



Universidade Federal da Bahia
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.)
FRENTE A BACTÉRIAS ISOLADAS DE ALIMENTOS:
ESTUDOS *IN VITRO* E EM MATRIZ ALIMENTÍCIA**

DANIELE SILVA RIBEIRO

Salvador - BA

2011

DANIELE SILVA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.)
FRENTA A BACTÉRIAS ISOLADAS DE ALIMENTOS:
ESTUDOS *IN VITRO* E EM MATRIZ ALIMENTÍCIA**

Orientadora: Prof.^a Dra. Alaíse Gil Guimarães

Co-Orientador: Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

**Salvador - BA
2011**

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Ribeiro, Daniele Silva.

Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) frente a bactérias isoladas de alimentos : estudos in vitro e em matriz alimentícia / Daniele Silva Ribeiro. - 2011.

103 f. : il.

Inclui anexos.

Orientadora: Profª. Drª. Aláise Gil Guimarães.

Co-orientador: Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2011.

1. Bactérias. 2. Óleo de alecrim. 3. *Rosmarinus officinalis* L. 4. Alimentos - Conservação.
I. Guimarães, Aláise Gil. II. Velozo, Eudes da Silva. III. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD - 579.3

CDU - 579.67

*À minha querida mãe, pelo seu amor,
dedicação e pela pessoa que sou.*

AGRADECIMENTOS

À Deus que rege a minha vida e me faz crer que tudo é possível.

À minha família, meu alicerce. Minha mãe, Albertina, e meus irmãos, Eduardo, Mariana e Carolina, pelo amor, compreensão, admiração e apoio incondicional. E aos meus sobrinhos Duda e Gui, por me ensinarem o quanto é bom ser criança.

À Reine, pelo companheirismo e incentivos.

À minha querida professora Elinalva Maciel, que me iniciou na vida científica e sempre me incentivou a buscar novos desafios.

Às amigas e companheiras de laboratório Daniela, Juliana, Roberta, Mariana, Simone e Renata, pelos bons momentos de descontração, troca de experiências, apoio e amizade.

À Letícia, amiga de todas as horas. Agradeço pelo companheirismo e ombro amigo nos momentos difíceis.

Aos meus queridos amigos de hoje, de ontem e de sempre – Sandra, Trícia, Rejhane, Luzara, Thaíse, Thiago, Tiago, Valdemiro pelos incentivos, admiração e compreensão da minha ausência.

A Victor Diógenes, grande amigo e irmão a quem tenho “seguido” os passos.

Ao Prof. Eudes Velozo, pelo desafio proposto neste trabalho, pelos seus ensinamentos e pela sua alegria contagiante.

À Railda do LAPEMM, pela amizade, orientações e auxílio durante a extração do óleo essencial.

À Priscila, secretária da Pós, sempre gentil e disposta ajudar a todos.

Em especial, agradeço a minha querida orientadora Prof.^a Alaíse Guimarães, pela sua sabedoria e ensinamentos, pela sua dedicação e comprometimento em buscar sempre o melhor dos seus orientados e pelo carinho maternal, que sempre me tratou. E, principalmente, pela confiança em mim depositada.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, providencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica – DQOI, da Universidade Federal do Ceará, pela análise química realizada no óleo essencial.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte de mais uma etapa na minha vida, obrigada.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE TABELAS | IX |
| LISTA DE FIGURAS | X |
| INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| OBJETIVOS | 15 |
| Objetivo Geral | 15 |
| Objetivos Específicos | 15 |
| CAPÍTULO 1 – Referencial Teórico | 16 |
| 1 Doenças veiculadas por alimentos (DVA) | 17 |
| 2 Resistência bacteriana e a ação dos antibióticos | 23 |
| 3 Antimicrobianos naturais de origem vegetal e seus efeitos na conservação dos alimentos | 27 |
| 4 Propriedades antimicrobianas do óleo essencial de alecrim | 29 |
| 4.1. Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) | 29 |
| 4.2. Óleo Essencial | 31 |
| 5 Referências | 36 |
| CAPÍTULO 2 - Interação sinérgica entre o óleo essencial de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) e drogas antimicrobianas frente a bactérias isoladas de alimentos. | 44 |
| RESUMO | 45 |
| ABSTRACT | 46 |
| 1 INTRODUÇÃO | 47 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 50 |
| 2.1. Obtenção do material vegetal e extração do óleo essencial de alecrim | 50 |
| 2.2. Análise química do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) | 50 |
| 2.3. Avaliação in vitro do óleo essencial de alecrim | 51 |
| 2.3.1. Cepas teste | 51 |
| 2.3.2. Triagem da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM | 52 |
| 2.4. Avaliação da susceptibilidade bacteriana aos fármacos | 53 |
| 2.5. Avaliação do sinergismo entre o óleo essencial de alecrim e antibióticos | 53 |
| 2.6. Análise Estatística | 54 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 3.1. Análise química do óleo essencial de alecrim | 55 |
| 3.2. Triagem da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim | 58 |
| 3.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM | 58 |
| 3.4. Avaliação da susceptibilidade bacteriana aos fármacos | 60 |
| 3.5. Avaliação do sinergismo entre o óleo essencial de alecrim e antibióticos | 62 |
| 4 CONCLUSÃO | 67 |
| 5 REFERÊNCIAS | 68 |
| CAPÍTULO 3 - Avaliação antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) no controle de <i>Escherichia coli</i> multirresistente inoculada em queijo do tipo “coalho”. | 75 |
| RESUMO | 76 |
| ABSTRACT | 77 |
| 1 INTRODUÇÃO | 78 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 82 |
| 2.1. Obtenção do material vegetal e extração do óleo essencial de alecrim | 82 |
| 2.2. Avaliação <i>in vitro</i> do óleo essencial de alecrim | 82 |
| 2.2.1. Cepas teste | 82 |
| 2.2.2. Triagem da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim | 82 |
| 2.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM | 83 |
| 2.3. Avaliação do óleo essencial de alecrim na matriz alimentícia | 84 |
| 2.3.1. Preparo da amostra | 84 |
| 2.3.2. Determinação da ação antimicrobiana do óleo essencial de alecrim no controle de <i>E.coli-EC16</i> em queijo coalho <i>in natura</i> . | 84 |

| | |
|--|------------|
| 2.4. Análise Estatística | 85 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 86 |
| 3.1. Triagem da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim | 86 |
| 3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM | 86 |
| 3.3. Avaliação microbiológica do queijo coalho <i>in natura</i> sem inoculação | 87 |
| 3.4. Avaliação da Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim no controle de <i>E.coli</i> no queijo coalho <i>in natura</i> | 88 |
| 4 CONCLUSÃO | 91 |
| 5 REFERÊNCIAS | 92 |
| | |
| CONCLUSÕES GERAIS | 99 |
| ANEXOS | 100 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Composição química do óleo essencial extraído das folhas de *Rosmarinus officinalis* Linn. 57
- Tabela 2.** Concentração inibitória mínima do OEA sobre as cepas teste determinada por difusão em ágar. 59
- Tabela 3.** Susceptibilidade das cepas bacterianas frente à ação de diferentes antibióticos. 61
- Tabela 4.** Susceptibilidade das cepas bacterianas de *E.coli* e *Salmonella* spp. frente à ação combinada do OEA a 20% com antibióticos (resultados expressos em milímetros do halo de inibição do crescimento microbiano). 63

CAPÍTULO 3

- Tabela 1.** Concentração inibitória mínima – CIM do OEA sobre EC16 determinada por difusão em ágar. 87
- Tabela 2.** Análises microbiológicas do queijo coalho antes da inoculação. 89
- Tabela 3.** Médias das contagens de *E.coli*-EC16 no queijo coalho nas amostras controle e nos tratamentos com OEA. 91

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Sítios de ação dos antibióticos sobre a célula bacteriana. **26**
- Figura 2.** Folhas de *Rosmarinus officinalis* L. **30**
- Figura 3.** Possíveis sítios e mecanismos de ação de antimicrobianos naturais na célula bacteriana. **34**

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Estrutura química dos constituintes majoritários do óleo essencial de alecrim. **56**
- Figura 2.** Porcentagem do efeito da associação do OEA com os fármacos. **64**
- Figura 3.** Avaliação do efeito sinérgico da ação combinada do OEA com antibióticos contra as cepas A – SAL.16; B – MOA25; C – EC16; D – MOA51 resistentes à drogas, pelo método de difusão em ágar. **66**

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim frente a cepa de *Escherichia coli*- EC16 em queijo coalho durante 168 horas ($p \leq 0,05$). **90**

RESUMO

Historicamente os óleos essenciais têm sido largamente empregados em alimentos como condimento, todavia, devido ao seu potencial antimicrobiano, atualmente o seu uso é direcionado também no controle de bactérias associadas a doenças veiculadas por alimentos (DVA). A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim frente a bactérias isoladas de alimentos, realizando estudos *in vitro* e em matriz alimentícia. No primeiro momento, para o estudo *in vitro*, o óleo essencial de alecrim (OEA) foi analisado quimicamente, avaliado quanto a sua atividade antimicrobiana frente às cepas de *E.coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva e avaliado seu efeito sinérgico, quando associado a fármacos, frente às cepas que apresentaram resistência. Como resultado, os constituintes majoritários encontrados no óleo foram o α -pineno (19,8%), β -mirceno (24,2%), 1,8 cineol (22,2%) e verbenona (9,3%). A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial obtida para a maioria das cepas foi de 20%(v/v) e, somente, para uma cepa de *Salmonella* a CIM foi de 40%(v/v). Das sete cepas avaliadas, quatro (*E.coli* – MOA51, EC16 e *Salmonella* – MOA25, SAL16) apresentaram resistência a um ou mais fármacos. Estas foram submetidas à avaliação do efeito sinérgico - associação do OEA com antibióticos. De maneira geral, foi observado efeito sinérgico para 58% dos ensaios, efeito antagônico em 16% e efeito indiferente em 26%. Na segunda parte da pesquisa, foi avaliada a ação antimicrobiana do OEA no controle da cepa de *E.coli* (EC16) inoculada em queijo do tipo coalho. O OEA foi inoculado na sua concentração inibitória mínima juntamente com a cepa EC16, em suspensão, na concentração de 10^5 UFC/mL. Em seguida, a amostra foi porcionada, refrigerada e analisada durante sete dias através da contagem de *E.coli*. O mesmo procedimento foi realizado para uma amostra Controle sem adição do OEA. Nas primeiras 24h de armazenamento houve uma redução de 2,3 ciclos logarítmicos na amostra contendo OEA. Esta redução manteve-se, praticamente, estável até o final do experimento. Diante dos resultados, conclui-se que o óleo essencial de alecrim é uma alternativa promissora no controle de bactérias associadas às DVA. Todavia, estudos futuros são necessários para melhor elucidar os impactos organolépticos que o OEA poderá ter nos alimentos, bem como a sua eficácia associado a antibióticos convencionais em estudos *in vivo*.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis* L., óleo essencial, ação antimicrobiana, sinergismo, conservação de alimentos.

ABSTRACT

Historically, essential oils have been widely used in food as a condiment, however, because of its potential antimicrobial, currently its use is directed in the control of bacteria associated with foodborne illnesses. This research aimed to evaluate the antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against bacteria isolated from food, performing studies *in vitro* and in food matrix. In Initially, for the *in vitro* study, the rosemary essential oil (EOR) was chemically analyzed, evaluated for their activity antimicrobial against the strains of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus* coagulase positive and evaluated its synergistic effect when combined with antimicrobial drugs, against the strains that showed resistance. As a result, the major constituents found in the EOR were α -pinene (19.8%), β -myrcene (24.2%), 1.8 cineole (22.2%) and verbenone (9.3%). The minimum inhibitory concentration (MIC) obtained for most strains was 20% (v/v) and only to a strain of *Salmonella* MIC was 40% (v/v). Of the seven strains tested, four (*E.coli* - MOA51, EC16 and *Salmonella* - MOA25, SAL16) were resistant to one or more drugs (ampicillin, amoxillin/clavulanate, cephalothin, ciprofloxacin, chloramphenicol, cefotaxime, gentamicin, norfloxacin, levofloxacin, nitrofurantoin, trimethoprim / sulfamethoxazole, tetracycline). These were submitted to evaluation of the synergistic effect - the EOR association with antibiotics. In general, the synergistic effect was observed for 58% of trials, antagonistic effect at 16% and 26% indifferent effect. In the second part of study evaluated the antimicrobial action of EOR in the control strain *E.coli* (EC16) and inoculated on a sample of *coalho* cheese. The EOR inoculated in the MIC together with the strain EC16 in suspension, the concentration of 10^5 UFC/mL. Then, the sample was divided, chilled and analyzed by counting the *E.coli* for seven days. The same procedure was performed to sample a *coalho* cheese without adding the EOR. In the first 24 hours of storage there was a reduction of 2.3 logarithmic cycles in the sample containing the EOR. This reduction was maintained, practically stable until the end of the experiment. Given the results, concluded that the rosemary essential oil is a promising alternative in the control of bacteria associated with foodborne illnesses, both as a preservative in foods, as associated with drugs, compared bacterial resistance. However, further studies are needed to further elucidate the sensory impact that the EOR may have in foods and their effectiveness associated with conventional antibiotics *in vivo* studies.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L. essential oil, antimicrobial activity, synergism, food preservation.

INTRODUÇÃO GERAL

O alimento quando não preparado de forma higiênica ou conservado adequadamente pode ser veículo de doenças desencadeadas pelo desenvolvimento de microrganismos e/ou suas toxinas.

Os microrganismos comumente envolvidos em surtos alimentares são *Salmonella* spp., *Escherichia coli* patogênicas, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella dysenteriae*, *Clostridium botulinum* dentre outros. E os alimentos geralmente envolvidos, na maioria, são provenientes de animais e produtos derivados, a exemplo de carnes, leite, ovos, queijos e alimentos preparados altamente manipulados.

Para tratar as toxinfecções alimentares, a medicina humana faz uso de diversos antibióticos, tais como fluoroquinolonas, utilizados no tratamento de infecções graves, como a causada por *E.coli* enteropatogênicas (EPEC), meticilina, em doenças estafilocócicas, sulfonamidas, em salmoneloses. Todavia, o uso sem controle de antibióticos no tratamento e prevenção de doenças tem se tornado um problema, tanto para saúde pública, quanto para a saúde animal, devido ao aumento de bactérias resistentes aos fármacos.

Na medicina veterinária os antibióticos extensivamente utilizados como promotores de crescimento e no tratamento de enfermidades vêm contribuindo para resistência bacteriana que, conseqüentemente, é transferida para o homem através da cadeia alimentar. Para as agências reguladoras de saúde o fator preocupante, no tocante à resistência bacteriana, está na dificuldade em tratar as enfermidades, pois, muitos antibióticos disponíveis para a terapêutica humana não têm sido eficazes.

Em paralelo, o consumidor tem exigido cada vez mais alimentos naturais, sem adição de conservantes químicos sintéticos, microbiologicamente seguros e com longa vida de prateleira, tornando a busca por antimicrobianos naturais uma necessidade.

As propriedades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de muitas plantas são comprovadas cientificamente. Tais propriedades têm impulsionado vários pesquisadores a estudarem a atividade biológica de plantas medicinais de diversas partes do mundo, tendo em vista o uso popular das mesmas. Estas pesquisas ganham um maior impulso devido ao aumento de microrganismos resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos.

Estudos têm mostrado que o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), planta da família Lamiaceae, possui atividade contra muitos patógenos resistentes a antibióticos sintéticos, demonstrando seu potencial como antimicrobiano natural. No entanto, há poucos relatos do uso do óleo essencial de alecrim como conservante em alimentos.

Diante de suas propriedades antimicrobianas, o óleo essencial pode ser usado como um aditivo natural ou combinado a outras técnicas de conservação do alimento para contribuir com a prevenção de doenças veiculadas por alimentos.

O potencial antimicrobiano do óleo essencial de alecrim pode também ser uma alternativa no controle de patógenos quando associado de forma sinérgica com antibióticos, visando reverter a resistência bacteriana frente a alguns fármacos, comumente utilizados no tratamento de DVA. Esta abordagem também é pouco explorada com bactérias resistentes isoladas de alimentos.

Tendo em vista o exposto, esta pesquisa se propôs a avaliar as propriedades antimicrobianas do óleo essencial de alecrim no controle do desenvolvimento de *E.coli* multirresistente inoculada em alimento, bem como avaliar o seu efeito sinérgico, quando associado a drogas, frente a bactérias isoladas de fontes alimentícias.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial da *Rosmarinus officinalis* L. frente a bactérias isoladas de alimentos, realizando estudos *in vitro* e em matriz alimentícia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a composição química do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) por cromatografia gasosa.

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de alecrim frente às cepas teste de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus coagulase* positiva.

Avaliar o efeito sinérgico da associação do óleo essencial de alecrim com fármacos, frente às cepas teste.

Analisar a ação antimicrobiana do óleo essencial de alecrim no controle da cepa de *Escherichia coli* – EC16 multirresistente, inoculada em queijo tipo coalho.

Referencial Teórico

1 Doenças veiculadas por alimentos - DVA

As doenças veiculadas por alimentos ocorrem devido à ingestão de alimentos ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, prions, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados. Em sua grande maioria são de origem microbiana, sendo as bactérias os agentes mais importantes, responsáveis pelo maior número de surtos e mortes, seja como causadores de infecção ou toxinfecção (SOUZA, 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; PIZZOLITTO; PIZZOLITTO; SIMÕES, 2007; HALL; VALLY; KIRK, 2008).

Nas últimas décadas, as doenças de origem microbiana relacionadas com o consumo de alimentos vêm se tornando a principal preocupação de segurança alimentar entre consumidores e agências reguladoras (WHITE et al., 2002). Consoante a crescente globalização e a mudança dos métodos de produção e distribuição de alimentos, há um potencial cada vez maior de surtos afetando muitas pessoas, tornando a prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos um desafio ainda maior para a saúde pública (HALL; VALLY; KIRK, 2008).

A incidência global de doenças transmitidas por alimentos é difícil de ser estimada, no entanto, só em 2005, 1,8 milhões de pessoas morreram de doenças diarréicas e grande parte desses casos pode ser atribuída à contaminação da água potável e alimentos (WHO, 2007). No Estado de São Paulo, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica, 60% dos surtos de diarreia ocorridos no período de 1999 a 2002 foram veiculados por alimentos (PIZZOLITTO; PIZZOLITTO; SIMÕES, 2007).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; WHO, 2009), casos de DVA ocorrem diariamente em todos os países, mas como a maioria não é relatada, por causarem sintomas brandos, a real magnitude do problema não é conhecida e os esforços para garantir os recursos e o apoio necessários para a identificação e implementação de soluções eficazes, muitas vezes falham.

Os sintomas clínicos das DVA podem variar de moderados quando se observam náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia limitada, bem como podem ser severos quando se observam desordens do sistema nervoso central e diarreia profusa conduzindo a grande perda de líquido e eletrólitos (WHITE et al., 2002). Quando apresentado quadro mais grave, o tratamento para pacientes com infecções, incluindo

idosos ou imunocomprometidos, deve incluir antibióticos como o trimetoprim sulfametoxazol (TMP / SMX) ou ciprofloxacina. Todavia, de acordo com Pigott (2008) o papel do antibiótico na terapia em pacientes com doenças de origem alimentar é controverso, embora muitas pesquisas sejam a favor do uso de antibióticos em pacientes com quadro de diarreia invasiva ou em pacientes com doenças severas.

Staphylococcus aureus, *Salmonella* Typhi, *S. Paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* patogênicas são exemplos de alguns microrganismos frequentemente envolvidos na ocorrência de DVA.

A *Salmonella* spp., bactéria Gram negativa não formadora de esporos, pertencente a família Enterobacteriaceae é atualmente um dos gêneros bacterianos que mais preocupa a saúde pública (DUNKLEY et al., 2009). É uma bactéria comum no intestino de aves, répteis e mamíferos, podendo chegar aos seres humanos através de diferentes alimentos de origem animal (Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2010). Sua patogenicidade modifica-se dependendo da idade e das condições de saúde do hospedeiro (ANDRADE, 2005).

