associado ao teor de óleos essenciais, que são compostos químicos secundários gerados durante seu desenvolvimento (SOUZA et al., 2004).

De acordo com Porte e Godoy (2001), a maior parte dos óleos essenciais de plantas condimentares é extraída por diferentes técnicas de destilação a vapor.

As propriedades antimicrobianas dos condimentos e de seus óleos essenciais têm sido estudadas, principalmente, em relação ao efeito inibidor de micro-organismos patogênicos, presentes em alimentos (SOUZA et al., 2004).

Segundo Silva et al. (2008), o óleo essencial de alecrim é constituído por hidrocarbonetos mono-terpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona e acetato de isobornila. Os terpenoides são representados pelo carnosol, ácidos carnosílico, oleânico, ursólico, entre outros.

Na revisão feita por Porte e Godoy (2001), consta que as concentrações de alecrim, para exercerem os efeitos antibacterianos desejados, são maiores que as utilizadas costumeiramente em alimentos para propósitos flavorizantes. Contudo, associados a outros agentes, podem contribuir para o controle do crescimento bacteriano e impedir a rancificação de alimentos. Collin e Charles (1987 apud PORTE; GODOY, 2001) declararam que o alecrim possui ação bactericida contra *Staphylococcus aureus* em carne.

Os testes antimicrobianos que confirmam a ação do óleo essencial consistem no cultivo de micro-organismos em presença de suposto agente antimicrobiano e posterior verificação de presença ou ausência de proliferação bacteriana ou do micro-organismo em questão (RUBEL et al., 2002).

De acordo com González (2002), é preciso contar com uma técnica padronizada, reconhecer as limitações da técnica de difusão em ágar, conhecer os meios e adequar o estudo de acordo com o agente causador da infecção e o próprio antimicrobiano em questão.

As salmonelas são bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, pertencentes à Família Enterobacteriaceae. A temperatura ótima de crescimento é 37°C, e a faixa de pH ideal encontra-se entre 4,5 e 9,5. Têm capacidade de produzir ácido e gás a partir de glicose e outros carboidratos e, geralmente, não utilizam lactose e sacarose. São catalase positiva e oxidase negativa e são capazes de crescer utilizando citrato como única fonte de carbono (D'AOUST, 2001). Sua patogenicidade modifica-se dependendo da idade e das condições de saúde do hospedeiro. Elas são responsáveis pela salmonelose, uma infecção alimentar que, pelas suas características de endemicidade, morbidade e, em particular, pela dificuldade de controle, ocupa posição de destaque em saúde pública (ANDRADE, 2005).

2 METODOLOGIA

Este estudo baseou-se na execução de testes antimicrobianos para *Salmonella* sp.; com abordagem discursiva, incluindo coleta de material e análises laboratoriais. Foi realizado nas dependências do Núcleo Biotecnológico, no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina (Unoesc) Campus de Videira.

A cepa de *Salmonella sp* foi cedida pela professora Doutora Jane Gelinski, do laboratório de microbiologia de alimentos da Unoesc (Videira, SC). A cepa de *Salmonella sp*. foi cultivada em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) antes de ser usada. O óleo essencial de alecrim, de marca comercial, foi adquirido em farmácia local. Os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante: Meio *Salmonella Shigella* (SS), Meio Muller Hinton (MH) e Ágar Padrão para Contagem (PCA). Todos os meios de cultura utilizados foram da empresa Oxoid (Inglaterra) exceto para o Ágar MH (Merck, Alemanha). Os testes foram realizados em duplicatas. O óleo foi utilizado puro e até a diluição 10^{-7} .

A diluição tanto do óleo essencial quanto da cepa de *Salmonella sp*. usados nos testes foi realizada por meio de diluição decimal seriada (10^{-1} até 10^{-7}). Para a utilização da cepa de *Salmonella*, esta foi diluída em água destilada esterilizada e, para a diluição do óleo, utilizou-se uma solução hidroalcoólica a 10%.

