

## Área: Ciência de Alimentos

# AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum majorana* L. FRENTE A *Staphylococcus* coagulase positiva ISOLADOS DE CARNES DE FRANGOS

Juliana de Lima Marques\*, Lisiane Martins Volcão, Gladis Aver Ribeiro

Laboratório de Bacteriologia, Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia,  
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

\*E-mail: ju\_marques@hotmail.com

**RESUMO** – Um dos problemas de saúde pública atualmente é a contaminação bacteriana dos alimentos. Estudos acerca da ciência e tecnologia de alimentos têm ressaltado o potencial antibacteriano das especiarias, considerando a sua inserção no sistema de bioconservação de alimentos. Com base nisso, o objetivo do presente estudo foi realizar o isolamento e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva proveniente de carnes de frango do Sul do Rio Grande do Sul, e avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial *Origanum majorana* L. (manjerona) frente a esses isolados. Foram analisadas amostras de frangos de dois estabelecimentos, totalizando 20 amostras. Foi realizado o isolamento e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva, assim como avaliação da atividade antibacteriana desses isolados, a partir do Teste de Difusão em Disco e Microdiluição em Caldo. Para ambos os testes, foi padronizado o inóculo na escala de 0,5 Mc Farland, e para a técnica de Microdiluição em Caldo foram feitas diluições seriadas envolvendo concentrações dos óleos entre 1,562 a 100  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ . Os resultados evidenciaram que das 20 amostras de frango analisadas, 17 (85%) apresentaram contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva. Quanto à avaliação da atividade antibacteriana, os óleos essenciais testados apresentaram atividade frente a todas as cepas bacterianas testadas, indicando a possibilidade de substituição aos conservadores químicos em alimentos.

**Palavras-chave:** Antimicrobiano; Disco Difusão; Manjerona; Microdiluição em Caldo.

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças de origem alimentar vêm se intensificando em todo o mundo, porém a maioria dos casos não é divulgada, fazendo com que a real dimensão do problema não seja conhecida (WHO, 2012), dessa forma, sendo arriscado estimar a incidência das doenças de natureza alimentar.

A indústria alimentícia almeja a produção de alimentos que ofereçam vida-de-prateleira extensa e inocuidade com relação à presença de micro-organismos patogênicos e suas toxinas. A nova tendência do

consumidor e da legislação de alimentos tem feito com que essa procura se torne cada vez mais necessária. Os consumidores buscam alimentos de qualidade adequada, livres de conservantes químicos e minimamente processados, porém com vida-útil longa (GOULD, 1996).

De acordo com Silva et al. (2008), na sociedade contemporânea, o interesse em terapias alternativas e o uso de produtos naturais vem crescendo nos últimos anos. O tratamento com remédios naturais vem crescendo, pois a população busca menores custos, menor probabilidade de efeitos colaterais e combater a resistência de determinados micro-organismos frente aos fármacos convencionais (POZZATTI, 2007), o que pode acabar justificando o aumento em mais de 50% da produção de óleos e gorduras vegetais na última década, classificando o Brasil como o sexto produtor desses compostos, perdendo somente para a Malásia, China, Indonésia, Estados Unidos e Índia (FAO, 2012). Com base nisso, o objetivo do presente estudo foi realizar o isolamento e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva proveniente de carnes de frango e avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial *Origanum majorana* L. (manjerona) frente a esses isolados.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas coletas de amostras de frango provenientes de dois estabelecimentos comerciais (I – supermercado, II – açougue) do Sul do Rio Grande do Sul. Os estabelecimentos foram sorteados aleatoriamente, e foram feitas 10 repetições dos testes por estabelecimento, totalizando 20 amostras. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia pertencente ao Instituto de Biologia da UFPel.