As espécies desse gênero provocam infecções ao atravessarem a camada epitelial intestinal, onde alcançam a lâmina própria (camada na qual as células epiteliais estão ancoradas) e se proliferam. A resposta inflamatória no hospedeiro é decorrente da hiperatividade do sistema reticuloendotelial, causada pela ação dos monócitos e macrófagos sobre as células invasoras, bem como devido a liberação de prostaglandinas, que são estimuladoras de adenilciclase, o que resulta em um aumento de secreção de água e eletrólitos, provocando diarreia aquosa (SHINOHARA et al., 2008). Para *Salmonella* ter sucesso na colonização do hospedeiro e causar gastroenterite, o microrganismo necessita vencer a acidez do estômago, a microbiota endógena e a fermentação dos metabólitos bactericidas, além de resistir aos efeitos da bile no intestino (VENKINBURGH; GUNN, 1999; PEREZ, 2008).

A maioria dos fatores de virulência de *Salmonella* Enterica são determinados por genes cromossomais, muitos destes localizados dentro de ilhas de patogenicidade. As ilhas de patogenicidade são regiões grandes do cromossoma (10 a 200pb) que carregam um ou mais genes de virulência e contribuem para a invasão de células e patogênese intracelular; estão presentes no genoma de bactérias patogênicas, mas ausentes do

genoma de representantes não patogênicos da mesma espécie ou espécie intimamente relacionada e frequentemente estão localizadas adjacentes a genes de tRNA (SCHMIDT; HENSEL, 2004).

Zoonose de grande importância em todo mundo, devido a elevada morbidade, endemicidade e, principalmente pela dificuldade do seu controle, a salmonelose ocupa posição de destaque em saúde pública (SILVA; DUARTE, 2002, ANDRADE, 2005, SHINOHARA et al., 2008), pois, continua a ser a maior causa de doenças de origem alimentar, sendo os sorotipos *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium os responsáveis pela maioria das infecções em diversos países (SILVA;DUARTE, 2002, SURESH; HATHA; SCREENIVASA, 2006, DUNKLEY et al., 2009). Atrelado a este fato, têm-se a preocupação com o aparecimento de sorotipos multirresistentes a antibióticos e o fato que a grande maioria dos sorotipos de salmonelas é patogênica para o homem, o que vem dificultar ainda mais o tratamento da doença.

A partir da década de 70, observou-se aumento considerável e constante de surtos de salmonelose (ANDRIGHETO, 2006), no Brasil este aumento foi evidenciado a partir de 1993 (SILVA; DUARTE, 2002).

Diversas pesquisas têm relatado a *Salmonella* spp. como causadora de surtos. De acordo com dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA de setembro de 2005, dentre os sorotipos de *Salmonella* identificados no Brasil no período de 2001 a agosto de 2005, houve predominância de *Salmonella* Enteritidis (TOZETTO, 2006), seguindo a tendência de diversos estudos, que também destacam que este gênero tem se apresentando como resistente a diversos fármacos, utilizados tanto na terapia humana como animal (PIDDOCK, 2002; CDC, 2004; BOUALLÈGUE-GODET et al., 2005; WEINBERGER; KELLER, 2005; OLIVEIRA, 2005; SHINOHARA et al., 2008; MELENDEZ et al., 2010, KOTTWITZ et al., 2010).

O surgimento de cepas resistentes de *Salmonella* spp. é comum e este fato é agravado com a ampla utilização de antibióticos em rações animais, contribuindo para potencializar a distribuição de *Salmonella* spp. resistentes, especialmente nas aves, havendo assim um risco maior nas doenças transmissíveis por alimentos em humanos causadas por estas bactérias (REIS; KRUGER; MACIEL, 1995).

Apesar de constituir um importante problema de saúde, representando um custo significativo para a sociedade em muitos países, são poucos os que apresentam dados sobre custo econômico da doença. Nos Estados Unidos (EUA), cerca de 1,4 milhões de infecções por *Salmonella* não-tifóide, resultam em 168.000 visitas aos médicos, 15.000 hospitalizações e 580 mortes por ano. O custo anual total associado com *Salmonella* nos EUA é estimado em três bilhões de dólares (WHO, 2005).

Na Dinamarca, o custo anual estimado de salmoneloses é de 15,5 milhões de dólares, representando aproximadamente 0,009% do PIB do país. O programa de controle de salmonelas, existente a vários anos no país, consegue economizar para os cofres da saúde pública dinamarquesa, cerca de 25,5 milhões de dólares por ano. Já em países em desenvolvimento, os dados relativos ao custo de doenças transmitidas por alimentos geralmente não são disponíveis (WHO, 2005).

Não muito obstante dos dados relacionados à incidência de *Salmonella* no mundo, os sorotipos patogênicos da espécie *Escherichia coli*, também são responsáveis por zoonoses de grande impacto na saúde pública.

Escherichia coli é um habitante normal do trato intestinal de homens e animais e exerce um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas. Dentre as cepas de *E.coli*, entretanto, há um grupo capaz de provocar doenças em indivíduos humanos, coletivamente chamadas de *E.coli* enteropatogênicas. Essas cepas ocupam hoje o segundo lugar entre os principais agentes doenças de origem alimentar nos Estados Unidos (OLSEN et al., 2000). A infecção por *E. coli* é geralmente transmitida através do consumo de água ou alimentos contaminados, tais como produtos de carne mal cozida e leite cru.

As linhagens patogênicas de *E.coli* são divididas de acordo com os sintomas clínicos e com os mecanismos da patogenicidade nos seguintes grupos: *E.coli* enterotoxigênica (ETEC) – comumente conhecida como causadora da diarreia dos viajantes; *E.coli* enteropatogênica (EPEC) – causadora da diarreia aquosa em crianças; *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) – causa diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombótica. Neste grupo encontra-se a *E.coli* O157:H7; *E.coli* enteroagregativa (EAEC) – causa diarreia aquosa persistente durante mais de 14 dias; *E.coli* enteroinvasiva (EIEC) – causadora de febre e diarreia profusa contendo

muco e sangue e, por fim, a *E.coli* difusamente adesiva (DEAC) – aparentemente associada a surtos esporádicos de diarreia (QUIROGA et al., 2000; FORSYTHE, 2002; LEE et al., 2009). Dentre os grupos citados, a ETEC, EPEC e EHEC são as que estão comumente envolvidas em surtos veiculados por alimentos.

As diarreias causadas por EPEC em geral são mais severas do que as causadas por outros patógenos, com prevalência de óbitos superior a 30% e podem estar associadas a deficiências nutricionais. Estima-se que, no Brasil, diarreias sejam a causa de mais de 200.000 óbitos anuais de crianças, nos quais EPEC se encontra entre as principais causas. Os principais sintomas clínicos da doença causada por EPEC são diarreia aquosa acompanhada de febre, mal-estar e vômitos (SILVA; SILVA, 2005).

O principal fator de virulência das EPEC é a sua capacidade de causar lesões nas células epiteliais do intestino humano (enterócitos), conhecidas como lesões AE (“attaching and effacing”). A lesão AE é caracterizada pela aderência íntima da bactéria ao enterócito, formação de um pedestal na região de aderência, e destruição das microvilosidades das células do hospedeiro. Todos os genes necessários para provocar essa lesão estão localizados em uma ilha de patogenicidade desta linhagem, denominada LEE (“locus of enterocyte effacement”). Além de possuir genes que codificam a produção de citotoxinas, o que as distingue das EPEC, algumas linhagens de EHEC apresentam LEE em seu genoma (o que as capacita a formar lesão AE no epitélio intestinal). No entanto a LEE de EHEC não confere a propriedade de causar lesão AE quando transferido para uma *Escherichia coli* não patogênica, indicando que em EHEC, diferentemente de EPEC, são necessários outros elementos que não são codificados em LEE para provocar a lesão AE (LEE et al., 2009; VIEIRA, 2009).

A principal doença causada por EHEC é a colite hemorrágica, que é caracterizada por cólicas abdominais aguda e diarreia sanguinolenta que pode evoluir para síndrome urêmica hemolítica (SHU). A SHU se caracteriza por um conjunto de sintomas que engloba: anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal. A SHU pode ser fatal e é uma das preocupações dos serviços de saúde pública de vários países, como EUA, Inglaterra e Argentina, entre outros, onde a transmissão deste patógeno ocorre principalmente pela ingestão de carne bovina (LEE et al., 2009; VIEIRA, 2009).

Segundo Dalton et al. (1999) e Devasia et al. (2006), a infecção por *E.coli* enterotoxigênicas (ETEC), produtora de enterotoxina termo-lábil (LT) e termo-estável

(ST) é muito mais comum que a *E.coli* produtora de shiga-toxina. Esta linhagem é amplamente distribuída em países em desenvolvimento e também já foi apontada como sendo a causa de vários surtos de DVA nos Estados Unidos. Como outras formas de *E. coli* a ETEC é transmitida via contaminação fecal-oral de alimentos e água, podendo ser endêmica em lugares onde há contaminação dos recursos hídricos por efluentes de esgoto e em países não industrializados.

Os sintomas da infecção por ETEC, causadora da diarreia do viajante, são geralmente autolimitados, com duração de três dias a uma semana ou mais, após um período de incubação de 1-3 dias. A maioria dos doentes apresenta diarreia aquosa, geralmente sem febre, podendo ocorrer também diarreia com sangue. Embora a profilaxia com antibióticos seja eficiente, o uso de antibióticos de rotina não é recomendado para viajantes internacionais, para não potencializar a seleção de resistência desses microrganismos. Todavia, o uso de cotrimoxazol ou fluoroquinolonas pode ser indicado em casos mais graves, quando o tratamento é favorável (PIGOTT, 2008).

A mesma recomendação se aplica para o uso de antibióticos no tratamento de intoxicação alimentar estafilocócica, devido ao aparecimento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente aos fármacos comumente empregados no controle da doença.

Uma das causas mais comuns de doenças veiculadas por alimentos por alimentos é o *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram positiva, cocóide que produz enterotoxinas termo-estáveis durante o seu crescimento em alimentos (PIGOTT, 2008). É considerada a terceira causa mais importante no mundo entre as doenças de origem alimentar relatadas. Algumas décadas atrás, o *S. aureus* foi responsável por 25% de todas as doenças de origem alimentar nos os EUA. Esta bactéria não tem exigências nutricionais e ambientais para o seu crescimento e pode crescer a uma atividade de água (Aa) de 0,86, pH acima de 4,8 e temperatura mínima de 8 a 9°C. A maioria das cepas é capaz de produzir uma ou mais enterotoxinas, responsáveis pelos sintomas gastrintestinais observados durante a intoxicação (NORMANNO et al., 2005).

Os sintomas gastrintestinais mais frequentemente apresentados pelos doentes acometidos por intoxicação alimentar estafilocócica são náuseas, cólicas abdominais, vômitos e diarreia, geralmente dentro de 1 a 6 horas após a ingestão de alimentos contaminados (BALABAN; RASOOLY, 2000; MURRAY, 2005). Embora o *S.aureus*

necessite se multiplicar nos alimentos para formar toxina suficiente para causar a doença (superior a 10^6 UFC/g), o seu período de incubação é relativamente curto. A duração dos sintomas é geralmente inferior a dois dias. A ingestão da toxina pré-formada leva ao rápido início dos sintomas, sem um período prolongado de incubação, como normalmente é visto em pacientes com salmonelose (RIM; BACON, 2007).

Mesmo sendo considerada uma doença leve, geralmente autolimitada, a internação é necessária em cerca de 10% dos casos, representando um encargo social considerável em termos de despesas hospitalares, perda de dias de pacientes de trabalho e produtividade, juntamente com os problemas e os custos da eliminação de alimentos contaminados (NORMANNO, 2005).

A maioria dos casos de intoxicação por estafilococos resulta de armazenamento impróprio ou preparação inadequada dos alimentos. Os alimentos que são submetidos a pós-processamento representam um risco significativo ao perigo de contaminação por *Staphylococcus aureus*, pois os microrganismos que normalmente autocompetem com esta bactéria já foram eliminados. E como a presença de enterotoxinas produzidas durante o crescimento celular em geral não afetam as características sensoriais dos alimentos contaminados, o seu controle torna-se difícil devido a característica termo-estável da toxina (SANDEL; MCKILLIP, 2004).

Apesar das diferentes técnicas empregadas para impedir que microrganismos patogênicos cheguem até os alimentos comprometendo sua qualidade e segurança, as DVA continuam preocupando os agentes de saúde pública (JAY, 2005).

2 Resistência bacteriana e a ação dos antibióticos

Os agentes antimicrobianos são essenciais para prevenção, controle e tratamento de infecções bacterianas em homens e animais, sendo usados também para a promoção do crescimento na criação de animais em muitos países. Todavia, o uso indiscriminado desses agentes tem causado o surgimento e prevalência da resistência antimicrobiana em bactérias de forma acelerada (WHITE et al., 2002; NORMANNO et al., 2007; PESAVENTO et al., 2007; KNEZEVIC; PETROVIC, 2008; HARADA; ASAI, 2010).

Como consequência indesejável do amplo uso de antimicrobianos tem-se o desenvolvimento de patógenos bacterianos zoonóticos resistentes como *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, trazendo efeitos preocupantes sobre a saúde humana, visto que as bactérias resistentes têm sido transmitidas aos seres humanos através de produtos animais e, como consequência, têm reduzido a eficácia dos fármacos utilizados (HARADA; ASAI, 2010).

Consoante a este fato, outro grande problema no controle de bactérias patogênicas com antibióticos é que estes agentes atuam também contra as bactérias comensais, que fazem parte da microbiota normal de homens e animais. Estas bactérias, especialmente habitantes do trato intestinal, são constantemente expostas a antibióticos e podem desenvolver resistência a fim de sobreviver, tornando-se um importante reservatório de genes de resistência. E quando excretados para o ambiente, por meio de fezes, se espalham para outros ecossistemas e podem alcançar os seres humanos direta ou indiretamente, infectando ou colonizando-os (KNEZEVIC; PETROVIC, 2008).

Outro fator evidenciado no tocante a resistência bacteriana é a diferença entre a resistência de bactérias Gram negativas e positivas. Segundo Harris (2003), bactérias Gram-negativas são mais resistentes aos antibióticos do que as bactérias Gram positivas. Isso devido as Gram negativas possuírem um sistema de barreira constituído pela membrana externa da parede bacteriana formada por fosfolipídios, lipopolissacarídeos e proteínas (purinas) que conferem considerável impermeabilidade aos agentes antibacterianos, resultando em maior resistência dessas bactérias aos antibióticos, enquanto que as Gram positivas possuem uma parede bacteriana que normalmente não restringe a penetração de moléculas tóxicas, enquanto (LAMBERT, 2002).

A resistência é definida como a capacidade temporária ou permanente do microrganismo e sua descendência para permanecerem viáveis e/ou multiplicarem sob condições que poderiam destruir ou inibir outros membros da estirpe. A bactéria pode ser definida como resistente quando não é suscetível a uma concentração de agente antimicrobiano utilizado na prática (CLOETE, 2003). Sua resistência pode ser classificada em natural ou intrínseca, quando a bactéria não dispõe de um alvo para o antibiótico ou resistência adquirida, devido à modificação da carga genética através de

mutações cromossômicas ou por mecanismos de transferência genética, sendo esta mediada por plasmídeos, transposons ou integrons que podem passar de uma bactéria para outra (DAZA, 1998).

As bactérias se fazem resistentes aos antibióticos desenvolvendo mecanismos de resistência que impedem que este exerça sua ação. Esta resistência pode ocorrer através de três mecanismos gerais (DAZA, 1998; WRIGHT, 2005; SILVEIRA et al., 2006):

- 1) Inativação ou destruição do antibiótico – enzimas catalisam a degradação do antibiótico ou modificam grupos funcionais farmacologicamente importantes presentes em sua estrutura, criando funções inativas para o reconhecimento molecular. As mais importantes são as betalactamases, que muitas bactérias são capazes de produzi-las;
- 2) Modificações bacterianas que impedem o antibiótico atingir o alvo – mutações nas purinas da parede celular, impedido a entrada de determinados antibióticos ou alterando o sistema de transporte; efluxo do antibiótico da célula, impedindo o acúmulo do mesmo em concentração suficiente para atuação eficaz;
- 3) Alteração do alvo – impedindo ou dificultando a ação do antibiótico. A exemplo das bactérias resistentes aos antibióticos quinolonas, que alteram a enzima DNA girase e passam a não sofrer ação do antimicrobiano.

Utilizando um destes mecanismos, ou uma combinação deles, cepas de bactérias vêm sobrepujando até antibióticos mais promissores, independente da classe química a qual pertençam (SILVEIRA et al., 2006).

Diversas pesquisas têm relatado que cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, dentre outras bactérias isoladas de animais e alimentos, têm adquirido resistência a diferentes antibióticos usados na medicina humana, tais como os do grupo aminoglicosídeos, β -lactâmicos, fluorquinolonas, sulfanamidas, tetraciclina entre outros (PIDDOCK, 2002; MAYRHOFER et al., 2004; BAUM e MARRE, 2005; OLIVEIRA et al., 2005; GUNDOGAN et al., 2005; PETERSEN et al., 2006; VILA et al., 2006; PESAVENTO et al., 2007; NORMANNO et al., 2007; ZHANG et al., 2008; KNEZEVIC e PETROVIC, 2008; MULVEY et al., 2009; MELENDEZ et al., 2010 e GOUSIA et al., 2011).

Os fármacos comumente utilizados no tratamento de doenças infecciosas podem ser agrupados de acordo com mecanismo de ação e classes químicas (Figura 1), tais como, inibidores da síntese da parede bacteriana (penicilinas e cefalosporinas), inibidores da síntese protéica (aminoglicosídeos e anfenicóis), inibidores da DNA girase bacteriana (quinolonas), inibidores da síntese do ácido tetraidrofólico (sulfonamidas) e Inibidor da síntese enzimática bacteriana, através da inativação do DNA (Nitroimidazólicos) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2007).

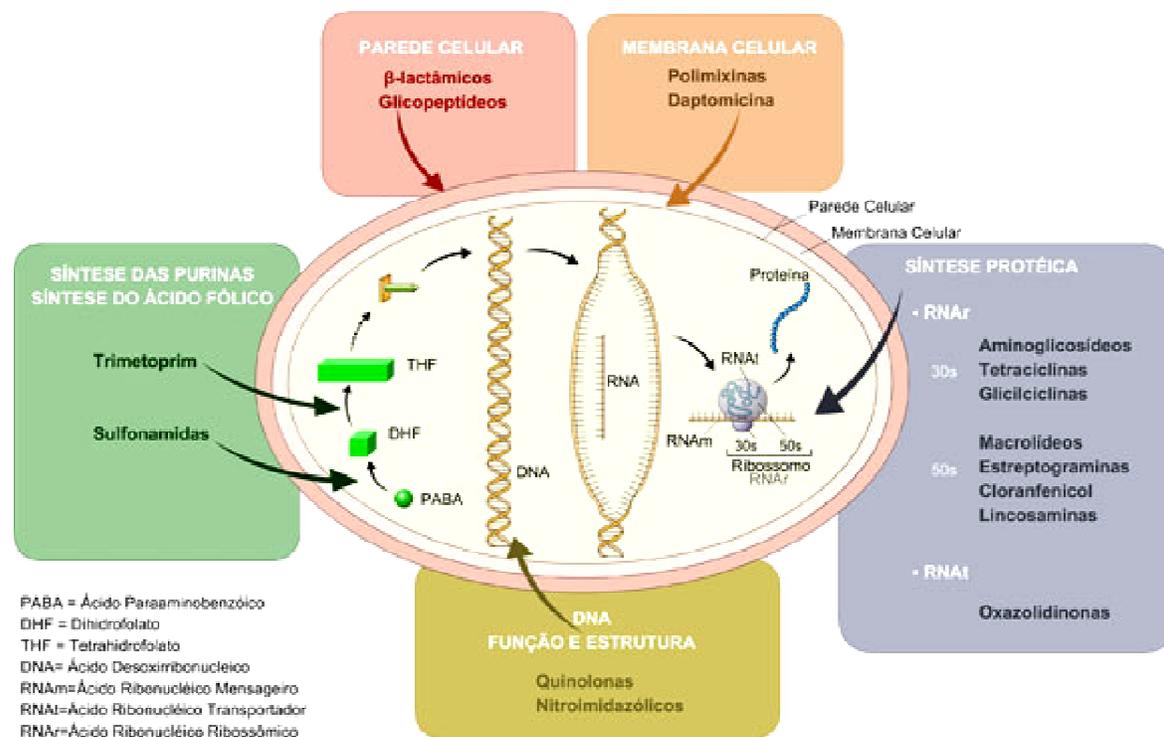


Figura 1: Sítios de ação dos antibióticos sobre a célula bacteriana (ANVISA, 2007).