No Brasil, os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária com autorização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (NCCLS) (BRASIL, 2003); são desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais, como os antibióticos. Nos testes de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, a metodologia padrão do CLSI não pode ser seguida à risca, em razão das propriedades químicas que estes apresentam. Utiliza-se uma pequena modificação com o disco de papel filtro impregnado com a substância teste.

A partir do crescimento das bactérias em meio de cultura caldo BHI, foi realizado ajuste da turbidez para 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a, aproximadamente, 10^8 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias por mililitro) e, para comprovação da quantidade de colônias, realizou-se contagem em Petrifilm[®], em virtude da praticidade de utilização desse sistema.

Após a confirmação da quantidade de colônias, introduziu-se um *swab* bacteriológico na suspensão bacteriana, deixando-o submerso nessa suspensão por três minutos. Em seguida, este foi pressionado contra a parede do tudo, para que houvesse um esgotamento. Dessa forma, semeou-se, uniformemente, o inóculo sobre toda a superfície de placas contendo meio de cultura Ágar MH, Ágar SS e PCA, todos em duplicata. Após secagem por 3 a 4 minutos, os discos (papel filtro Whatman – tipo 3) impregnados com o óleo essencial em sete concentrações diferentes foram aplicados sobre o ágar. As placas foram incubadas, invertidas, à temperatura de $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por $24\text{ h} \pm 1\text{ h}$.

Os discos, de 6 mm de diâmetro, impregnados com cada concentração do óleo (puro até a diluição 10^{-7}), foram aplicados sobre as placas com o auxílio de pinça flambada e fria, seguindo-se conforme metodologia de Santos et al. (2007). Foram pressionados para melhor aderir ao meio. A distância entre os discos foi calculada a fim de evitar sobreposição dos halos de inibição. Às placas, foram inseridos quatro discos de inibição com concentrações de óleo predeterminadas.

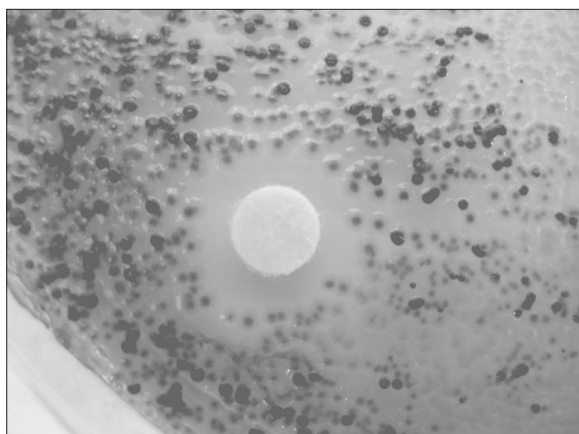
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada baixa sensibilidade de *Salmonella* frente ao óleo essencial de alecrim; não houve formação de halo de inibição, exceto na sua concentração original (sem diluição), (Fotografias 1 e 2). O controle realizado com antibiótico sulfametoxazol (Fotografia 2) permite verificar que a capacidade de inibição de crescimento do micro-organismo em estudo, pelo óleo essencial puro, é extremamente baixo quando comparado ao antibiótico.

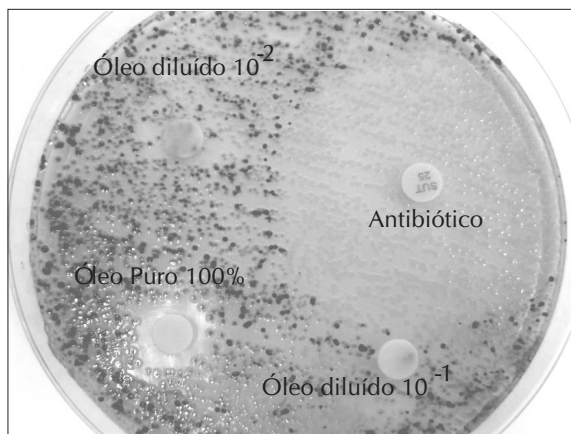
Para Ribeiro (2008), não existe um consenso sobre o nível aceitável para extratos/óleos essenciais de plantas quando comparados com antibióticos padrões, por isso, acredita-se que novos testes, outros

diluentes e até mesmo o uso de outros micro-organismos Gram negativos possam apresentar resultados mais eficientes. Para Porte e Godoy (2001), também é necessário determinar a composição química do óleo essencial para aproveitar suas potencialidades e aplicá-lo ao estudo correto.