O isolamento e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva foram realizados de acordo com APHA (2002). As colônias suspeitas foram selecionadas e submetidas à coloração de Gram e a prova de coagulase. A prova de coagulase foi realizada por meio da transferência do inóculo, através do método de dispersão para um tubo de ensaio contendo 2mL de Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubados a 36°C por 24h. Logo após esse período, foram retirados 1,8mL do inóculo e acrescentado 0,2mL de coagu-plasma<sup>®</sup>, homogeneizando com movimentos de rotação. Novamente os tubos foram incubados a 36°C, verificando a cada hora se houve formação de coágulo, em um período total de seis horas.

A partir dos isolados positivos, foram realizadas as técnicas de Disco difusão (SAHIN, 2004) e Microdiluição em Caldo (NCCLS, 2003). A primeira foi realizada em placas de ágar BHI, e os inóculos foram padronizados de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland, correspondendo a  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> a partir de cultivos bacterianos recentes. Após, foram semeados na superfície do meio de cultivo com o auxílio de *swabs* estéreis e discos de papel-filtro estéreis foram dispostos na superfície do ágar. Em seguida, 10µL dos óleos essenciais puros foram adicionados sobre os discos, para a difusão do óleo no meio de cultivo. As placas foram incubadas a 36°C durante 24h. A atividade antibacteriana foi avaliada pela formação de um halo inibitório provocado pelos óleos essenciais sobre as cepas testadas, e o experimento foi realizado em duplicata para cada cepa bacteriana.

Já para a técnica de Microdiluição em caldo foi utilizado caldo BHI e agente emulsificante, Tween 80 (T80) a 1%. Foram realizadas diluições seriadas do óleo essencial acrescido ao meio de cultura, com a finalidade

de obter concentrações finais de  $1,562\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $100\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Em seguida, foram adicionados  $180\mu\text{L}$  de cada uma das concentrações às cavidades na placa, seguindo a uma ordem decrescente de concentrações. Como controle negativo, foi usado o meio de cultivo com emulsificante T80 livre de inóculo, caracterizando ausência de contaminação. Como controle positivo, foi utilizado o meio de cultivo com emulsificante T80 e inóculo, caracterizando a viabilidade celular bacteriana. Para descartar qualquer possibilidade de contaminação dos óleos essenciais, foi colocado em linhas adicionais, apenas o meio de cultivo+T80+óleo essencial, sem inóculo bacteriano. Os inóculos bacterianos foram preparados padronizados na escala 0,5 de Mc Farland, e em seguida, foram adicionados  $20\mu\text{L}$  de cada um em todas as cavidades correspondentes, com exceção do controle negativo. Ao final, foi obtida uma concentração de  $3\times 10^4$  células/cavidade. O experimento foi feito em triplicata e as placas foram incubadas a  $36^\circ\text{C}$  por 24h. A leitura dos resultados foi feita a partir da adição de  $20\mu\text{L}$  de Cloreto de 2,3,5 Trifenil Tetrazólio a 0,5% em todas as cavidades. As placas foram incubadas a  $36^\circ\text{C}$  por 20min. A alteração na coloração foi um indicativo de atividade metabólica bacteriana, o que por consequência comprovou a ausência de inibição do crescimento bacteriano pelos óleos essenciais testados.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que das 20 amostras de frango analisadas, 17 (85%) apresentaram contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva, sendo 7 (35%) provenientes do estabelecimento I e 10 (50%) do estabelecimento II. Esse alto índice de contaminação pode ser justificado pelo fato da carne de aves ser muito suscetível à deterioração devido ao seu pH próximo à neutralidade, elevado teor de nutrientes e à atividade de água elevada, que são fatores propícios ao desenvolvimento de micro-organismos provenientes da própria ave ou de fontes externas, e por essas razões deve ser mantida sob refrigeração ou congelamento (SILVA et al., 2002).