Os danos que os antibióticos produzem na saúde humana são divididos em três aspectos: efeitos tóxicos diretos, indução de alergias e desenvolvimento de resistência. Este último traz uma preocupação maior, uma vez que elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos são registradas em estudos realizados nas diferentes espécies bacterianas isoladas de animais e alimentos, diminuindo o número de opções de antibióticos disponíveis para tratamento de doenças infecciosas e tornando necessária a busca de alternativas no controle de patógenos (MOTA et al., 2005).

Segundo Elumalai, Krishnappa e Neelakandan (2010) devem ser tomadas medidas para reduzir este problema, tais como controlar o uso de antibióticos e a realização de pesquisas para investigar as drogas a partir de fontes naturais.

De acordo com Hemaiswarya e Doble (2009), uma abordagem alternativa para a utilização de novos compostos antibacterianos é o uso de antibióticos sinérgicos, isto é, antibióticos usados em combinação com outros compostos, a exemplo de compostos vegetais, para descrever sua atividade supra-aditivo. Tal abordagem pode ser utilizada como uma estratégia de tratamento para retardar o aparecimento da resistência aos antibióticos, bem como diminuir a sua toxicidade.

Modificadores da atividade antibiótica é um termo usado para substâncias que modulam ou mesmo revertem a resistência bacteriana a certos antibióticos, como é o caso de vários produtos naturais de origem vegetal (extratos e fitoconstituintes) que alteram a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de efluxo (OLUWATUYI; KAATZ; GIBBONS, 2004).

3 Antimicrobianos naturais de origem vegetal e seus efeitos na conservação dos alimentos

Um antibiótico é atualmente definido como uma substância de origem biológica, semi-sintética ou sintética que atua especificamente sobre uma etapa essencial do metabolismo das bactérias ou dos fungos, levando-os a morte ou inibindo o seu crescimento. Podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química ou modo de ação sobre os microrganismos (WHO, 2000).

De acordo com Brull e Coote (1999), é crescente a resistência de microrganismos deteriorantes e patogênicos frente a alguns antimicrobianos usados para a conservação de alimentos como ácidos orgânicos fracos, peróxido de hidrogênio e agentes quelantes, além da resistência aos fármacos comumente utilizados na medicina humana e veterinária. Tornando necessárias as pesquisas de novos agentes antimicrobianos (OSTROSKY, 2008).

Outro fator a ser observado é que a população está envelhecendo e uma população mais idosa é também mais susceptível aos patógenos alimentares. Tudo isso faz a

indústria de alimentos buscar novos métodos de processamento e conservação dos alimentos para substituir os métodos tradicionais como o uso de altas temperaturas, acidificação, congelamento, desidratação, adição de sal e agentes químicos. Nos últimos anos as tecnologias mais estudadas para a inativação de microrganismos incluem os processos não térmicos, como o uso de alta pressão hidrostática, pulsos eletromagnéticos, sistemas de embalagens ativas ou com atmosfera modificada, compostos antimicrobianos naturais e bioconservação (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Atualmente é crescente o número de consumidores que exigem da indústria de alimentos a adoção de uma política decrescente no uso de aditivos químicos sintéticos, visando a segurança alimentar, bem como aqueles relacionados ao retardo das ações microbianas que conduzem o alimento a um estado deteriorado. Também, seguindo esta tendência e tomando como base a real ou suposta toxicidade de alguns aditivos químicos aos consumidores e o abuso de utilização destes compostos, os aspectos legislativos da produção de alimento têm demandado uma diminuição nos índices de utilização de aditivos químicos na indústria de alimentos (BRULL; COOTE, 1999).

Por definição, condimentos e especiarias são produtos aromáticos de origem vegetal empregados principalmente para conferir sabor aos alimentos, que, além dessa utilidade, possuem também propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais (SOUZA et al., 2004).

Diversos estudos têm relatado a ação antimicrobiana de vegetais (HAMMER et al., 1999; DELLACASSA et al., 1999; BURT, 2004; CARVALHO Jr, 2004; DUARTE et al., 2005; RIOS; RECIO, 2005; BERTINI et al., 2005; GALLUCCI et al., 2006; OLIVEIRA et al. 2006; NASCIMENTO et al., 2007; CELIKTAS et al., 2007; HEMAISWARYA; DOBLE, 2009; PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010). Sabe-se que todos são possuidores de vias metabólicas secundárias que dão origem a compostos incluindo alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos, óleos, dentre outros, que por sua vez são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies vegetais (SOUZA; LIMA; NARAIM, 2003).

Diante deste cenário, os compostos de natureza vegetal, em especial os 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 sabores característicos, atualmente apresentam uma nova perspectiva de emprego (SOUZA; LIMA; NARAIM, 2003).

A exemplo tem-se o “sistema antimicrobiano natural”, um novo método de conservação de alimentos, que se baseia na aplicação do sinergismo de compostos de origem animal, microbiana e/ou vegetal de comprovados potenciais antimicrobianos, somados a técnicas físicas de conservação, os quais em conjunto poderiam proporcionar a formação de um ambiente desfavorável ao desenvolvimento microbiano (SOUZA, 2006).

O maior interesse na área de aplicação de extratos e óleos essenciais de plantas está na inibição do desenvolvimento e redução do número de patógenos mais importantes de origem alimentar, tais como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, e *Listeria monocytogenes* (BURT, 2004). E segundo Duarte (2006) extratos e óleos essenciais de plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Usos práticos dessas atividades são sugeridos em humanos e animais, bem como na indústria de alimentos, auxiliando na conservação dos mesmos.

A possibilidade da descoberta de antimicrobianos naturais e sua possível aplicação prática na conservação de alimentos têm impulsionado muitos pesquisadores a se aprofundarem em pesquisas, tomando como base promissores resultados observados em experimentos *in vitro*. No entanto, sabe-se que os componentes das matrizes alimentícias podem, possivelmente, interagir com os princípios ativos destes potenciais compostos antimicrobianos resultando em uma ação moderada ou pouco significativa (SOUZA, 2006).

4 Propriedades antimicrobianas do óleo essencial de alecrim

4.1 Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

O alecrim, pertencente à Família Lamiaceae, é uma especiaria conhecida desde a antiguidade por seus efeitos medicinais (Figura 2). Atualmente, diversos estudos têm apontado tal especiaria como antioxidante e antimicrobiana. É uma das primeiras espécies da família a serem identificadas e classificadas (AFONSO et al., 2008).

É um subarbusto muito ramificado de 0,50 a 1,50 m de altura, sempre verde, com hastes lenhosas, folhas pequenas, sésseis, finas, opostas e lanceoladas, de flores azuis ou brancas e sabor picante. A parte inferior das folhas é de cor verde acinzentada, enquanto a superior é quase prateada. A planta exala aroma forte e agradável, sendo uma erva muito usada atualmente. Utilizada com fins culinários, medicinais e aromáticos, sendo o óleo essencial aplicado em cosméticos e perfumaria (PORTO; GODOY, 2001; LORENZI; MATOS, 2006; MAY et al., 2010). É nativa no Mediterrâneo, cultivada também na Ásia Central, Índia, Sudeste Asiático, África do Sul, Austrália e Estados Unidos. No Brasil sua produção se localiza, principalmente, na região sul do país (CARVALHO JÚNIOR, 2004).



Figura 2: Folhas de *Rosmarinus officinalis* L.

A família Lamiaceae engloba diversas plantas aromáticas, das quais é possível extrair óleo essencial muito cheiroso, que apresenta em sua composição química, complexa mistura de hidrocarbonetos, álcoois e compostos carbonílicos. É geralmente aceito que os óleos essenciais, secretados pelas glândulas capilares, ao cobrirem as folhas protegem a planta contra herbívoros e patógenos, enquanto o óleo secretado pelas glândulas capilares nas flores serve para atrair agentes polinizadores, no caso da família Lamiaceae, principalmente as abelhas (WERKER, 1993).

O alecrim, nome pelo qual é conhecido em nosso país, também é popularmente conhecido como alecrim-de-jardim e alecrim-rosmarino. Seu nome em latim, "*Rosmarinus*" significa "o orvalho que vem do mar", em alusão ao seu aroma abundante das praias mediterrâneas onde o alecrim crescia e se desenvolvia espontaneamente. A palavra "*officinalis*" significa que era uma planta reconhecida pela prática médico-herborista (FARIA, 2005).

Existem lendas e tradições a respeito desta planta. Supunha-se que só crescia no jardim dos justos e tinha fama de reforçar a memória, por isso converteu-se no símbolo da fidelidade, da amizade e da lembrança. Quando faltava incenso nas igrejas, o alecrim era queimado como substituto. Os estudantes gregos usavam-no com frequência durante as provas, pois acreditavam em seu poder de reforçar o cérebro e a memória, devido a sua ação dilatadora, aumentando assim, a irrigação e exercendo efeito estimulante (PORTO; GODOY, 2001).

Na farmacologia é empregado *in natura*, como outras drogas vegetais ricas em óleos voláteis, na preparação de infusões ou na aromatização de fórmulas destinadas ao uso oral. No setor alimentício, por seu sabor agridoce, ele é utilizado na panificação, em preparações que contenham carne, para adornar saladas, em batatas fritas, caldos verdes, sobremesas, biscoitos, geléias, saladas de frutas, marmeladas e vinhos quentes. Nos Estados Unidos é utilizado em carnes, aves, peixes e linguiças e no Marrocos é adicionado à manteiga e a outros alimentos para aumentar a vida-de-prateleira. (PORTO; GODOY, 2001).

4.2 Óleo Essencial

Historicamente óleos essenciais de plantas aromáticas, de reconhecidos potenciais bioativos, são utilizados para muitos propósitos, tais como alimentos, fitoterápicos e perfumaria.

Os óleos essenciais, produtos odoríferos e voláteis do metabolismo secundário da planta, têm uma larga aplicação como aromatizante em alimentos e também nas indústrias de conservantes. Nos últimos anos, vários pesquisadores relataram que monoterpenos ou sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados são os principais

componentes dos óleos essenciais que apresentam potencial atividade antimicrobiana (CAKIR et al., 2004).

Diversas pesquisas têm revelado que a atividade antibacteriana de óleos essenciais pode ser influenciada por vários parâmetros, com destaque para o tipo, composição, concentração, processamento e estocagem do óleo essencial. Por outro lado, o tipo de microrganismo e composição do substrato utilizado para crescimento do microrganismo também podem fornecer resultados distintos para esta propriedade dos óleos (BERTINI et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2007).

A composição dos óleos essenciais das plantas é determinada pela espécie, variedade, período de colheita e tipo de processamento (GUILLÉN; CABO; BURILLO, 1996), e está diretamente ligada a atividade antimicrobiana do óleo junto a outros fatores, tais como região da planta, método de análise, parte da planta utilizada, preparo da matéria-prima, tipo e condições de cultivo do microrganismo como: meio de cultura, concentração da substância testada, agentes diluentes do óleo, dentre outros fatores (DELLACASSA et al., 1999; HAMMER et al., 1999; BURT, 2004; CARVALHO JÚNIOR, 2004; DUARTE et al., 2005; RIOS; RECIO, 2005; BERTINI et al., 2005; CELIKTAS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2007). Algumas destas interferências como tipo de microrganismo e a região de cultivo da planta, podem ser observadas no Quadro 1 (Adaptado de BURT, 2004), que apresenta a concentração inibitória mínima de óleo essencial de alecrim frente a diferentes bactérias associadas à contaminação em alimentos.

De acordo com revisão feita por Porto e Godoy (2001), os monoterpenos estão presentes majoritariamente no óleo essencial de alecrim. Entretanto, mesmo que se considere os óleos provenientes dos países essencialmente produtores como padrões internacionais ainda há discrepância entre as principais substâncias (ora são hidrocarbonetos, como pinenos, mirceno, canfeno e ora são oxigenadas, como cânfora, 1,8-cineol e borneol). Estes autores relataram também que a fraca atividade antimicrobiana do óleo, frente a alguns microrganismos, é devido à ausência de núcleos aromáticos contendo um grupo funcional polar nos principais compostos do óleo.

Quadro 1: Compilação de dados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* testado *in vitro* contra bactérias associadas à contaminação em alimentos.

| Bactéria testada | CIM (µl/mL) | Origem da planta* | Referências |
|-------------------------------|-------------|--|---|
| <i>Escherichia coli</i> | 1 - >900 | Egito, Reino Unido, Austrália, Itália, Itália Irã, Brasil. | Farag et al. 1989; Smith-Palmer et al., 1998; Hammer et al., 1999; Pintore et al., 2002; Angioni et al., 2004; Gachkar et al., 2007; Zago et al., 2009. |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | >20 | Austrália | Hammer et al., 1999. |
| <i>Bacillus cereus</i> | 0,2 | Marrocos | Chaibi et al., 1997. |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 0,2 – 2,0 | Irã, Reino Unido | Gachkar et al., 2007 Smith-Palmer et al., 1998. |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0,4 - 10 | Egito, Reino Unido, Austrália, Itália, Irã, Brasil | Farag et al. 1989; Smith-Palmer et al., 1998; Hammer et al., 1999; Pintore et al., 2002; Zago et al., 2009. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | >900 | Itália | Angioni et al., 2004. |

* Países seqüenciados na ordem das referências. (Adaptado de Burt, 2004)

Diferentes mecanismos estão envolvidos na ação dos óleos essenciais sobre os microrganismos. As inibições mais freqüentes envolvem componentes fenólicos, que sensibilizam a bicamada lipídica da membrana celular e alteram a atividade dos canais de cálcio, causando aumento da permeabilidade e liberação dos constituintes intracelulares vitais. Também podem ocorrer danos ao sistema enzimático do microrganismo envolvido na produção de energia e na síntese de componentes estruturais, bem como a destruição ou inativação de material genético. Os grupos hidroxilas fenólicos são bastante reativos e formam pontes de hidrogênio com sítios ativos de enzimas-alvo, inativando-as (PORTO; GODOY, 2001).

Segundo Burt (2004) compostos naturais podem agir sobre a célula bacteriana desintegrando a membrana citoplasmática, desestabilizando a força próton motriz, fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulando o conteúdo da célula. No entanto,

considerando-se o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes em óleos essenciais, provavelmente, sua atividade antibacteriana não é atribuível a um mecanismo específico, podendo haver outros alvos na célula (Figura 3).

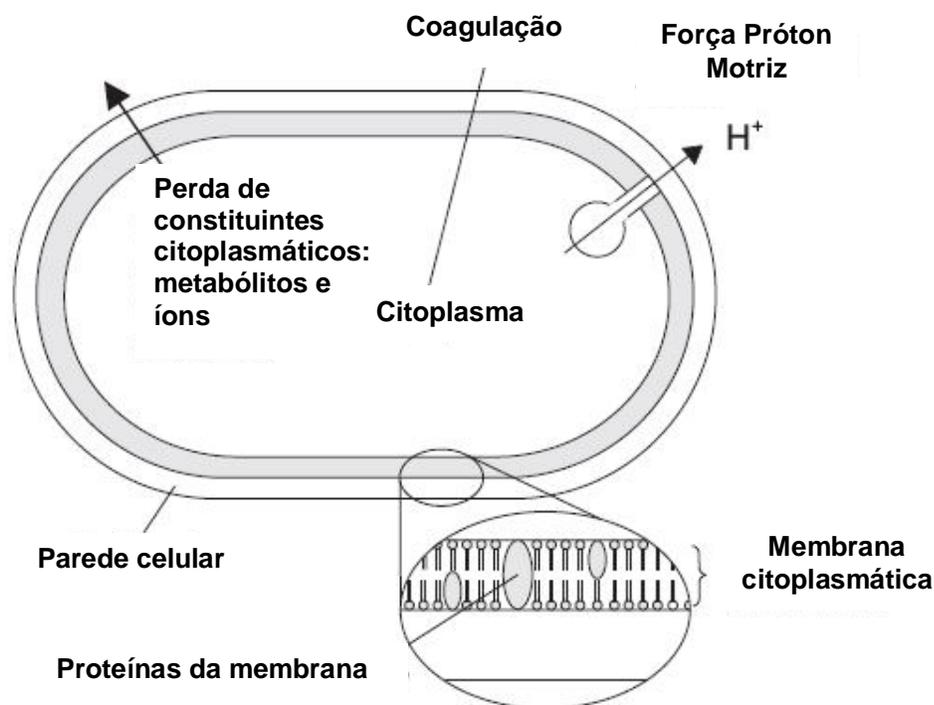


Figura 3 – Possíveis sítios e mecanismos de ação de antimicrobianos naturais na célula bacteriana (Adaptado de Burt, 2004).

O uso do óleo essencial de alecrim como agente antimicrobiano têm sido relatado por diversos autores como Svoboda e Deans (1992), Angioni et al. (2004), Oluwatuyi, Kaatz e Gibbons (2004), Atti-Santos (2005), Santoyo et al. (2005), Bozin et al. (2007), Gachkar et al. (2007), Tebaldi (2008), Luqman et al. (2009), Van Vuuren et al. (2009), Zago et al. (2009), Jarrar, Abu-Hijleh e Adwan (2010), Boix et al. (2010), Hussain et al. (2010).

No entanto, o direcionamento para uma utilização adequada do óleo essencial pode estar intimamente relacionado com a sua composição. Por exemplo, um óleo rico em cânfora pode constituir bom agente antimicrobiano em alimentos, mas outro com predominância de 1,8-cineol pode ser preferido para uso terapêutico. Por isso, determinar a composição química do óleo essencial é importante para aproveitar suas

potencialidades e valorizá-lo comercialmente, visto a caracterização está diretamente ligada com o seu potencial antimicrobiano (PORTO; GODOY, 2001).

5 REFERÊNCIAS

AFONSO, M.S; SANT'ANA, L.S.; PINTO, J.P.A.N.; XIMENES, B. 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.

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.

ANDRIGHETO, C. **Disseminação de *Salmonella* Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica.** São Paulo, 99p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, 2006.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COISSON, J.D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **J Agr Food Chem.**, v.52, p.3530- 3535, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Antimicrobianos – Bases Teóricas e Uso Clínico. 2007.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm> Acesso em: 06 mar. 2011.

ATTI-SANTOS, A. C. Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils, **Brazilian Archives of Biology and Technology.** v.48, p.1035-1039, 2005.

BALABAN, N., RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **Int. J. Food Microbiol.** v.61, p.1–10, 2000.

BAUM, H Von; MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **International Journal of Medical Microbiology.** v.295, p.503–511, 2005.

BERTINI, L. M., PEREIRA, A. F., OLIVEIRA, C. L. L., MENEZES, E. A., MORAIS, S. M., CUNHA, F. A., CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, p.80-83, 2005.