De acordo com Porte e Godoy (2001), e também com os resultados obtidos neste estudo, é sugestivo que as bactérias Gram negativas são menos sensíveis aos “condimentos” que as Gram positivas. Os resultados obtidos por Haida et al. (2007), demonstram que os extratos de *R. officinalis* apresentam ação contra as bactérias Gram positivas como *S. aureus*.

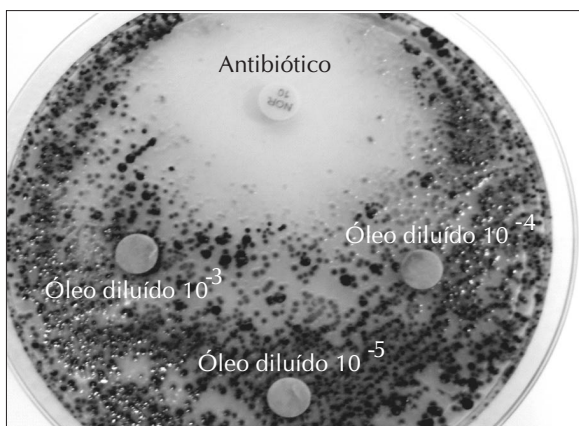


Fotografia 1: Halo de inibição com óleo essencial de alecrim em concentração 100%, sobre *Salmonella* cultivada em meio SS

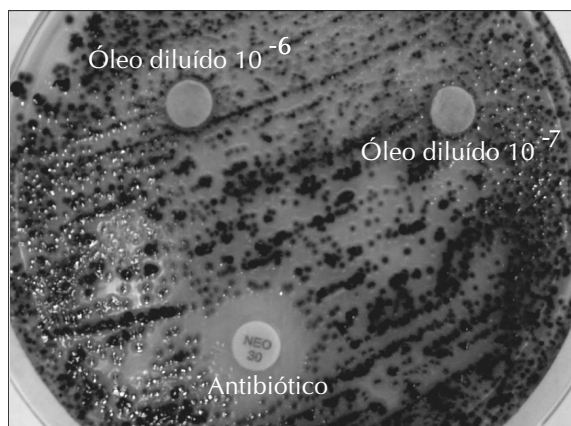


Fotografia 2: Halo de inibição com óleo essencial de alecrim diluído e controle com antibiótico (sulfametoxazol), sobre *Salmonella* cultivada em meio SS

Foi possível observar, além da utilização do óleo puro, nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e sulfametoxazol, que as demais diluições do óleo essencial não foram eficientes na inibição do crescimento do micro-organismo em questão (Fotografia 3); o antibiótico norfloxacina utilizado para comparação foi capaz de inibir o crescimento do micro-organismo. O antibiótico neomicina (Fotografia 4), também apresentou capacidade de inibição do crescimento do micro-organismo, porém com menor proporção.



Fotografia 3: Halo de inibição com óleo essencial de alecrim diluído e controle com antibiótico (Norfloxacina), sobre *Salmonella* cultivada em meio SS



Fotografia 4: Halo de inibição com óleo essencial de alecrim diluído e controle com antibiótico (Neomicina), sobre *Salmonella* cultivada em meio SS

Supõe-se que a baixa atividade contra o crescimento bacteriano apresentado pelo óleo essencial de alecrim justifica-se, além de outros fatores, pelo quimiotipo, época de colheita e influência do clima e região de plantio do alecrim utilizado para extração do óleo.

É importante mencionar que os resultados obtidos neste estudo não sofreram influência da diluição do óleo em álcool a 10%, pois o controle com álcool a 10% não apresentou inibição no crescimento de *Salmonella*.

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial comercial de Alecrim (*Rosmarinus Officinalis L.*) apresenta ação inibitória ante a *Salmonella sp.* apenas na sua forma pura, ou seja, sem diluição. Testes com maior número de diferentes cepas de *Salmonella* serão úteis para uma avaliação definitiva da atividade antimicrobiana desse óleo essencial disponibilizado comercialmente.