Além disso, pode-se inferir que o índice foi maior no estabelecimento II (açougue) pelo fato do mesmo apresentar, na maioria das vezes, condições higiênico-sanitárias visivelmente mais precárias do que o estabelecimento I (supermercado), proporcionando melhores condições para o desenvolvimento de micro-organismos. De acordo com Morot-Bizot, Leroy e Talon (2006), muitas espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva encontradas em amostras de frango estão relacionadas às condições de produção e matérias-primas que as amostras foram submetidas, visto que estes micro-organismos são conhecidos por colonizar superfícies e equipamentos mal higienizados.

Na tab. 1 estão expressos os valores das médias aritméticas e desvio padrão do diâmetro dos halos inibitórios apresentados pelos isolados através da técnica de Difusão em Disco, assim como os valores das médias aritméticas e desvio padrão da CIM frente aos isolados através da técnica de Microdiluição em Caldo. Os valores demonstraram que todos isolados apresentaram inibição, corroborando com os resultados encontrados por Deans e Svoboda (2006), que em pesquisa sobre o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *O. majorana* frente a algumas cepas de bactérias e fungos, verificaram poder inibitório sobre bactérias.

Tabela 1 – Valores referentes às médias aritméticas e desvio padrão dos halos inibitórios e CIM do óleo essencial de *Origanum majorana* L. (manjerona) frente aos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva oriundos de carnes de frango.

Micro-organismo	Halo inibitório	CIM
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	14,41±7,39	31,61±24,15

Alguns autores defendem que os envolvidos mais frequentes pela atividade antimicrobiana nos óleos essenciais sejam os componentes fenólicos, que sensibilizam a bicamada lipídica da membrana celular, modificando a atividade dos canais de cálcio, provocando um aumento na permeabilidade e liberação dos componentes intracelulares vitais. O sistema enzimático do micro-organismo envolvido também pode ser prejudicado, no que tange à produção de energia e síntese de componentes estruturais, assim como a inativação ou destruição do material genético (PORTE; GODOY, 2001).

Burt (2004) relata que o alto teor de gordura presente nos produtos cárneos pode provocar uma redução da ação dos óleos essenciais, e conseqüentemente baixa ação antimicrobiana contra patógenos existentes em carnes contaminadas, podendo estar relacionado à lipossolubilidade dos óleos essenciais em relação às partes aquosas dos alimentos, o que pode ser justificado pelos valores referentes à atividade antibacteriana do óleo essencial de manjerona não terem sido mais eficazes.

## 4 CONCLUSÃO

Pode-se verificar que o óleo essencial *Origanum majorana* L. demonstrou potencial antimicrobiano frente aos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva. A partir disso, sugere-se a utilização do óleo essencial de manjerona como substitutivo de conservadores químicos em alimentos, assim como no desenvolvimento de fármacos naturais.

## 5 REFERÊNCIAS

- APHA. Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. 4<sup>th</sup> Edition. **American Public Health Association**. Washington D.C., 2002.
- BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.233-253, 2004.
- DEANS, S. G.; SVOBODA, K. P. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) Volatile Oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 5, n. 3, p. 187-190, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION-FAO. Statistical Databases. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 07 out. 2012.

GOULD, G. W. Industry perspective on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.1, p.82-86, 1996.

MOROT-BIZOT, C.; LEROY, S.; TALON, R. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n.2, p.210-210, 2006.

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

PORTE, A.; GODOY, O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **Boletim do Ceppa**, v.19, n.2, p.193-210, 2001.

POZZATTI, P. **Suscetibilidade de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao Fluconazol frente a óleos essenciais extraídos de condimentos**. 2007. 148f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v.15, n.7, p.549-557, 2004.

SILVA, J. A.; AZERÊDO, G. A.; BARROS, M. R.; COSTA, E. L.; FALCÃO, M. S. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.100, p.97-101, 2002.

SILVA, M.; GONDIM, A.; NUNES, I.; SOUSA, F. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* L. sobre bactérias orais lancetônicas. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.18, n.2, p.724, 2008.

WHO - World Health Organization. Disponível em: <[http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0005/74417/E82161.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/74417/E82161.pdf)> Acesso em: 19 set. 2012.