BOIX, Y.F.; VICTÓRIO, C.P.; LAGE, C.L.S.; KUSTER, R.M. Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. **Quím. Nova**, v.33, p.255-257, 2010.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; JOVIN, E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. **J Agric Food Chem**, v.55, p.7879–7885, 2007.

BOUALLÈGUE-GODET, O.; SALEM, Y.B.; FABRE, L.; DEMARTIN, M.; GRIMONT, P.A.D.; MZOUGH, R.; WEILL, F.X. Nosocomial outbreak caused by *Salmonella enterica* serotype Livingstone producing CTX –M-27 extended-spectrum - lactamase in a neonatal unit in Sousse, Tunisia. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.1037-1044, 2005.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.1-17, 1999.

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.

CAKIR, A., KORDALI, S., ZENGİN, H., IZUMI, S., & HIRATA, T. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. **Flavour and Fragrance Journal**, v.19, p.62–68, 2004.

CARVALHO Jr, R.N. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo**. Campinas, 151p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Salmonella* surveillance: annual summary, 2003. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2004. Disponível em: [www.cdc.gov/ncidod/.../2003/Salmonella Introduction2003.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/.../2003/Salmonella%20Introduction2003.pdf). Acesso em: 22 dez. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Salmonella* serotype Enteritidis. 2010. Disponível em: http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonella_enteritidis/. Acesso em: 22 dez. 2010.

CELIKTAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDİR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chem**. v.100, p.553-559, 2007.

CHAIBI, A., ABABOUC, L.H., BELASRI, K., BOUCETTA, S., BUSTA, F.F. Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. **Food Microbiology**, v.14, p.161–174, 1997.

CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **Int Biodeter Biodegradation**. v.51, n.4, p.277-282, 2003.

DALTON, C.B., MINTZ, E.D., WELLS J.G., BOPP, C.A., TAUXE, R.V. Outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in American adults: a clinical and epidemiologic profile. **Epidemiol. Infect.** v.123, n.1, p.9–16, 1999.

- DAZA, R.M. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud.* v.22, p.57-67, 1998.
- DEVASIA, R.A., JONES, T.F., WARD, J., STAFFORD, L., HARDIN, H., BOPP, C., BEATTY, M., MINTZ, E., SCHAFFNER, W. Endemically acquired foodborne outbreak of enterotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O169:H41. *Am. J. Med.* v.119, n.2, p.168, 2006.
- DELLACASSA, E., LORENZO, D., MOYNA, P., FRIZZO, C.D., ATTI-SERAFINI, L., DUGO, P. *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) essential oils from the south of Brazil and Uruguay. *Journal of Essential Oils Research.* v.11, p.27-30, 1999.
- DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, v.14, p.273-285, 2004.
- DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multiciência*, Campinas, n. 7, 16p, 2006.
- DUARTE, M.C.T., FIGUEIRA, G.M., SARTORATTO, A., REHDER, V.L.G., DELARMELENA, C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* v.97, p.305-311, 2005.
- DUNKLEY, K.D.; KUBENA, L. F.; NISBET, D. J.; RICKE, S. C.; CALLAWAY, T.R., CHALOVA, V.I., MCREYNOLDS, J.L., HUME, M.E., DUNKLEY, C.S. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe.* v.15, p.26-35, 2009.
- ELUMALAI, K., KRISHNAPPA, K., NEELAKANDAN, T. Antibacterial activity of six essential oil against some pathogenic bacteria. *Inter.J.Rece.Sci.Res.*, v.1, p.21-27, 2010.
- FARIA, L. R. D. **Validação farmacológica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim): atividade antiinflamatória e analgésica.** Alfenas, 49p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Unifenas, 2005.
- FARAG, R.S., DAW, Z.Y., HEWEDI, F.M., EL-BAROTY, G.S.A. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection.* v.52, n.9, p.665– 667, 1989.
- FORSYTHE, S.J. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- HALL, G., VALLY, H., KIRK, M. Foodborne Illnesses: Overview. *International Encyclopedia of Public Health.* p.638-653, 2008.
- GACHKAR, L., YADEGARI, D., REZAEI, M.B., TAGHIZADEH, M., ASTANEH, S.A., RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, v.102, p.898-904, 2007.
- GALLUCCI, N., CASERO, C., OLIVA, M., ZYGADLO, J., DEMO, M. Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. *Mol. Med. Chem.* v.10, p.30-32, 2006.

- GOUSIA, P., ECONOMOU, V., SAKKAS, H., LEVEIDIOTOU, S., PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.1, p.27-38, 2011.
- GUILLÉN, M.D.; CABO, N.; BURILLO, J. Characterization of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.70, p.359-63, 1996.
- GUNDOGAN, N., CITAK, S., YUCEL, N., DEVREN, A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. **Meat Science**. v.69, p.807–810, 2005.
- 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.
- HARADA, K., ASAI, T. Role of Antimicrobial Selective Pressure and Secondary Factors on Antimicrobial Resistance Prevalence in *Escherichia coli* from Food-Producing Animals in Japan. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 12 p, 2010. doi:10.1155/2010/180682
- HARRIS, R. Sinergism in the essential oil world. **The International Journal of Aromatherapy**, 12, p.179-186. 2003.
- HEMAISWARYA, S., DOBLE, M., Synergistic Interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria, **Phytomedicine**, v.16, p.997-1005, 2009.
- HUSSAIN, A. I., ANWAR, F., CHATHA, S. A. S., JABBAR, A., MAHBOOB, S., NIGAM, P. S. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.41, p.1070-1078, 2010.
- JARRAR, N., ABU-HIJLEH, A., ADWAN, K. Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L., alone and in combination with cefuroxime, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. p.121-123, 2010.
- JAY, J.M. Introdução aos microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: _____. Microbiologia de alimentos. Porto Alegre: Artmed, cap.22, p. 454-489, 2005.
- KOTTWITZ, L.B.M., OLIVEIRA, T.C.R.M., ALCOCER, I., FARAH, S.M.S.S, ABRAHÃO, W.S.M., RODRIGUES, D.P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2010.
- KNEZEVIC, P., OLGA PETROVIC, O. Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.31, p.360–363, 2008.
- LAMBERT P.A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram positive bacteria and mycobacteria. **J. Appl. Microbiol.** 92, Supplement 1, p.46S-54. 2002.

- LEE, G.Y., JANG, H.I., HWANG, I.G., RHEE, M.S. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. **International Journal of Food Microbiology**. v.134, p.196–200, 2009.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 512 p.
- LUQMAN, S., DWIVEDI, G.R., DAROKAR, M.P., KALRA, A., KHANUJA, S.P. Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. **Altern Ther Health Med**, v.13, p.54-59, 2007.
- MAY, A. SUGUINO, E., MARTINS, A.N., BARATA, L.E.S., PINHEIRO, M.Q. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.12, n.2, p.195-200, 2010.
- MAYRHOFER, S., PAULSEN, P., SMULDERS, F.J.M., HILBERT, F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. **International Journal of Food Microbiology**. v.97, p.23–29, 2004.
- MELENDEZ, S.N., HANNING, I., HAN, J., NAYAK, R., CLEMENT, A.R., WOOMING, A. HERERRA, P., JONES, F.T., FOLEY, S.L., RICKE, S.C. *Salmonella enterica* isolates from pasture-raised poultry exhibit antimicrobial resistance and class I integrons. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.1957–1966, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Ano 5, n.06, 2005.
- MOTA, R. A., SILVA, K. P. C., FREITAS, M. F. L., PORTO, W. J. N., SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz. Journal vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
- MULVEY, M.R., SUSKY, E., MCCRACKEN, M., MORCK, D.W., READ, R.R. Similar cefoxitin-resistance plasmids circulating in *Escherichia coli* from human and animal sources. **Veterinary Microbiology**. v.134, p.279–287, 2009.
- MURRAY, R.J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. **Intern Med J**. v.35, n.2, S106–119, 2005.
- NASCIMENTO, P.F.C., NASCIMENTO, A.C., RODRIGUES, C.S., ANTONIOLLI, A.A., SANTOS, P.O., BARBOSA JUNIOR, A.M., TRINDADE, R.C. Antimicrobial activity of the essential oils: a multifactor approach of the methods. **Rev Bras Farmacogn.**, v.17 p.108-113, 2007.
- NORMANNO, G., CORRENTE, M., LA SALANDRA, G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N.C. PARISI, A., GRECO, G., BELLACICCO, A.L., VIRGILIO, S., CELANO, G.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal of Food Microbiology**. v.117, p.219–222, 2007.
- NORMANNO, G., FIRINUB, A., VIRGILIO, S., MULAB, G., DAMBROSIO, A., POGGIUB, A., DECASTELLIC, L., MIONID, R., SCUOTAE, S., BOLZONIF, G., DI GIANNATALEG, E., SALINETTIH, A.P., LA SALANDRAI, G., BARTOLI, M.,

ZUCCONB, F., PIRINOB, T., SIASB, S., PARISII, A., QUAGLIAA, N.C., CELANO, G.V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, p.73–79, 2005.

OLIVEIRA, R.A.G., LIMA, E.O., VIEIRA, W.L., FREIRE, K.R.L., TRAJANO, V.N., LIMA, I.O., SOUZA, E.L., TOLEDO, M.S., SILVA FILHO, R.N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.16, p.77-82, 2006.

OLIVEIRA, S.F.D., FLORES, F.S., SANTOS, L.R., BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **Int. J. Food Microbiol.**, v.97, p.297–305, 2005.

OLUWATUYI, M., KAATZ, G.W., GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**. v.65, p.3249-3254, 2004.

OLSEN, S.J., MacKINON, L.C., GOULDING, J.S., BEAN, N.H., SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, p.1-51, 2000.

OSTROSKY, E.A., MIZUMOTO, M. K., LIMA, M. E. L., KANEKO, T. M., NISHIKAWA, S. O., FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

PALANIAPPAN, K., HOLLEY, R.A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v.140, p.164–168, 2010.

PESAVENTO, G., DUCCI, B., COMODO, N., LO NOSTRO, A. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Food Control**. v.18, p.196–200, 2007.

PEREZ, K. J. **Avaliação da capacidade de invasão intestinal de Salmonella Enteritidis envolvida em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre, 100p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

PETERSEN, A, CHRISTENSEN, JP, KUHNERT, P, BISGAARD, M AND OLSEN, JE. Vertical transmission of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* within an integrated broiler operation. **Veterinary Microbiology**. v.116, p.120–128, 2006.

PIDDOCK, L.J.V. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. **FEMS Microbiology Reviews**. v.26, p.3 – 6, 2002.

PIGOTT, D.C., Foodborne Illness. **Emerg Med Clin N Am**. v.26, p.475–497, 2008.

PINTORE, G., USAI, M., BRADESI, P., JULIANO, C., BOATTO, G., TOMI, F., CHESSA, M., CERRI, R., CASANOVA, J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**, v.17, p.15–19, 2002.

- PIZZOLITTO, N.; PIZZOLITTO, E.L.; SIMÕES, M.J.S. Espectro de agentes etiológicos associados a surtos de doenças transmitidas por alimentos em núcleos receptores turísticos de três regiões geográficas do Estado de São Paulo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.3, p. 301 - 310, 2007.
- 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, 2001.
- QUIROGA, M.; OVIEDO, P.; CHINEN, I.; PEGELS, E.; HUSULAK, E.; BINZTEIN, N.; RIVAS, M.; SCHIAVONI, L.; VERGARA, M. Asymptomatic infections by diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Misiones, Argentina, during the first twenty months of their lives. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v.42, n. 1, p. 9-15, 2000.
- REIS, R. B.; KRUGER, C. S.; MACIEL, M. S. *Salmonella* spp. em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá-MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas. **Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 74-78, 1995.
- RÍOS, J.L, RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.** v.100, p80-84, 2005.
- RIM, J.Y., BACON, A.E. Prevalence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in a random sample of healthy individuals. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v.28, n.9, p.1044–1046, 2007.
- SANDEL, M.K., MCKILLIP, J.L. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. **Food Control.** v.15, p.5–10, 2004.
- SANTOYO S, CAVERO S, JAIME L, IBANEZ E, SENORANS FJ, REGLERO G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection.**, v.68, p.790–795, 2005.
- SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.17, p.14-56, 2004.
- SHINOHARA, N.K.S., BARROS, V.B., JIMENEZ, S.M.C., MACHADO, E.C.L., DUTRA, R.A.F. LIMA FILHO, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, n.5, p.1675-1683, 2008.
- SILVA, E.M., DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola.** v.4, n.2, p.85-100, 2002.
- SILVA, J.A., SILVA, W.D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, n.3, p.175-196, 2005.
- SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M.M.; TERENCEZI, H.. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Quím. Nova.** v.29, n.4, p. 844-855, 2006.

SMITH-PALMER, A., STEWART, J., FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Food Microbiology**. v.26, p.118–122, 1998.

SOUZA, E. L., LIMA, E. O., NARAIM, N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente as perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene Alimentar**, v.17, n.113, p. 38-42, 2003.

SOUZA, S.M.C., PEREIRA, M.C., ANGÉLICO, C.L., PIMENTA, C.J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciênc. Agrotec.**, v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.

SOUZA, E.L. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): Uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos**. Recife, 143p. Tese (dotourado), Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

SURESH, T., HATHA, A.A.M., SCREENIVASA, D. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis and other salmonellas in the eggs and eggstoring trays from retails markets of Coimbatore, south India. **Food Microbiology**. v.23, n.3, p.294-299, 2006.

SVOBODA, K.P., DEANS, S.G. A study of the variability of rosemary and sage and their volatile oils on the British market: their antioxidative properties. **Flavour and Fragrance Journal**. v.7, p.81-87, 1992.

TEBALDI, V.M.R. **Análise e potencial de uso de óleos essenciais no controle de *Pseudomonas* sp. e na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa***. Lavras, 94p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2008.

TOZETTO, S.M. **Sorotipos e tipagem molecular de isolados de *Salmonella entérica* no Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004**. Paraná, 83p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, 2006.

Van VUUREN, S.F., SULIMAN, S., VILJOEN, A.M. The antimicrobial activity of four commercial essentials oils in combination with conventional antimicrobials. **Lett Appl. Microbiol.** v.48, p.440–446, 2009.

VENKINBURGH, J.C.V.; GUNN, J.S. PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. **Infec. Immun.**,v. 67, p.1614-1622, 1999.

VIEIRA, M.A.M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, São Paulo: v.33, n.4, p.406-414, 2009.

WERKER, E. Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae: a review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 8, n. 5, p. 249-255, 1993.

WHITE, D.G.; ZHAO, S.; SIMJEE, S, WAGENR, D.D.; McDERMOTT. P.F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infections**, v.4, n.4, p.405-412, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Who global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. 2000. Disponível em: whqlibdoc.who.int/hq/2000/who_cds_csr_aph_2000.4.pdf. Acesso em: 22 dez. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Food and Health in Europe: a new basis for action. Regional Publications European Studies, nº96. 2004. Disponível em: http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0005/74417/E82161.pdf. Acesso em: 06 mar. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Drug-resistant *Salmonella*, nº139. 2005. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acesso em: 06 mar. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Food safety and foodborne illness, nº237. World Health Organization, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>. Acesso em: 06 mar. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. General information related to foodborne disease. 2009. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/general/en/index.html. Acesso em: 06 mar. 2011.

WEINBERGER, M.; KELLER, N. Recent trends in the epidemiology of non-typhoid

Salmonella and antimicrobial resistance: the Israeli experience and worldwide review. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, 18:513-521, 2005.

WRIGHT, G.D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Adv Drug Deliv Rev.** v.57, n.10, p.1451-70, 2005.

VILA, J., S´ANCHEZ-C´ESPEDES, J., SIERRA, J.M., PIQUERAS, M. NICOL´AS, E., FREIXAS, J., E. GIRALT, E. Antibacterial evaluation of a collection of norfloxacin and ciprofloxacin derivatives against multiresistant bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v.28, p.19–24, 2006.

ZAGO, J.A.A., USHIMARU, P.I., BARBOSA, L.N., FERNANDES JR, A. Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains from human infections. **Rev Bras Pharmacogn.**, v.19, p.828-33. 2009.

ZHANG, DAN-feng, Jiang, B., XIANG, ZHI-ming, WANG, SAN-ying. Functional characterisation of altered outer membrane proteins for tetracycline resistance in *Escherichia coli*. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v.32, p.315–319, 2008.

CAPÍTULO 2

Interação sinérgica entre o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e drogas antimicrobianas frente a bactérias isoladas de alimentos

RESUMO

As doenças veiculadas por alimentos vêm se tornando cada vez mais preocupantes, em virtude do aumento da resistência bacteriana aos fármacos, comumente empregados nos tratamentos de doenças. Logo, torna-se indispensável a busca por novos compostos. Uma alternativa são os óleos essenciais provenientes do metabolismo secundário das plantas e conhecidos como agentes antimicrobianos. Diante deste quadro, o objetivo desta pesquisa foi analisar quimicamente o óleo essencial das folhas de *Rosmarinus officinalis* L., avaliar sua atividade antimicrobiana frente às cepas isoladas de alimentos: *Staphylococcus coagulase positiva*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* e seu efeito sinérgico associados às drogas. O óleo essencial (OEA) obtido através de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado foi analisado em CG-EM, tendo como principais compostos identificados o α -pineno (19,8%), β -mirceno (24,2%), 1,8 cineol (22,2%) e verbenona (9,3%). A atividade antimicrobiana do OEA foi avaliada através do método de difusão em discos. Todas as cepas ensaiadas foram susceptíveis a ação do OEA. A determinação da concentração inibitória mínima - CIM do óleo foi determinada pela técnica de difusão em ágar - perfuração em poços, obtendo uma CIM de 40% (v/v) para uma cepa de *Salmonella* e uma CIM de 20% (v/v) para as demais. Das sete cepas avaliadas, quatro (duas de *Salmonella* e duas de *E.coli*) apresentaram resistência aos fármacos testados. Sendo submetidas à avaliação do sinergismo da ação do OEA associado às drogas. As duas cepas de *Salmonella* avaliadas apresentaram susceptibilidade à ação combinada do óleo essencial com os antibióticos β -lactâmicos (ampicilina, amoxicilina/clavulanato e cefalotina) e com o nitroimidazólico (nitrofurantoína). Para as cepas de *Escherichia coli*, foi observado efeito indiferente e/ou antagônico na cepa multirresistente MOA51 para seis das dez drogas avaliadas. Do total de 19 ensaios, 11 apresentaram efeito sinérgico, cinco se mostraram indiferentes à associação do antibiótico com o OEA e três apresentaram antagonismo, exibindo halos de inibição menor que a ação isolada do antibiótico. Nas condições experimentais, os resultados obtidos indicam ser promissora a utilização de óleo essencial de alecrim no controle de patógenos de origem alimentar, bem como a sua associação com alguns antibióticos no controle das cepas avaliadas.

Palavras-chave: sinergismo, óleo essencial de alecrim, resistência bacteriana, fármacos.

ABSTRACT

Foodborne illnesses are becoming increasingly concern because of increased bacterial resistance to drugs, commonly used in treatments of diseases. Soon, it becomes indispensable to search for new compounds. An alternative are essential oils from the secondary metabolism of plants and known as antimicrobials. Given this context, the aims was chemically characterize *Rosmarinus officinalis* L. essential oil, to evaluate its antimicrobial activity against strains isolated from foods: *Staphylococcus* coagulase positive, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* and its synergistic effect associated with drugs. The essential oil (EOR) obtained through hydrodistillation in a modified Clevenger apparatus was analyzed in GC-MS, the main compounds identified the α -pinene (19.8%), β -myrcene (24.2%), 1,8 cineole (22.2%) and verbenone (9.3%). The antimicrobial activity of the EOR was assessed by the diffusion method discs. All strains tested were susceptible to the action of the EOR. The determination of minimum inhibitory concentration - MIC of the oil was determined by the agar diffusion method – drilling wells, getting an MIC of 40% (v/v) for a strain of *Salmonella* and an MIC of 20% (v/v) for others. Of the seven strains tested, four (two - *Salmonella* and two - *E.coli*) were resistant to the drugs tested. Being submitted to evaluation of the synergistic action of the drugs associated with EOR. The two *Salmonella* strains evaluated were susceptible to combined action of essential oil with β -lactam antibiotics (ampicillin, amoxicillin /clavulanate and cephalothin) and the nitroimidazole (nitrofurantoin). To the strains of *Escherichia coli*, was observed indifferent effect and / or antagonistic in multidrug resistant strain to MOA51 six of the ten drugs studied. From a total of 19 trials, 11 showed a synergistic effect, five showed indifferent to the association of antibiotics with the EOR and three showed antagonism, showing inhibition zones smaller than the action isolated from the antibiotic. These experimental conditions, the results show to be promising for the use of rosemary essential oil alone or combined with antibiotics to control bacteria evaluated.