Evaluation of the Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) Against Salmonella sp.

Abstract

The Rosemary extracts (Rosmarinus officinalis L.) are famous for its antioxidant and preservative properties. The value to flavor of a plant is almost always associated with the essential oil percentage. Essential oils are chemical composites generated during the development of the plant as secondary biomolecules. Salmonella is considered the main pathogen involved in alimentary toxiiinfections. It is very important to have Information regarding the antimicrobials activity of the essential oil of rosemary related to the interest for its utilization in substitution to chemical additives. In this sense there is also important to evaluate the biotechnological techniques of facilitating and improving the process of production, extraction and application of these composites. In the present study was evaluated the action of antimicrobial activity of essential oil of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) against Salmonella sp.. Was utilized the filter paper disk method to evaluate the action inhibition of essential oil of rosemary. The results showed the inhibition that pure essential oil of Rosemary (R. officinalis L.) against Salmonella sp was lesser than the inhibition of the antibiotic used as positive control. We can conclude that the commercial essential oil of Rosemary (R. officinalis L) inhibit Salmonella sp. only in its pure form (no dilution).

Keywords: Rosmarinus officinalis L. Antimicrobials. Salmonella sp.

REFERÊNCIAS

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: 10 abr. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**: Norma Aprovada M2-A8. Substitui a Norma M2-A7, v. 20, n. 1 do CLSI (NCCLS): Clinical and Laboratory Standards Institute. 8. ed. v. 23, n. 1, 2003.

ANDRADE, M. A. **Inoculação de Salmonella enterica subespécie enterica sorovar enteridis fagotipo 4 em ovos embrionados de duas linhagens de frango de corte**. 2005. 120 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)–Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

CARVALHO, J. T.; ALMANÇA, C. C. J. **Formulário de Prescrição Fitoterápica**. São Paulo: Atheneu, 2003.

D'AOUST, J. Y. (Org.). Salmonella Species. **Food Microbiology**: Fundamentals and Frontiers. New Jersey: Hardcover, 2001.

DE LA CRUZ, M. G. F. **O uso de óleos essenciais na terapêutica**. Univag [entre 1997 e 2003]. Disponível em: <<http://www.ufmt.br/etnoplan/artigos/%D3leos%20essenciais%20e%20terap%EAutica.PDF>>. Acesso em: 2 abr. 2009.

FARIA, L. R. D. **Validação farmacológica do óleo essencial de Rosmarinus officinalis L. (alecrim)**: atividade antiinflamatória e analgésica. Unifenas, 2005. Disponível em: <http://tede.unifenas.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=9>. Acesso em: 24 abr. 2009.

FURLAN, M. R. **Ervas e temperos**: cultivo e comercialização. Cuiabá: Sebrae/MT, 1998. 128 p. v. 15.

GONZÁLEZ, A. Patrícia. Antibiograma por método de difusión: Selección de antimicrobianos. **Rev. Chil Infect.**, v. 19, n. 2, p. 82-84, 2002.

HAIDA, K. S. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 3, p. 185-192, set./dez. 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas Medicinais no Brasil**: Nativas e Exóticas Cultivadas. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 512 p.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 193-210, jul./dez. 2001. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/view/1233/1033>>. Acesso em: 4 maio 2009.

RIBEIRO, C. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Universidade Federal do Pará, Belém, 2008. Disponível em: <http://www.btdt.ufpa.br//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=459>. Acesso em: 11 maio 2009.

RUBEL, R. et al. **Antibiograma**. São Paulo: LTr, 2002.

SANTOS, S. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochiliocarpos*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 17, n. 2, p. 215-219, 2007.

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

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.

SOUZA, S. M. C. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciênc. Agrotec.**, Niterói, v. 28, n. 3, p. 685-690, maio/jun. 2004. Disponível em: <www.editora.ufla.br/revista/28_3/art27.pdf>. Acesso em: 9 abr. 2009.

Recebido em 26 de agosto de 2009

Aceito em 27 de outubro de 2009