Key-words: synergism, rosemary essential oil, bacterial resistance, drugs.

1 INTRODUÇÃO

Durante anos, as doenças transmitidas por alimentos resultantes do consumo de alimentos contaminados com bactérias patogênicas e /ou suas toxinas, tem sido de grande preocupação para a saúde pública (KIM et al., 1995). Arelado a este fato, também é crescente o aparecimento de microrganismos resistentes aos antibióticos, devido ao seu uso extensivo em práticas terapêuticas em humanos e como promotores de crescimento e tratamento de doenças infecciosas em animais (BARTON, 2000; WHITE et al., 2002; SENGELOV et al., 2003). Tal situação aumentou o interesse pelo uso de compostos antimicrobianos naturais tais como extratos de especiarias e ervas utilizadas para a conservação de alimentos (SHAN et al., 2007).

As doenças infecciosas ainda representam uma importante causa de morbidade e mortalidade entre os seres humanos, especialmente nos países em desenvolvimento. Mesmo as indústrias farmacêuticas tendo produzido uma série de novas drogas antimicrobianas nas últimas três décadas, a resistência de microrganismos a essas drogas aumentou. Em geral, as bactérias têm a capacidade genética para transmitir e adquirir resistência aos fármacos utilizados como agentes terapêuticos (NASCIMENTO et al., 2000), sendo frequentes os relatos sobre isolamentos de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis as drogas usadas na rotina terapêutica e que se tornaram resistentes a todas, ou a quase todas, as drogas disponíveis no mercado (SAKAGAMI; KAJAMURA, 2006).

Devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos na pecuária, as bactérias provenientes de animais destinados à alimentação frequentemente possuem resistência a uma gama de agentes antimicrobianos comumente utilizados em seres humanos e é possível que organismos resistentes possam ser transferidos para o homem, diretamente através da cadeia alimentar ou indiretamente como resultado da propagação de resíduos animais nos campos (GHOSH; LAPARA, 2007;HAMMERUM; HEUER, 2009).

Tal constatação foi observada por Piddock (2002) que detectou em carne de frango, cepas de *Salmonella* resistente a fluoroquinolonas, por Oliveira et al. (2005), que encontrou cepas de *Salmonella* Enteritidis resistentes a sulfonamidas e nitrofurantoína em diferentes amostras de alimentos de origem animal. Peterson et al. (2006) também

relataram a presença de *E.coli* resistente à fluoroquinolonas em frango de corte e Gundogan et al. (2005) encontraram cepas de *S.aureus* resistentes à meticilina, bacitracina, penicilina G e eritromicina em amostras de carnes bovina e de frango.

De acordo com Mantilla et al. (2007) a ingestão de alimentos contendo resíduos de fármacos antimicrobianos pode ocasionar resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados rotineiramente na terapêutica humana, o que também acaba dificultando o tratamento de enfermidades infecciosas humanas. Portanto, o desenvolvimento de resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas, a exemplo da *Salmonella* spp. e *E.coli*, constitui um risco para a saúde pública, pois podem afetar a eficácia do tratamento em seres humanos (AARESTRUP, 1999).

Embora o setor farmacêutico venha desenvolvendo novas drogas antimicrobianas tornam-se necessárias pesquisas de novos antimicrobianos naturais, em especial de origem vegetal, com objetivo de obter um melhor conhecimento das propriedades das plantas, mesmo das que já tiveram seu potencial antimicrobiano comprovado, devido ao aumento de casos de resistência bacteriana (SCHELZ; HOHMANN, 2006; OSTROSKY, 2008).

A interação sinérgica entre a associação de antibióticos com extratos de plantas com comprovado poder antimicrobiano principalmente frente a microrganismos resistentes, pode ser uma nova estratégia de tratamento de infecções, possibilitando o uso de drogas antimicrobianas quando esta isoladamente não se apresenta de forma eficaz sobre determinadas linhagens bacterianas (SILVA, 2010).

Muitas plantas têm sido utilizadas em razão de suas características antimicrobianas, principalmente devido aos compostos bioativos sintetizados no seu metabolismo secundário, como por exemplo, os compostos fenólicos encontrados em seu óleo essencial.

Os óleos essenciais são responsáveis por conferir aroma e sabor característico às plantas e estão relacionados à atração de polinizadores, proteção contra insetos e de diversas funções necessárias à sobrevivência da planta (LIMA et al., 2003; SANTOS et al., 2004). Eles apresentam composição complexa, sendo os terpenos considerados a classe de substâncias mais encontrada (SANTOS et al., 2004).

O alecrim, *Rosmarinus officinalis*, é uma planta da família Lamiaceae utilizado mundialmente como condimento para inúmeros alimentos e possui várias indicações farmacêuticas (CARVALHO JÚNIOR, 2004). Seu óleo essencial é constituído por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona e acetato de isobornila, dentre outros compostos (ALONSO, 1998). A sua composição química pode apresentar variação devido a fatores ambientais e de manejo da planta, bem como da forma de extração e armazenamento, podendo interferir em sua atividade antimicrobiana (NASCIMENTO et al., 2007).

Moreno et al. (2006) relataram que o alecrim é rico em compostos fenólicos com alta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivos e negativas.

Tendo em vista o emprego de óleos essenciais de especiarias na culinária, visando realçar o sabor e aroma de diversos alimentos e o seu reconhecido potencial antimicrobiano, é salutar avaliar o potencial do óleo essencial de alecrim frente a microrganismos comumente associados a infecções alimentares, diante da crescente resistência bacteriana.

Estudos sobre a combinação de produtos naturais de plantas e drogas sintéticas são limitados, porém os resultados apresentados são muitas vezes positivos (SILVA, 2010). Logo, a utilização de agentes antimicrobianos naturais como óleos essenciais de plantas, vem a ser uma alternativa eficaz no controle de bactérias resistentes a antibióticos, seja na inibição do microrganismo, seja na interação sinérgica com os antibióticos. Diante deste cenário a presente pesquisa teve por objetivo analisar quimicamente o óleo essencial das folhas frescas de *Rosmarinus officinalis* L., avaliar sua atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de alimentos e o seu efeito sinérgico em associação com os antibióticos, frente às cepas que apresentaram resistência.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal e extração do óleo essencial de alecrim

Aproximadamente 936 gramas de folhas frescas de *Rosmarinus officinalis* Linn foram coletadas na região de Coração de Maria (SE) no período de julho de 2010, sendo encaminhadas para o Herbário Alexandre Leal Costa do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia onde foram identificadas botanicamente e catalogadas com o número de exsicata 96109.

O óleo essencial de alecrim (OEA) foi extraído segundo metodologia clássica de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado, a temperatura de ebulição por três horas (FARMACOPÉIA, 2000). Em seguida, cerca de 950 mg do óleo essencial foi recolhido e armazenado em recipiente estéril protegido da presença de luz e a temperatura de -10 °C até o momento de uso.

2.2 Análise química do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

A análise qualitativa do óleo essencial foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso Shimadzu QP5050 equipado com coluna capilar de sílica fundida OV-5 (30 m; 0,25 mm; 0,25 µm) acoplado a espectrômetro de massa. O espectro de massa foi operado com a voltagem de ionização de 70 eV e temperatura da fonte 250 °C. A rampa de aquecimento foi programada a uma taxa de 40 até 180 °C a 4 °C/min e de 180-280 °C a 20 °C/min e mantido um isoterma por 7min. O gás de arraste utilizado foi o hélio com um fluxo de 1,0 mL/min.

A identificação dos compostos foi feita pela comparação de seus espectros de massa com o banco de dados (Wiley – 229) do CG-EM. Os dados quantitativos foram obtidos das percentagens das áreas do cromatograma através de normalização (ADAMS, 1989).

A análise foi conduzida no Laboratório de Cromatografia Gasosa e Espectro de Massa do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica – DQOI, da Universidade Federal do Ceará.

2.3 Avaliação *in vitro* do óleo essencial de alecrim

2.3.1 Cepas teste

Foram utilizadas um total de sete cepas bacterianas isoladas de diferentes fontes alimentícias, conforme Quadro 1.

As cepas foram cultivadas por 24 horas em meio Trypticase Soy Agar (TSA) a 37°C, em seguida foram feitas suspensões bacterianas em solução salina (NaCl a 0,85% p/v), a qual foi padronizada de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland correspondendo à concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (técnica adaptada de BAUER et al. 1966).

Quadro 1 - Procedência das cepas utilizadas.

| Bactérias testadas | | Fonte |
|--------------------|---|--------------------------------|
| <i>E. coli</i> | MOA 46 | Frango assado |
| | MOA 51 | Frango <i>in natura</i> |
| | EC 16 | Queijo coalho <i>in natura</i> |
| <i>Salmonella</i> | MOA 25 (Enteritidis) | Bolo caseiro |
| | MOA 23 (Infantis) | Salame |
| | SAL.16 (Oranienburg) | Queijo coalho assado |
| <i>S. aureus</i> | SA.06 (<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva) | Queijo coalho <i>in natura</i> |

2.3.2 Triagem - avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim

A avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim foi realizada através da técnica de difusão em ágar utilizando discos de papel filtro estéril (BAUER et al., 1966). Os discos de 6 mm de diâmetro foram embebidos com 15µL do óleo essencial de alecrim e dispostos sobre placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton inoculado com as cepas em suspensão na concentração de 10^8 UFC/mL, conforme descrito no item 2.3.1. As placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, para posterior leitura, em milímetros, do halo de inibição. Foi considerado como atividade antimicrobiana positiva quando observado a inibição do crescimento bacteriano com diâmetro de halo igual ou superior a 10 mm (SOUZA et al., 2005). O procedimento foi realizado em duplicata. Em paralelo foi realizado o mesmo ensaio com a cepa teste frente ao dimetilsulfóxido P.A. (DMSO), solvente utilizado na diluição do óleo essencial de alecrim, para determinação de sua concentração mínima inibitória.

2.3.3 Determinação da concentração inibitória mínima – CIM

Para determinação da CIM, utilizou-se a técnica de difusão em poços adaptada de Bauer et al. (1966).

Tubos tipo Falcon contendo 20 mL de ágar Mueller Hinton, previamente fundido a temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi inoculado com 2 mL de cada cepa teste em suspensão, que apresentaram resultados positivos na triagem, na concentração de 10^8 UFC/mL, sendo em seguida vertido sobre placas de Petri estéreis contendo uma fina camada de ágar bacteriológico a 1%, dispostas com ponteiras estéreis invertidas. Após a solidificação do meio em capela de fluxo laminar, as ponteiras foram retiradas do ágar, formando assim, poços com 6 mm de diâmetro. Dentro dos poços foram depositadas alíquotas de 30 µL do óleo essencial de alecrim diluído em dimetilsulfóxido P.A. (DMSO) nas concentrações de 500, 400, 300, 200 e 100 µL/mL.

Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, para posterior leitura do halo de inibição, sendo considerada como CIM a menor concentração em que foi observada a inibição do crescimento bacteriano com diâmetro de halo igual ou superior a 10 mm (SOUZA et al., 2005). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4 Avaliação da susceptibilidade bacteriana aos fármacos

A avaliação da resistência bacteriana das cepas foi realizada através da técnica de difusão em ágar (BAUER et al., 1966), utilizando discos comerciais de sensibilidade: ampicilina - 10 µg; amoxicilina/clavulanato – 30 µg; cefalotina – 30 µg; ciprofloxacina – 05 µg; cloranfenicol - 30 µg; cefotaxima – 30 µg; gentamicina – 10 µg; norfloxacina – 10 µg; levofloxacina – 05 µg; nitrofurantoína – 300 µg; sulfametoxazol/trimetoprim – 25 µg; tetraciclina – 30 µg. Os discos foram dispostos sobre placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton inoculado com as cepas de *Salmonella* spp., *S.aureus* e *E.coli* na concentração de 10^8 UFC/mL, conforme descrito no item 2.3.1. As placas foram incubadas a 37 °C ± 1 °C por 24 horas, para posterior leitura do halo de inibição. Os resultados foram expressos em sensível, intermediário ou resistente aos fármacos, conforme prescrito pelo fabricante dos discos (D.M.E).

2.5 Avaliação do sinergismo entre o óleo essencial de alecrim e antibióticos

A avaliação do efeito sinérgico, da associação do óleo essencial com as drogas antimicrobianas, frente às cepas que apresentaram resistência a ação isolada dos antibióticos, foi realizada através da técnica de difusão em ágar utilizando discos de papel de filtro estéreis (Adaptado de BAUER et al., 1966). Os discos contendo antibióticos nas suas respectivas concentrações foram embebidos com 15 µL da CIM do óleo essencial, sendo em seguida colocados em placas de Petri estéreis contendo ágar Muller-Hinton inoculado com as suspensões bacterianas, conforme descrito no item 2.3.1. Após incubação das placas a 37 °C ± 1 °C por 24 horas, os halos de inibição formados foram mensurados e os resultados analisados estatisticamente, comparando-os com o antibiograma controle (item 2.4) – ação isolada dos antibióticos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6 Análise estatística

Para a análise dos resultados da concentração inibitória mínima do óleo essencial de alecrim, nas concentrações estudadas e suas interações, foi utilizado o teste de Tukey e para análise dos resultados de sinergismo - interação entre os fármacos e o óleo essencial, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, sendo os resultados considerados significativos quando $p \leq 0,05$ (Software estatístico GraphPad InStat versão 3.10, 2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise química do óleo essencial de alecrim

O rendimento do óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas frescas de *Rosmarinus officinalis* Linn. foi de aproximadamente 1,0 % em relação ao peso do material fresco. Através de análise em CG-EM, dos 25 picos encontrados, foi possível identificar 23 componentes presentes no óleo essencial de alecrim analisado (Tabela 1). Os constituintes majoritários foram o α -pineno (19,8 %), β -mirceno (24,2 %), 1,8 cineol (22,2%) e verbenona (9,3 %), correspondendo a 75,5 % do total do óleo (Figura 1).

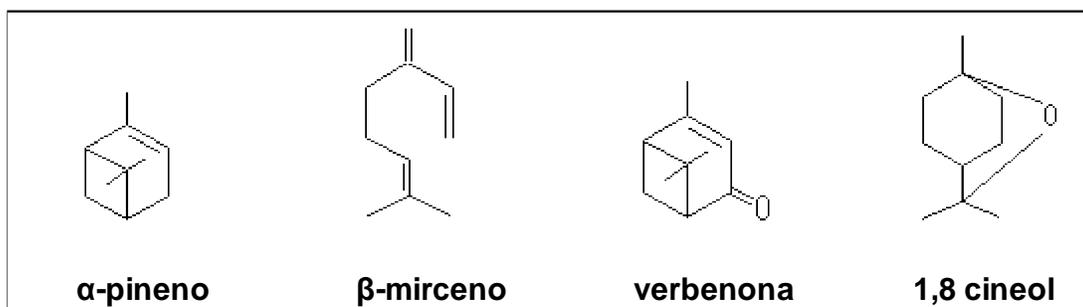


Figura 1: Estrutura química dos constituintes majoritários do óleo essencial de alecrim.

A maior parte dos constituintes identificados no óleo analisado foram monoterpenos oxigenados (28%), seguido dos monoterpenos (24%), com destaque para o α -pineno e β -mirceno e 1,8 cineol e verbenona, compostos em maior proporção no óleo. Estes resultados corroboram com os estudos de Wang et al. (2008), que caracterizaram o óleo essencial de alecrim proveniente da China, Hussain et al. (2010) do Paquistão e de Okoh et al. (2010) da África do Sul, que também identificaram os monoterpenos oxigenados em maior proporção - 48,74%, 67,0% e 26,98%, respectivamente. Os achados demonstram que independente da origem da planta, os monoterpenos oxigenados estão presentes no óleo essencial de alecrim em maior proporção, podendo variar quantitativa e/ou qualitativamente devido às particularidades da região de cultivo da planta.

Tabela 1: Composição química do óleo essencial extraído das folhas de *Rosmarinus officinalis* Linn.

| Pico | TR | Compostos | % |
|--------------------------------|--------------|-----------------------------------|-------------|
| 1 | 8.41 | α-pineno | 19,8 |
| 2 | 8.75 | canfeno | 2,8 |
| 3 | 8.85 | n.i. | 0,4 |
| 4 | 9.59 | β -pineno | 1,1 |
| 5 | 9.87 | 5-metil 3-heptanona | 1,7 |
| 6 | 10.51 | β-mirceno | 24,2 |
| 7 | 10.73 | 3-octanol | 1,3 |
| 8 | 11.84 | 1,8 cineol | 22,2 |
| 9 | 12.61 | γ terpineno | 0,4 |
| 10 | 13.66 | α -terpinoleno | 0,4 |
| 11 | 14.89 | eucarvone | 0,5 |
| 12 | 15.75 | cânfora | 3,8 |
| 13 | 16.74 | 2,3,3-trimetil-1,4-pentadieno | 2,0 |
| 14 | 17.00 | terpineno-4-ol | 1,1 |
| 15 | 17.89 | α -terpineol | 2,5 |
| 16 | 18.41 | verbenona | 9,3 |
| 17 | 20.86 | Acetato de bornila | 0,9 |
| 18 | 25.60 | β -cariofileno | 2,3 |
| 19 | 26.63 | α -humuleno | 0,4 |
| 20 | 30.65 | Óxido de cariofileno | 0,1 |
| 21 | 35.82 | Nerolidol | 0,6 |
| 22 | 36.27 | Linalol | 1,5 |
| 23 | 38.32 | β -bisaboleno | 0,1 |
| 24 | 38.52 | Farnesol | 0,2 |
| 25 | 38.78 | n.i. | 0,5 |
| Monoterpenos | | | 24,0 |
| Monoterpenos oxigenados | | | 28,0 |
| Sesquiterpenos | | | 12,0 |
| Sesquiterpenos oxigenados | | | 12,0 |
| Outros | | | 24,0 |

TR: tempo de retenção; n.i.: composto não identificado

Segundo Knobloch et al. (1989), Denyer; Hugo (1991) e Sikkema; DeBont; Poolman (1994), citados por Burt (2004), os compostos monoterpênicos presentes no óleo essencial exercem sua atividade antimicrobiana sobre os microrganismos através do rompimento da integridade da membrana das bactérias. Esta ação é facilitada pela característica hidrofóbica dos óleos essenciais, que permite a penetração de compostos lipídicos nas mitocôndrias e na membrana celular, rompendo a estrutura

das células, tornando-as assim, mais permeáveis, resultando na saída de moléculas críticas de dentro da célula e, conseqüentemente, a morte da bactéria.

Resultado encontrado por Tebaldi (2008) apontam o α -pineno, 1,8 cineol e a cânfora como constituintes majoritários no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* Linn. Boix et al. (2010) encontraram como principais componentes, dos 23 compostos identificados, β -pineno (7,0%), mirceno (9,52%), 1,8 cineol (14,02%), cânfora (33,17%) e verbenona (8,6%). Trabalho realizado por Prins et al. (2006) traz a cânfora, 1,8 cineol, α -pineno e β -mirceno, nessa ordem, como compostos em maior proporção no óleo, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho.

Atti-Santos (2005) encontrou como principais componentes do óleo essencial de alecrim, α -pineno (40,55% a 45,10%) 1,8 cineol (17,40% a 19,35%), canfeno (4,73 a 6,06%), verbenona (2,32% a 3,86%) e borneol (2,24% a 3,10%), resultado semelhante ao encontrado por Svoboda e Deans (1992) e por Santoyo et al. (2005), onde 80% do óleo de alecrim avaliado continha α -pineno, 1,8 cineol, cânfora, verbenona e borneol. Estes últimos autores atribuíram a propriedade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim a estes compostos, sendo o borneol o mais efetivo. Este composto não foi encontrado no óleo essencial analisado, no entanto, os outros compostos representaram mais de 75% da composição. Isso sugere que a atividade antimicrobiana do óleo essencial estudado está ligada ao sinergismo entre estes constituintes. Gachkar et al. (2007) também não encontraram o borneol na composição do óleo estudado, identificaram α -pineno (14,9%), 1,8 cineol (7,43%) e linalol (14,9%) como compostos majoritários e associaram a ação antimicrobiana a esses.

Segundo Dellacassa et al. (1999) e Carvalho Jr (2004), variações significantes na composição química do óleo essencial de alecrim, dependem da região de cultivo, do método de extração utilizado, do método de análise, da parte da planta utilizada (folha ou planta inteira) e do preparo da matéria prima (*in natura* ou seca) para obtenção de seus extratos. O que explica os diferentes teores dos constituintes e a variação da composição, relatados em diversos estudos. Logo, é fundamental que a composição do óleo essencial seja precisamente conhecida, pois, sua composição pode variar de acordo com diversos fatores que podem alterar o teor do princípio ativo presente nele (NASCIMENTO et al., 2007).

3.2 Triagem - Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim

As cepas teste de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus coagulase* positiva foram susceptíveis a ação do óleo essencial de alecrim, conforme resultados apresentados na Tabela 2. Não foi evidenciada atividade antimicrobiana do DMSO sobre a cepa avaliada, caracterizando a viabilidade do mesmo como solvente do OEA para determinação da sua concentração inibitória mínima.

3.3 Determinação da concentração inibitória mínima – CIM

Os valores da concentração inibitória mínima do óleo essencial das folhas frescas de *Rosmarinus officinalis* L. capazes de inibir o desenvolvimento das cepas de *Escherichia coli* - EC16, MOA46 e MOA51, de *Salmonella* spp. – MOA25 e SAL.16 de *Staphylococcus coagulase* positiva – SA06 foi de 200 µL/mL (20% v/v) e para cepa de *Salmonella* – MOA23 foi de 400 µL/mL (40% v/v) (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração inibitória mínima do OEA sobre as cepas teste determinada por difusão em ágar

| Bactérias | OEA bruto | Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.(µL/mL) | | | | | |
|-------------------------|-----------|---|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|----------------|
| | | 500 | 400 | 300 | 200 | 100 | |
| <i>Escherichia coli</i> | MOA 46 | 18 | 16 ^a | 15 ^b | 13 ^c | 11^d | 9 ^e |
| | MOA 51 | 15 | 15 ^a | 13 ^b | 13 ^b | 12^b | 7 ^c |
| | EC 16 | 21 | 15 ^a | 12 ^b | 12 ^b | 11^b | 9 ^c |
| <i>Salmonella</i> | MOA 25 | 16 | 13 ^a | 12 ^b | 10 ^c | 10^c | 8 ^d |
| | MOA 23 | 15 | 14 ^a | 12^b | 9 ^c | 7 ^d | 7 ^d |
| | SAL.16 | 16 | 16 ^a | 14 ^b | 13 ^c | 11^d | 9 ^e |
| <i>S. aureus</i> | SA.06 | 18 | 13 ^a | 14 ^a | 12 ^b | 10^c | 8 ^d |

Valores mensurados em milímetros. CIM – valores em negrito. Para uma mesma linha, valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatística entre si ($p \leq 0,05$).

Segundo Porte e Godoy (2001) supõem-se que a baixa atividade antimicrobiana apresentada pelo óleo essencial de alecrim pode ser justificada pela presença majoritária de α -pineno e β -mirceno que são hidrocarbonetos monoterpênicos sem núcleos aromáticos e grupos funcionais polares, aos quais é atribuído a atividade antimicrobiana.

Diversas pesquisas têm demonstrado a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. frente a diferentes microrganismos (SANTOYO et al., 2005; BOZIN et al., 2007; GACHKAR et al., 2007; LUQMAN et al., 2007; ZAGO et al., 2009), todavia, de acordo com Angioni et al. (2004), Lopez et al. (2005) e Hentz e Santin (2007) seu poder de inibição mostrou-se fraco ou ausente contra bactérias Gram negativas, quando comparado à ação contra as Gram positivas e com a atividade de outros óleos. Segundo Smith-Palmer, Stewart; Fyfe (1998), Lambert (2002), Bezic et al. (2003) e Harris (2003), a estrutura da parede celular das bactérias Gram negativas é constituída essencialmente de um lipopolissacarídeo que bloqueia a penetração de óleo hidrófobo e evita o acúmulo de óleos essenciais na membrana de células alvo, conferindo uma maior resistência a essas bactérias, por outro lado, os ácidos lipoteicóicos e a extremidade lipofílica da membrana celular da bactéria Gram positivas podem facilitar a penetração de compostos hidrofóbicos (ULTEE; KETS; SMID, 1999; COX et al., 2000).

De acordo com Hammer, Larson, Riley (1999), Dellacassa et al. (1999), Burt (2004), Carvalho Jr (2004), Duarte et al. (2005), Rios e Recio (2005), Bertini et al. (2005), Nascimento et al. (2007), Celiktas et al. (2007), a ação antimicrobiana, e conseqüentemente a concentração inibitória mínima de óleos essenciais pode sofrer interferências, devido a: região/período de cultivo da planta, método de extração utilizado, método de análise, parte da planta utilizada (folha ou planta inteira), preparo da matéria-prima (*in natura* ou seca), tipo e condições de cultivo do microrganismo, (tempo de incubação, temperatura, taxa de oxigênio), meio de cultura, concentração da substância testada, agentes diluentes do óleo, dentre outros fatores.

3.4 Avaliação da susceptibilidade bacteriana aos fármacos

Os resultados referentes à susceptibilidade das cepas bacterianas frente à ação de antibióticos são mostrados na Tabela 3. Observa-se que a cepa de *Staphylococcus* coagulase positiva – SA06 foi suscetível a ação de todas as drogas testadas e que das seis cepas Gram negativas, quatro (duas de *Salmonella* e duas de *E.coli*) foram resistentes a ação de um ou mais fármacos, com destaque para a cepa MOA51, isolada de frango *in natura*, que se mostrou multirresistente, pois, dos doze fármacos testados, somente dois tiveram ação inibitória satisfatória.

Tabela 3: Susceptibilidade das cepas bacterianas frente à ação de diferentes antibióticos.

| Bactérias | ANTIBIÓTICOS | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| | AMP | CFL | CTX | GEN | TET | CLO | SUT | CIP | AMC | NIT | LVX | NOR | |
| <i>E.coli</i> | MOA 51 | R | R | I | R | R | I | R | R | S | S | I | R |
| | MOA 46 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | EC 16 | R | R | S | R | S | R | S | S | S | S | S | S |
| <i>Salmonella</i> | MOA 25 (Enteritidis) | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S |
| | MOA 23 (Infantis) | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | SAL.16 (Oranienburg) | R | R | S | S | S | S | S | S | R | R | S | S |
| <i>S. aureus</i> | S.A.06 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |

S: Sensível, I: Intermediário; R: Resistente. AMP: ampicilina-10µg; AMC: amoxicilina/clavulanato-30µg; CFL: cefalotina-30µg; CIP: ciprofloxacina-05µg; CLO: cloranfenicol-30µg; CTX: Cefotaxima-30µg; GEN: gentamicina-10µg; NOR: norfloxacina-10µg; LVX: levofloxacina-05µg; NIT: nitrofurantoína-300µg; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim-25µg; TET: tetraciclina-30µg.

A cepa de *Salmonella* Enteritidis, principal sorotipo associado à salmonelose (SILVA; DUARTE, 2002, SURESH; HATHA; SCREENIVASA, 2006, DUNKLEY et al., 2009), apresentou resistência somente a nitrofurantoína. Resultado também apresentado por Oliveira et al. (2005) que evidenciou resistência à nitrofurantoína em 52,8% das 91 cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de alimentos, aves e humanos. Já a cepa de *Salmonella* Oranienburg, isolada de queijo de coalho assado, foi resistente aos β-lactâmicos, ampicilina, amoxilina e cloranfenicol, além da nitrofurantoína. Segundo

Nero et al. (2007), os antibióticos do grupo dos β -lactâmicos são comumente utilizados para tratamento de doenças infecciosas em rebanhos leiteiros, sendo assim os mais freqüentemente detectados em leite e derivados.

As cepas de *E.coli* EC16 e MOA51, isoladas de queijo de coalho e frango *in natura*, respectivamente, foram as que mais apresentaram resistência frente aos antibióticos testados. Destas, a cepa isolada de frango (MOA 51) foi a que apresentou resistência (AMP, CFL, GEN, TET, SUT, CIP, NOR) ou sensibilidade intermediária (CTX, CLO, LVX) a maioria dos fármacos. Tal resultado condiz com os estudos de Barton (2000), White et al. (2002), Sengelov et al. (2003) que relatam que o uso indiscriminado de antibióticos no tratamento de doenças infecciosas e como promotores do crescimento em animais, tem propiciado o aumento da resistência das bactérias isoladas destes animais.

Em trabalho realizado por Gousia et al. (2011) que avaliaram a resistência bacteriana de cepas de *Escherichia coli* (157), *Yersinia enterocolitica* (25), *Staphylococcus aureus* (57), *Enterococcus* spp. (57), *Salmonella* spp. (4) isoladas de carnes cruas e processadas de frango, suína, bovina e ovina, frente a 19 fármacos utilizados na terapia humana, a grande maioria das cepas mostraram resistência a um ou mais antibióticos (*E.coli* - 85,4%, *S.aureus* - 90,5%, *Y. enterocolitica* - 96,0%, *Salmonella* spp. - 75,0%). Segundo os autores, tais resultados indicam que a carne pode ser uma fonte de bactérias resistentes, podendo ser transmitidas para o homem através da cadeia alimentar. Já Mayrhofer et al. (2004), constataram em trabalho similar, que a resistência a antibióticos em bactérias entéricas parece ser superior a de patógenos encontrados em uma variedade de ambientes.

Sendo as bactérias avaliadas comumente associadas à DVA e os fármacos testados comumente utilizados no tratamento de toxinfecções alimentares, os resultados de resistência encontrados neste estudo e nos relatados tornam-se preocupantes.

3.5 Avaliação do sinergismo entre o óleo essencial de alecrim e antibióticos

As cepas de *Salmonella* spp. e *E.coli* que apresentaram resistência ou sensibilidade intermediária aos fármacos no item 3.4 foram submetidas a avaliação da atividade sinérgica - ação combinada dos antibióticos com o óleo essencial de alecrim. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Analisando os dados, observou-se que do total de 19 ensaios realizados, onze (58 %) apresentaram susceptibilidade ao efeito sinérgico entre a associação do OEA com o antibiótico, cinco (26 %) mostraram-se indiferente e três (16 %) apresentaram antagonismo (Figura 2).

Tabela 4: Susceptibilidade das cepas bacterianas de *E.coli* e *Salmonella* spp frente à ação combinada do OEA a 20% com antibióticos (resultados expressos em milímetros do halo de inibição do crescimento microbiano).

| Classe dos antibióticos | Antibióticos testados | <i>E.coli</i> | | | | <i>Salmonella</i> spp. | | | |
|-------------------------|-----------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | MOA 51 | | EC 16 | | MOA 25 | | SAL.16 | |
| | | C | T | C | T | C | T | C | T |
| β-Lactâmicos | AMP | 0 | 9 | 0 | 10 | * | * | 0 | 9 |
| | AMC | * | * | * | * | * | * | 8 | 9 |
| | CFL | <u>11</u> | <u>9</u> | <u>14</u> | <u>10</u> | * | * | 0 | 9 |
| | CTX | 21 | 21 | * | * | * | * | * | * |
| Quinolonas | CIP | 12 | 11 | * | * | * | * | * | * |
| | LVX | 14 | 13 | * | * | * | * | * | * |
| | NOR | 8 | 7 | * | * | * | * | * | * |
| Anfenicóis | CLO | <u>16</u> | <u>12</u> | 0 | 27 | * | * | * | * |
| Aminoglicosídeos | GEN | 0 | 9 | 8 | 23 | * | * | * | * |
| Nitroimidazólicos | NIT | * | * | * | * | 10 | 22 | 14 | 21 |
| Sulfonamidas | SUT | 0 | 8 | * | * | * | * | * | * |
| Tetraciclinas | TET | 0 | 9 | * | * | * | * | * | * |

*Cepa sensível ao antibiótico; C: controle – ação isolada do antibiótico; T: tratamento combinado (OEA+AB). Antagonismo (valores sublinhado) ou Sinergismo (valores em negrito) foi considerado quando $p \leq 0,05$. AMP:ampicilina-10µg; AMC:amoxicilina/clavulanato-30µg; CFL:cefalotina-30µg; CTX:cefotaxima-30µg; CIP:ciprofloxacina-05µg; LVX:Levofloxacina-05µg; NOR:norfloxacina-10µg; CLO:cloranfenicol-30µg; GEN:gentamicina-10µg; NIT:nitrofurantoína-300µg; TET: tetraciclina-30µ; SUT:sulfametoxazol/trimetoprim-25µg.

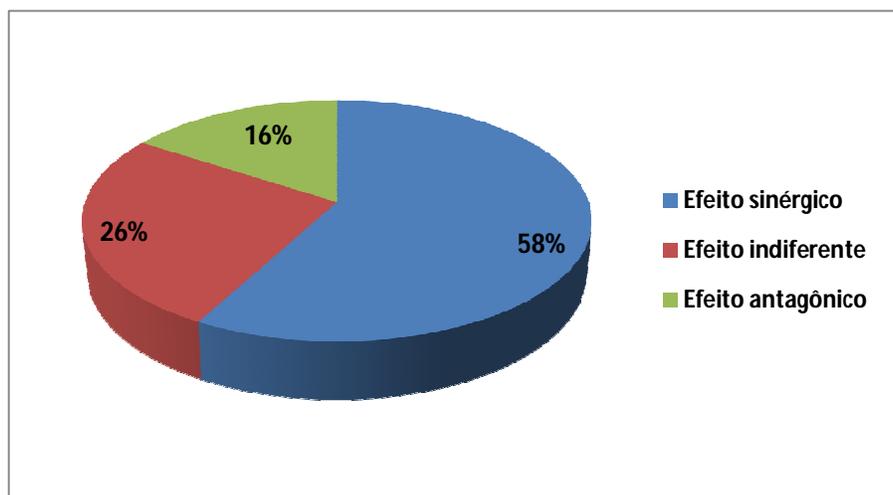


Figura 2: Pocentagem do efeito da associação do OEA com os fármacos.

De acordo com dados apresentados na Tabela 4, a ação combinada do OEA com os antibióticos β -lactâmicos teve efeito sinérgico quando combinado com ampicilina (MOA51, EC16 e SAL.16) e com cefalotina (SAL.16). A interação com amoxicilina/clavulanato, cefotaxima e cefalotina, para MOA51 e EC16, mostrou-se indiferente ou antagônica, expressando halos de inibição igual ou menor que o controle – ação isolada do antibiótico (Figura 3C, 3D). O mecanismo de ação deste grupo se dá através da inibição da síntese da parede celular, em que o antibiótico irá interferir na síntese do peptidoglicano, responsável pela integridade da parede bacteriana. No entanto, para que esta ação ocorra, o antibiótico deve: penetrar na bactéria através das purinas presentes na membrana externa da parede celular bacteriana; não deve ser destruído pelas β -lactamases produzidas pelas bactérias; deve ligar-se e inibir as proteínas ligadoras de penicilina (PLP) responsáveis pelo passo final da síntese da parede bacteriana (ANVISA, 2007).

No entanto, as bactérias resistentes aos β -lactâmicos podem inibir a atuação destes antibióticos no seu interior, modificando a estrutura das PLP, produzindo β -lactamases ou através de mutações e modificações nas purinas, proteínas que permitem a entrada de nutrientes e outros elementos para o interior da célula, diminuindo a permeabilidade celular. Estes mecanismos podem ocorrer de forma independente ou sinergicamente (DAZA, 1998; SILVEIRA et al., 2006). Possivelmente, uma destas barreiras foi vencida pelos antibióticos quando associados com o OEA, tornando as cepas susceptíveis.

A cepa de *Escherichia coli* - MOA51, única resistente as quinolonas – inibidores da DNA-girase bacteriana, manteve-se, praticamente, indiferente a ação combinada dos antibióticos com o OEA. Possivelmente, a quantidade de OEA utilizada, não foi suficiente para vencer a resistência da bactéria que, segundo Daza (1998), Silveira et al. (2006) e Souza, Magnani e Oliveira (2010) está associada a alteração da permeabilidade à droga pela membrana celular bacteriana, mutação cromossômica nos genes que são responsáveis pelas enzimas alvo ou através de mecanismos de expulsão que impede o antibiótico de alcançar concentrações intracelulares suficientes para atuar como bloqueador de funções celulares, devido à hiperexpressão das bombas de efluxo.

A combinação do OEA com os antibióticos inibidores da síntese protéica bacteriana - cloranfenicol, tetraciclina e gentamicina, apresentaram efeito sinérgico contras as cepas de *E.coli*, com exceção da ação verificada com o cloranfenicol contra cepa de *E.coli*- MOA51, que expressou antagonismo, obtendo um halo de inibição com 4mm de diâmetro menor que o obtido da ação isolada do antibiótico (Tabela 4). Este resultado foi semelhante ao encontrado por Silva (2010), em que observaram antagonismo para *E.coli* e a droga cloranfenicol. A nitrofurantoína e o sulfametoxazol/trimetoprim, inibidor da síntese enzimática bacteriana, através da inativação do DNA e inibidor de síntese do ácido tetrahidrofólico, respectivamente, também tiveram efeito potencializado, quando associados ao OEA na concetração de 20 % (v/v).

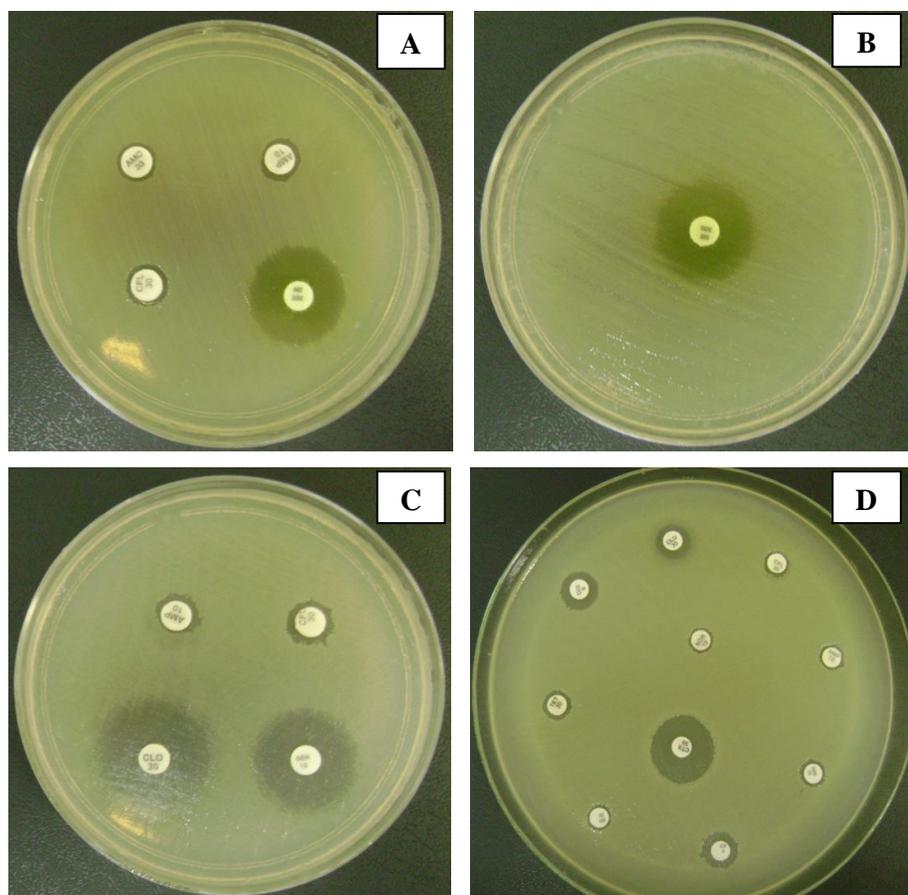


Figura 3: Avaliação do efeito sinérgico da ação combinada do OEA com antibióticos frente às cepas **A** – SAL.16; **B** – MOA25; **C** – EC16; **D** – MOA51 resistentes à drogas, pelo método de difusão em ágar.

De acordo com os resultados apresentados, houve sinergismo na maioria das associações do óleo essencial de alecrim com as drogas testadas (Figura 2). Segundo Harris (2003) e Zhao et al., (2001) devido à natureza lipídica dos compostos terpênicos presente no óleo, há um melhor transporte do antibiótico para dentro da célula bacteriana, alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática.

Trabalho realizado por Zago et al. (2009) onde foi avaliado o efeito sinérgico entre o óleo essencial da *Rosmarinus officinalis* Linn. e cepas de *S.aureus* e *E.coli* isoladas de humanos, sensíveis aos antibióticos testados, foi verificado sinergismo entre o óleo e três drogas frente as cepas de *S. aureus* (gentamicina, tetraciclina e sulfazotrim) e contra as cepas de *E.coli* (cloranfenicol, cefepime e tetraciclina). Luqman et al. (2007) avaliaram o potencial antimicrobiano do óleo com cepas clínicas Gram positivas e Gram negativas resistentes a drogas, obtendo uma maior atividade contra as bactérias

Gram positivas, resultado este também obtido por Zago et al. (2009). Nascimento et al. (2000), utilizaram o extrato etanólico da planta, onde não foi verificado efeito sinérgico com os antibióticos frente as cepas estudadas.

Jarrar et al. (2010) avaliaram o uso de extrato etanólico de alecrim em combinação com cefuroxima frente a cepas de *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA), indicando sinergismo contra todas as cepas MRSA avaliadas. De acordo com estes autores, o mecanismo que rege a ação conjunta de extrato de alecrim e componentes antibióticos é ainda desconhecido, mas, que pode estar ligado ao grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos extratos de alecrim. Em outro estudo, realizado por Van Vuuren et al. (2009) foram observados perfis antagônicos do óleo essencial comercial de alecrim em combinação com ciprofloxacina ou anfotericina B contra cepas padrão de *S. aureus* e *Candida albicans*.

Em trabalho realizado por Oluwatuyi et al.(2004) onde foram utilizados compostos presentes no extrato clorofórmico das folhas de *Rosmarinus officinalis* L. (ácido carnósico e carnosol) para modular a resistência de cepas de *S.aureus* multiressistentes, foi observado que esses compostos potencializaram a atividade do antibiótico eritromicina em 32 e 16 vezes, respectivamente, contra uma cepa de *S.aureus* portadora do mecanismo efluxo resistente a eritromicina. Demonstrando assim, o potencial antimicrobiano e modulador presente também no extrato das folhas do alecrim. Todavia, vale ressaltar que a técnica empregada na extração, dentre outros fatores, influencia diretamente na ação antimicrobiana (NASCIMENTO et al., 2007).

Trabalhos em que foram utilizados outros óleos essenciais e seus compostos isolados, como eugenol, timol, cavacrol entre outros (GALLUCCI ET AL., 2006; OLIVEIRA et al. 2006; HEMAISWARYA; DOBLE, 2009; PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010) em combinação com drogas contra bactérias Gram positivas e Gram negativas sensíveis e resistentes a antibióticos, mostraram resultados promissores, demonstrando que em uma época onde é crescente a resistência microbiana aos antibióticos sintéticos, há uma tendência para se procurar maneiras de minimizar o desenvolvimento de resistência aos medicamentos existentes, ao invés de se buscar novas drogas mais potentes (Harris, 2003).

Embora diversos estudos relatem a atividade antimicrobiana da *Rosmarinus officinalis* L. (ANGIONI et al. 2004; OLUWATUYI et al., 2004; BOZIN et al., 2007; LUQMAN et al., 2007; Van VUUREN et al., 2009; ZAGO et al., 2009; JARRAR et al., 2010) nenhum trabalho foi encontrado durante a pesquisa utilizando o óleo essencial da planta associado a antibióticos convencionais, visando reverter a resistência de bactérias isoladas de alimentos.

Tendo em vista que as cepas testadas são possíveis causadores de doenças infecciosas, sendo uma delas (*Salmonella* spp.) a principal causadora de Doenças Veiculadas por Alimentos em todo o mundo (LOURENÇO, et al., 2004), o resultado encontrado foi muito relevante para a pesquisa, pois, o OEA associando à algumas drogas, mostrou possuir potencial bioativo frente às cepas resistentes de *Salmonella* spp. e *E.coli* estudadas.

4 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais do presente estudo, os resultados demonstraram que o óleo essencial das folhas frescas de *Rosmarinus officinalis* L., possui como constituintes majoritários o α -pineno (19,8 %), β -mirceno (24,2 %), 1,8 cineol (22,2 %) e verbenona (9,3 %). E que o mesmo apresentou ação antimicrobiana frente às cepas de *Salmonella*, *E.coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva avaliadas, obtendo uma concentração inibitória mínima variando de 20% (v/v) a 40% (v/v). Observou-se também, que o óleo essencial avaliado, associado aos fármacos, foi eficaz frente às cepas de *E.coli* e *Salmonella* spp. resistentes, em 58% dos ensaios. Os resultados obtidos indicam ser promissora a utilização de óleo essencial de alecrim em associação com antibióticos convencionais no tratamento de doenças infecciosas de origem alimentar. Todavia, vale ressaltar que os estudos foram realizados *in vitro*, possibilitando pesquisas futuras para avaliar o potencial bioativo do óleo essencial de alecrim em combinação com antibióticos utilizando modelos *in vivo*.

5 REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 12, p.279-285, 1999.
- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, **Academic Press, INC.**, San Diego, California, 302p, 1989.
- ALONSO JR. **Tratado de fitomedicina: Bases clínicas y farmacológicas**. Isis: Ediciones. SRL. Buenos Aires. 1998. 1039p.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COISSON, J.D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **J Agr Food Chem** . v.52, p.3530- 3535, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Antimicrobianos – Bases Teóricas e Uso Clínico. 2007**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm> Acesso em: 06 mar.2011.
- ATTI-SANTOS, A.C. Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.6, p.1035-1039. 2005.
- BARTON, D.M. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health, **Nutrition Research Reviews**, v.13, p. 279–299. 2000.
- BAUER, A.W.M.M.; KIRBY, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.3, p. 493-496, 1966.
- BERTINI, L. M., PEREIRA, A. F., OLIVEIRA, C. L. L., MENEZES, E. A., MORAIS, S. M., CUNHA, F. A., CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, p.80-83, 2005.
- BEZIC, N., SKOCIBUCIC, M., DUNKIC, V., RADONIC, A. Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. **Phytother. Res.**, v.17, p.1037-1040, 2003.
- BOIX, Y. F.; VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S.; KUSTER, R. M. Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 2, 2010.
- BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; JOVIN, E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. **J. Agric. Food Chem.** v.55:p.7879–7885, 2007.
- 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.

CARVALHO Jr, R.N. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo.** Campinas, 2004. 151p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

CELIK TAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chem.** v.100, p.553-559, 2007.

COX, S.D., MANN, C.M., MARKHAM, J.L., BELL, H.C., GUSTAFSON, J.E., WARMINGTON, J.R., WYLLIE, S.G. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.170–175, 2000.

DAZA, R.M. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. **Inf. Ter. Sist. Nac. Salud.** v.22, p.57-67, 1998.

DELLACASSA, E.; LORENZO, D.; MOYNA, P.; FRIZZO, C.D.; ATTI-SERAFINI, L.; DUGO, P. *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) essential Oils from the South of Brazil and Uruguay. **Journal of Essential Oils Research**, v.11, p.27-30. 1999.

DENYER, S.P., HUGO, W.B. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In: Denyer, S.P., Hugo, W.B. (Eds.), *Mechanisms of Action of Chemical Biocides*. The Society for Applied Bacteriology, Technical Series n. 27, p. 171– 188, 1991.

DUARTE, M.C.T., FIGUEIRA, G.M., SARTORATTO, A., REHDER, V.L.G., DELARME LINA, C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **J Ethnopharmacol.** v.97, p.305-311, 2005.

DUNKLEY, K.D.; KUBENA, L. F.; NISBET, D. J.; RICKE, S. C.; Callaway, T.R., Chalova, V.I., McReynolds, J.L., Hume, M.E., Dunkley, C.S. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe.** v.15, p.26-35, 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed., parte II. São Paulo: Atheneu, 2000.

GACHKAR, L., YADEGARI, D., REZAEI, M.B., TAGHIZADEH, M., ASTANEH, S.A., RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v.102, p.898-904, 2007.

GALLUCCI, N.; CASERO, C.; OLIVA, M.; ZYGADLO, J.; et al. Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. **Mol. Med. Chem.** v.10, p.30–32. 2006.

GHOSH, S.; LaPARA, T.M. The effect of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v.1, p.191–203. 2007.

GOUSIA, P., ECONOMOU, V., SAKKAS, H., LEVEIDIOTOU, S., PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.1, p.27-38, 2011.

GUNDOGAN, N., CITAK, S., YUCEL, N., DEVREN, A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. **Meat Science**. v.69, p.807–810, 2005.

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.

HAMMERUM, A.M.; HEUER, O.E. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. **Clinical Infectious Diseases**, v.48, p.916–921. 2009.

HARRIS, R. Sinergism in the essential oil world. **The International Journal of Aromatherapy**, v.12, p.179-186. 2003.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic Interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria, **Phytomedicine**, v.16, p.997-1005. 2009.

HENTZ, S. M., SANTIN, N.C. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) contra *Salmonella* sp. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 2, p. 93-100, 2007.

HUSSAIN, A. I., ANWAR, F., CHATHA, S. A. S., JABBAR, A., MAHBOOB, S., NIGAM, P. S. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.41, p.1070-1078, 2010.

JARRAR, N.; ABU-HIJLEH, A.; ADWAN, K. Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L., alone and in combination with cefuroxime, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. p.121-123. 2010.

KIM, J., MARSHALL, M.R., WEI, C.-I. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.2839–2845, 1995.

KNOBLOCH, K., PAULI, A., IBERL, B., WEIGAND, H., WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**. v.1, p.119– 128, 1989.

LAMBERT P.A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram positive bacteria and mycobacteria. **J. Appl. Microbiol.**v. 92, Supplement 1, p.46S-54. 2002.

LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L.; SANTOS, B.H.C. Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de plantas medicinais. **Ver. Bras. Cienc. Saúde**, v.7, p.251-258. 2003.

LOURENÇO, M.C.S.; REIS, E.F.M.; VALLS, R. *Salmonella* entérica subsp houtenae sorogrupo O:16 em um paciente HIV positivo: relato de caso. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.46, n.3, p.69-170, 2004.

LOPEZ, P., SANCHEZ, C., BATLE, R., NERIN, C. Solid and vapor phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.7, p.6939–6946, 2005.

- LUQMAN, S.; DWIVEDI, G.R.; DAROKAR, M.P., KALRA, A.; KHANUJA, S.P. Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. **Altern. Ther. Health Med.**, v.13, n.5, p.54-59. 2007.
- MANTILLA, S.P.S., FRANCO, R.M., OLIVEIRA, L.A.T., SANTOS, E.B.; GOUVÊA R. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp isoladas de carne moída bovina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.45, p.116-121, 2008.
- MAYRHOFER, S., PAULSEN, P., SMULDERS, F.J.M., HILBERT, F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. **International Journal of Food Microbiology.** v.97, p.23–29, 2004.
- MORENO, S., SCHEYER, T., ROMANO, C.S., VOJNOV, A.A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v.40, p.223-231, 2006.
- NASCIMENTO P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI A.A.; SANTOS, P.O.; BARBOSA Junior, A.M.; TRINDADE R.C; Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, p.108-113, 2007.
- 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**, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.
- NERO, L. M. MATTOS, M.R., BELOTI, V., BARROS, M.A.F., FRANCO, B.D.G.M. Antimicrobial residues in raw milk from four Brazilian milk-producing regions. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.
- OLIVEIRA, S.F.D., FLORES, F.S., SANTOS, L.R., BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **Int. J. Food Microbiol.**, v.97, p.297–305, 2005.
- OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.16, n.1, p. 82-77. 2006.
- OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**, v.65, p.3249-3254. 2004.
- OKOH, O.O., SADIMENKO, A.P., AFOLAYAN, A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**. v.120, p.308–312, 2010.
- OSTROSKY, E.A., MIZUMOTO, M. K., LIMA, M. E. L., KANEKO, T. M., NISHIKAWA, S. O., FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.301-307, 2008.
- PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v.140, p.164–168, 2010.

PETERSEN, A, CHRISTENSEN, JP, KUHNERT, P, BISGAARD, M AND OLSEN, JE. Vertical transmission of a fluoroquinolone-resistant **Escherichia coli** within an integrated broiler operation. **Veterinary Microbiology**. v.116, p.120–128, 2006.
PIDDOCK, L.J.V.. **FEMS Microbiology Reviews**. v.26, p.3 – 6, 2002.

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**, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

PRINS, C.L.; LEMOS, C.S.L.; FREITAS, S.P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus Officinalis*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.4, p. 92-95, 2006.
Disponível em: <http://www.ibb.unesp.br/servicos/publicacoes/rbpm/pdf_v8_n4_2006/artigo17_v8_n4_p092-095.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2010.

REIS, R.B.; KRUGER, C.S., MACIEL, M.S. Salmonella spp. em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá-MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas. **Ciência e Tecnologia**, v.15, n.1, p.74 78, 1995.

RÍOS, J.L, RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.** v.100, p.80-84, 2005.

SAKAGAMI, Y, KAJAMURA, K. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant *Enterococci*. **J. Hosp. Infect.** v.56, p.140-144, 2006.

SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIREDO, F.J.C.; ROCHA Neto, O.G. Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Comunicado Técnico-Embrapa**, v.99, p.1-6, 2004.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBANEZ, E.; SENORANS, F. J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, v.68, n.4, p.790–795. 2005.

SENGELOV, G.; AGERSO, Y.; HALLING-SORENSEN, B.; BALODA, B.S.; ANDERSEN, J.S.; JENSEN, L.B. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. **Environment International**, v.28, p.587–595. 2003.

SHAN, B.; CAI, Yi-Zhong; BROOKS, J.D.; CORKE, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.112–119. 2007.

SHELZ, Z.M.J., HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Phytotherapy**. v.77, p.279-285, 2006.

SILVA, N. C. C. Estudo **comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. São Paulo.75p.Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, São Paulo - Botucatu, 2010.

- SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M.M.; TERENZI, H.. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Quím. Nova**. v.29, n.4, p. 844-855, 2006.
- SILVA, E.M., DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v.4, n.2, p.85-100, 2002.
- SIKKEMA, J., DE BONT, J.A.M., POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**. v.269, n.11, p.8022–8028, 1994.
- SMITH-PALMER, A., STEWART, J., FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Food Microbiology**. v.26, p.118–122, 1998.
- SOUZA, E.L., LIMA, E.O., FREIRE, K.R.L., SOUSA, C.P. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. **Braz Arch Biol Technol.**, v.48, p.245-250, 2005.
- SOUZA, R.B., MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 413-428, 2010.
- SVOBODA, K.P.; DEANS, S.G. A study of the variability of rosemary and sage and their volatile oils on the British market: their antioxidative properties. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 7, n. 2, p. 81-87, 1992.
- SURESH, T., HATHA, A.A.M., SCREENIVASA, D. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis and other salmonellas in the eggs and eggstoring trays from retails markets of Coimbatore, south India. **Food Microbiology**. v.23, n.3, p.294-299, 2006.
- TEBALDI, V.M.R. **Análise e potencial de uso de óleos essenciais no controle de Pseudomonas sp. e na formação de biofilme por Pseudomonas aeruginosa**. Lavras, 94p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2008.
- ULTEE, A., KETS, E.P.W., SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, n.10, p.4606– 4610, 1999.
- Van VUUREN S.F.; SULIMAN, S.; VILJOEN, A.M. The antimicrobial activity of four commercial essentials oils in combination with conventional antimicrobials. **Lett Appl. Microbiol.** v.48, p.440–446. 2009.
- WANG, W.; WU, N.; ZU, Y.G.; FU, Y.J. Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chem**. v.108, p.1019-1022, 2008.
- WHITE, D.G.; ZHAO, S.; SIMJEE, S, WAGENR, D.D.; McDERMOTT. P.F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infections**, v.4, n.4, p.405-412, 2002.
- ZAGO, J.A.A., USHIMARU, P.I., BARBOSA, L.N., FERNANDES JR, A. Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylooccus*

aureus and *Escherichia coli* strains from human infections. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.19, p.828-33. 2009.

ZHAO W.H.; HU, Z.Q.; OKUBO, S.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and beta-lactams against methicillin-resistant **Staphylococcus aureus**. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.45, p.1737–1742, 2001.

CAPÍTULO 3

Avaliação antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) no controle de *Escherichia coli* multirresistente inoculada em queijo do tipo “coalho”.

RESUMO

Diante da busca por alimentos mais saudáveis e microbiologicamente seguros, o uso de óleos essenciais de plantas de conhecido potencial antimicrobiano, vem a ser uma alternativa promissora como conservador natural, visando impedir a proliferação de microrganismos veiculados por alimentos. A partir deste cenário, objetivou-se avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) no controle de uma cepa de *Escherichia coli* multirresistente inoculada em queijo tipo “coalho”. O óleo essencial de alecrim (OEA) foi obtido através de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por três horas, sua concentração inibitória mínima - CIM frente à cepa teste foi determinada pela técnica de difusão em ágar - perfuração em poços, obtendo uma CIM de 20% (v/v). A cepa de *E.coli* - EC 16 isolada de queijo coalho *in natura* e resistente a ampicilina, cefalotina, gentamicina e cloranfenicol foi inoculada em duas amostras de queijo de coalho comercial, na concentração de 10^5 UFC/mL. Em uma das amostras foi adicionado OEA a 20% (v/v), sendo considerada amostra Teste e a outra, sem adição de OEA, amostra Controle. Ambas foram porcionadas e submetidas à refrigeração, para serem avaliadas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, através da contagem de *E.coli* em meio seletivo cromogênico. Houve uma redução 2,3 ciclos logarítmicos nas primeiras 24 horas, na amostra Teste, a qual manteve este valor no decorrer das 168 horas. Na amostra Controle houve um aumento de 4 ciclos log na população bacteriana, durante 120 horas de armazenamento. Diante dos resultados, encontrados nas condições experimentais utilizadas, o óleo essencial de alecrim demonstrou possuir propriedades inibitórias frente à cepa de *Escherichia coli* – EC16 dentro da matriz alimentícia avaliada. Infere-se que o mesmo pode ser usado no controle de bactérias patogênicas, todavia, a sua utilização como conservante em alimentos deve ser pautada em análises sensoriais.

Palavras-chave: óleo essencial de alecrim, antimicrobiano natural, controle bacteriano, queijo coalho.

ABSTRACT

Before the search for healthier foods and microbiologically safe, use of essential oils from plants of known potential antimicrobial, has to be a promising alternative to conservative natural, to prevent the proliferation of microorganisms carried by food. Aimed to evaluate the potential antimicrobial essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in control of a strain of *Escherichia coli* inoculated in multidrug-resistant coalho cheese. The essential oil of rosemary (EO) was obtained by hydrodistillation in a Clevenger apparatus for three hours, its minimum inhibitory concentration - MIC against strain test was determined by agar diffusion method, obtaining an MIC 20% (v/v). The strain of *E. coli* - EC 16 resistant ampicilina, cephalothin, gentamicin, chloramphenicol, isolated from coalho cheese *in natura*, was inoculated in two samples of commercial cheese, in 10^5 UFC/mL concentration. One sample was inoculated with 20% EO (v/v), said test sample and another without the addition of EO, control sample. Both proportionate and were subjected to refrigeration, to be assessed at 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours, by counting *E. coli* in a selective chromogenic. There was a reduction of 2.3 cycles logarithmic in the first 24 hours, the test sample, which kept this value in the course of 168 hours. In the control sample was a increase of 4 log cycles in bacterial population during 120 hours of storage. The results showed the rosemary essential oil has inhibitory activity against a strain of *Escherichia coli* - EC16, evaluated within the food matrix, this could be used in control of pathogenic bacteria. However, its use as preservative in food should be based on sensory analysis.

Keywords: rosemary essential oil, natural antimicrobial, bacterial control, *coalho* cheese.

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com microrganismos patogênicos e deteriorantes presentes nos alimentos tem crescido devido ao aumento de surtos (RAHMAN; KANG, 2009), causados pela ingestão de alimentos contaminados por agentes infecciosos ou pela toxina por eles produzida (BRASIL, 2001a). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2007) é difícil estimar a incidência global de doenças de origem alimentar, no entanto, só em 2005 foi relatado que 1,8 milhões de pessoas morreram de doenças diarréicas. A grande proporção desses casos pode ser atribuída à contaminação de alimentos e água potável.

Nos países industrializados a porcentagem da população que sofre de enfermidades de origem alimentar é cerca de 30% a cada ano. Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que ocorrem, aproximadamente, 76 milhões de casos de doenças veiculadas por alimentos por ano, resultando em 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes (WHO, 2007).

Apesar das diferentes técnicas empregadas para impedir que microrganismos patogênicos contaminem os alimentos comprometendo sua qualidade e segurança, as doenças veiculadas por alimentos continuam preocupando os agentes de saúde pública (JAY, 2005).

Diversos microrganismos podem ser veiculados por alimentos causando doenças nos seres humanos, a exemplo de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* patogênicas, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella dysenteriae* dentre outros. Em sua maioria, esta veiculação se dá por falta de hábitos higiênicos no preparo, conservação e manipulação dos alimentos.

A conservação dos alimentos tem se tornado cada vez mais complexa, uma vez que os consumidores estão exigindo alimentos mais naturais, com baixos níveis de aditivos químicos, com a conveniência de uma longa vida de prateleira (LEUSCHNER; ZAMPARINI, 2002; DEL CAMPO et al., 2003). Conseqüentemente, a pesquisa por aditivos naturais, especialmente de origem vegetal, aumentou notavelmente nos últimos anos (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2004; SOUZA et al., 2008). Tal busca ganha

maior importância no tocante à resistência que muitos microrganismos têm adquirido aos antibióticos, devido ao seu uso indiscriminado, tornando essencialmente necessários métodos alternativos.

Muitos compostos naturalmente encontrados em especiarias e seus óleos essenciais têm demonstrado possuir funções antimicrobianas frente a patógenos de origem alimentar e por este fato têm sido muito estudadas (SOUZA et al., 2004).

O maior interesse na área de aplicação de extratos e óleos essenciais de plantas está na inibição do desenvolvimento e redução do número de patógenos de origem alimentar, tais como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157:H7, e *Listeria monocytogenes* (BURT, 2004).

A *Escherichia coli*, bactéria Gram negativa faz parte da microbiota intestinal dos seres humanos e da maioria dos animais, atuando de forma benéfica no organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas. Apresenta sorotipos enteropatogênicos capazes de provocar sérias enfermidades no homem. A sua transmissão se dá, geralmente, através do consumo de água ou alimentos contaminados, provocando infecções do trato gastrointestinal, causando náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia e em casos mais graves hemorragia (OLSEN et al., 2000).

Uma das grandes preocupações dos órgãos reguladores da saúde pública está em controlar estas enfermidades, tendo em vista que as bactérias têm apresentado resistência à maioria dos fármacos comumente utilizados no tratamento de infecções.

Doravante, com o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, há um grande interesse em investigar os efeitos antimicrobianos de diferentes óleos essenciais frente a uma série de bactérias, seja para desenvolver outras classes de antimicrobianos naturais úteis no controle de infecção ou para a conservação do alimento. Assim os óleos essenciais são promissores agentes antimicrobianos naturais com potenciais aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica no controle de bactérias patogênicas (RAHAMAN; KANG, 2009).

Estudos têm mostrado que as plantas da família Lamiaceae, especial o alecrim, orégano, sálvia, tomilho e manjeriço, possuem atividade contra muitos patógenos de origem alimentar (SANTOYO et al., 2005; BOZIN et al., 2007; GACHKAR et al., 2007; ZAGO et al., 2009; LUQMAN et al., 2007; BARBOSA, 2010).

Rosmarinus officinalis L., popularmente conhecida como alecrim, é utilizado como condimento alimentar, e pelas suas poderosas propriedades antibacteriana, antimutagênica e como agente quimiopreventivo (OLUWATUYI; KAATZ; GIBBONS, 2004).

Moreno et al. (2006) relataram que o alecrim é uma fonte rica em compostos fenólicos com alta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e negativas.

Tais compostos podem ser úteis no controle bacteriano em alimentos. A exemplo de queijos com alto teor protéico e água livre suficientes para propiciar o desenvolvimento de microrganismos. Em especial o queijo tipo coalho, que está comumente associado a altos índices de contaminação bacteriana, conforme relatado em diversas pesquisas (FLORENTINO; MARTINS, 1999; MENDES et al., 1999; LEITE JÚNIOR et al., 2000; LEITE et al., 2002; BORGES et al., 2003; FEITOSA et al., 2003; DUARTE et al., 2005a; OLIVEIRA et al., 2010).

O queijo coalho é obtido a partir da coagulação do leite, por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionada, e comercializado, normalmente, com até 10 (dez) dias de fabricação (BRASIL, 2001b).

A sua contaminação pode ter origem na matéria prima, principalmente quando o produto é elaborado com leite não pasteurizado, nas etapas de fabricação ou após o processamento (SOUSA et al., 2006).

Os microrganismos comumente envolvidos são os do grupo coliformes, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp. cuja presença sugere produção em condições de higiene insatisfatória e/ou decorrente de matéria-prima de má qualidade, podendo expor o consumidor a enfermidades de origem alimentar (NASCIMENTO et al., 2001; DUARTE et al., 2005a).

Consoante a este cenário, o uso de óleo essencial vem a ser uma alternativa promissora no controle de patógenos em queijo de coalho. No entanto, o seu uso deverá ser pautado na composição da matriz alimentícia, visto que esta poderá interferir na ação do óleo essencial (BURT, 2004). Logo, o desenvolvimento e a aplicação de recursos naturais com atividades antibacterianas nesse tipo de produto, tornam-se necessários e úteis para prolongar sua vida de armazenamento e potencializar a prevenção de doenças veiculadas por alimentos (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2004).

Diante do exposto, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar a ação do óleo essencial obtido das folhas frescas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) no controle de *Escherichia coli* multirresistente inoculada em queijo do tipo “coalho”.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal e extração do óleo essencial de alecrim

Aproximadamente 936 gramas de folhas frescas de *Rosmarinus officinalis* Linn foram coletadas na região de Coração de Maria (SE) no período de julho de 2010, sendo encaminhadas para o Herbário Alexandre Leal Costa do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia onde foram identificadas botanicamente e catalogadas com o número de exsicata 96109.

O óleo essencial de alecrim (OEA) foi extraído segundo metodologia clássica de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado, a temperatura de ebulição por três horas (FARMACOPÉIA, 2000). Em seguida, cerca de 950 mg do óleo essencial foi recolhido e armazenado em recipiente estéril protegido da presença de luz e a temperatura de -10 °C até o momento de uso.

2.2 Avaliação *in vitro* do óleo essencial de alecrim

2.2.1 Cepa teste

A cepa de *Escherichia coli* - EC 16, isolada de queijo coalho *in natura* e multirresistente a: ampicilina (10µg/disco), cefalotina (30 µg/disco), gentamicina (10µg/disco) e cloranfenicol (30µg/disco), foi cultivada por 24 horas em meio Trypticase Soy Ágar (TSA) a 37°C. A suspensão padrão foi realizada em solução salina (NaCl a 0,85 % p/v), a qual foi padronizada de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland correspondendo à concentração de aproximadamente 10⁸ UFC/mL.

2.2.2 Triagem - Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através da técnica de difusão em ágar utilizando discos de papel filtro estéril (BAUER et al., 1966). Os discos de 6 mm de diâmetro foram embebidos com 15µL do óleo essencial de alecrim e dispostos

sobre placas de Petri descartáveis contendo ágar Mueller Hinton inoculado com cepa a EC16 em suspensão na concentração de 10^8 UFC/mL, conforme descrito no item 2.2.1. As placas foram incubadas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, para posterior leitura do halo de inibição em milímetros. Foi considerado como atividade antimicrobiana positiva quando observado a inibição do crescimento bacteriano com diâmetro de halo igual ou superior a 10 mm (SOUZA et al., 2005). O ensaio foi realizado em duplicata. Em paralelo foi realizado o mesmo ensaio com a cepa teste frente ao dimetilsulfóxido P.A (DMSO), solvente utilizado na diluição do óleo essencial de alecrim, para determinação da concentração mínima inibitória.

2.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima – CIM

Para determinação da CIM, utilizou-se a técnica de difusão em poços adaptada de Bauer et al. (1966).

Em tubos tipo Falcon contendo 20 mL de ágar Mueller Hinton, previamente fundido a temperatura de 45°C foi inoculado 2mL da cepa teste em suspensão, na concentração de 10^8 UFC/mL, sendo em seguida vertido sobre placas de Petri estéreis contendo uma fina camada de ágar bacteriológico a 1%, dispostas com ponteiras estéreis invertidas. Após a solidificação do meio em capela de fluxo laminar, as ponteiras foram retiradas do ágar, formando assim, poços com 6 mm de diâmetro. Dentro dos poços foram depositadas alíquotas de 30 μL do óleo essencial de alecrim diluído em dimetilsulfóxido P.A (DMSO) nas concentrações de 500, 400, 300, 200 e 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para posterior leitura do halo de inibição, em milímetros, sendo considerada como CIM a menor concentração em que foi observada a inibição do crescimento bacteriano com diâmetro de halo igual ou superior a 10 mm (SOUZA et al., 2005). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3 Avaliação do óleo essencial de alecrim na matriz alimentícia

2.3.1 Preparo da amostra

O queijo coalho *in natura* utilizado no experimento foi adquirido no comércio local, estando o mesmo embalado a vácuo e livre de conservantes na sua composição, conforme indicação no rótulo, com prazo de validade de três meses a partir da data de fabricação e de cinco dias, após abertura.

O produto ainda embalado foi submetido à radiação ultravioleta em capela de fluxo laminar por 15 minutos antes de sua abertura. Em seguida, foi porcionado em 10g para serem utilizados nos tratamentos, e acondicionados em sacos estéreis e submetidos novamente a radiação ultravioleta durante 20 minutos, visando minimizar uma possível contaminação microbiológica.

Após esses procedimentos, uma amostra do queijo coalho foi examinada microbiologicamente, através das seguintes análises: contagem padrão em placas, utilizando o meio de cultura ágar para contagem padrão; contagem de *Escherichia coli*, em ágar Chromocult (Merck®); contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*, em ágar Baird Parker e Pesquisa de *Salmonella* spp., seguindo metodologias de Silva (2007a).

2.3.2 Determinação da ação antimicrobiana do óleo essencial de alecrim no controle de *E.coli* - EC16 em queijo coalho *in natura*.

Para realização do teste da atividade antimicrobiana do OEA na matriz alimentícia, a suspensão bacteriana teste, obtida conforme descrito no item 2.2.1, foi diluída seriadamente em água peptonada 0,1% até a concentração final 10^5 UFC/mL.

Em ambiente estéril, as porções de 10 gramas do queijo coalho acondicionados em sacos estéreis foram inoculadas com 500µL do OEA na concentração inibitória mínima (20% v/v) previamente determinada e 500µL da cepa teste a 10^5 UFC/mL. Ainda embalado, as porções de queijo foram massageadas/maceradas manualmente e deixadas em repouso por duas horas para melhor aderência do inóculo. Após esse tempo, os sacos contendo os queijos foram armazenados sob refrigeração ($8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e analisados nos intervalos de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, perfazendo um

total de oito tratamentos, equivalente a sete dias de armazenamento (Adaptado de SOUZA, 2006; SILVA, 2007B; BÍSCOLA, 2007).

O mesmo procedimento foi aplicado para o teste controle, com exceção da inoculação do OEA.

Nos tempos estabelecidos, as amostras de queijo coalho foram submetidas a diluições seriadas decimais (10^{-1} a 10^{-7}) em água peptonada estéril a 0,1%, seguido de plaqueamento em ágar Chromocult para contagem de coliformes totais e *E.coli*. As placas foram incubadas 35-37°C por 24 horas. Após este período, realizou-se a leitura das placas. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram convertidos em Log de UFC/g de queijo coalho (Adaptado de SOUZA, 2006; SILVA, 2007B; BÍSCOLA, 2007; BARBOSA, 2010).

2.4 Análise Estatística

Para comparar os tratamentos (óleo e controle), concentrações e suas interações, foi utilizado o teste de Tukey, a nível de significância de $p \leq 0,05$. Foi utilizado o software estatístico ASSISTAT versão 7.6 beta, 2011, licença gratuita.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Triagem - Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim

A cepa teste *Escherichia coli*-EC16 mostrou-se susceptível a ação do óleo essencial de alecrim, conforme resultado apresentado na Tabela 1. Não foi evidenciada atividade antimicrobiana do DMSO sobre a cepa avaliada, caracterizando a viabilidade do mesmo como solvente do OEA para determinação da sua concentração inibitória mínima.

3.2 Determinação da concentração inibitória mínima – CIM

A concentração inibitória mínima do óleo essencial das folhas frescas de *Rosmarinus officinalis* L. capaz de inibir o crescimento da cepa de *Escherichia coli* - EC16 foi de 200 µL/mL, equivalente ao halo de inibição de 11 mm de diâmetro (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração inibitória mínima – CIM do OEA sobre EC16 determinada através da técnica de difusão em ágar.

| Concentração do OEA (µL/mL) | Halo de inibição (mm) |
|-----------------------------|-----------------------|
| <i>OEA bruto</i> | 21 |
| 500 | 15 ^a |
| 400 | 12 ^b |
| 300 | 12 ^b |
| 200 | 11^b |
| 100 | 09 ^c |

Valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatística entre si (p≤0,05).

Diversas pesquisas têm demonstrado a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. frente a diferentes microrganismos (SANTOYO et al., 2005, BOZIN et al.,2007; GACHKAR et al.,2007; ZAGO et al., 2009; LUQMAN et al., 2007), todavia, de acordo com Angioni et al. (2004), Lopez et al. (2005) e Hentz e Santin

(2007) seu poder de inibição mostrou-se fraco ou ausente contra bactérias Gram negativas, quando comparado com a ação frente as Gram positivas e com a atividade de outros óleos. Segundo Lambert (2002), Bezic et al. (2003) e Harris (2003), a estrutura da parede celular das bactérias Gram negativas é constituída essencialmente de um lipopolissacarídeo que bloqueia a penetração de óleo hidrófobo e evita o acúmulo de óleos essenciais na membrana de células alvo, conferindo uma maior resistência a essas bactérias. No estudo em questão, o resultado da avaliação da atividade antimicrobiana e da determinação do CIM mostrou a susceptibilidade da cepa *Escherichia coli* - EC16 frente ao óleo testado, mesmo esta possuindo resistência a alguns antibióticos. Segundo Burt (2004) considerando-se o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes em óleos essenciais, provavelmente, sua atividade antibacteriana não é atribuível a um mecanismo específico, mas há vários alvos na célula.

De acordo com Hammer, Larson e Riley (1999), Dellacassa et al. (1999), Burt (2004), Carvalho Jr (2004), Duarte et al. (2005b), Rios e Recio (2005) Bertini et al. (2005), Nascimento et al. (2007) e Celiktas et al. (2007), a ação antimicrobiana e, conseqüentemente, a concentração inibitória mínima de óleos essenciais podem sofrer interferências devido a: região/período de cultivo da planta, método de extração utilizado, método de análise, parte da planta utilizada (folha ou planta inteira), preparo da matéria-prima (*in natura* ou seca), tipo e condições cultivo do microrganismo, (tempo de incubação, temperatura, taxa de oxigênio), meio de cultura, concentração da substância testada, agentes diluentes do óleo, dentre outros fatores.

3.3 Avaliação microbiológica do queijo coalho *in natura* sem inoculação

Os resultados das análises microbiológicas realizadas na amostra de queijo coalho antes da inoculação da cepa de *Escherichia coli* estão apresentados na Tabela 2. Observa-se que a amostra apresentou ausência e/ou níveis muito baixos de contagens dos microrganismos investigados. Logo, pôde-se ressaltar a não interferência de outras bactérias na amostra, em especial *E.coli*, visto que a presença desta e de outros microrganismos antes da inoculação da cepa EC-16 poderia comprometer os resultados do experimento.

Tabela 2: Análises microbiológicas do queijo coalho antes da inoculação

| Análises | Resultados em UFC/g | *Máximo permitido |
|---|---------------------|--------------------|
| Coliformes totais | $<10^2$ | ** 5×10^2 |
| <i>Escherichia coli</i> | $< 10^2$ | - |
| <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva | $<10^2$ | 5×10^2 |
| <i>Salmonella</i> sp. | Ausência | Ausência |
| Contagem padrão em placas | $< 10^2$ | - |

* BRASIL (2001): RDC nº12, janeiro de 2001; ** Máximo estabelecido para coliformes a 45°C.

3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim no controle da *E.coli*-EC16 no queijo coalho *in natura*

De acordo com os resultados apresentados na Figura 1 e Tabela 3, óleo essencial de alecrim adicionado ao queijo coalho na concentração inibitória mínima encontrada no teste *in vitro* (200 µL/mL), propiciou uma redução de 2,3 ciclos logarítmicos na população bacteriana nas primeiras 24 horas, mantendo este valor, praticamente, estável no decorrer de todo o experimento, 168 horas. Resultado semelhante ao encontrado por Mendonça (2004) que avaliou os óleos essenciais de cravo, manjerição e orégano no controle de *S.aureus* em ricota. Porém, vai de encontro a Mendonza-yepes et al., (1997), Porte; Godoy (2001), Burt (2004) e Kruger (2006), que relataram que para se alcançar a mesma ação antimicrobiana apresentada em estudos *in vitro*, a concentração de óleo essencial a ser adicionado no alimento deverá ser consideravelmente maior, devido a interferência dos ingredientes do alimento na ação do óleo.

Ao longo das 168 horas (sete dias), pode-se inferir que não houve uma redução total da população antimicrobiana na amostra, em virtude da concentração do óleo testada – CIM, bem como da interferência da matriz alimentícia, neste caso em especial o teor de lipídios presentes no produto – teor de gordura nos sólidos totais de queijo tipo coalho varia entre 35,0% a 60,0% (BRASIL, 2001b). Em experimento similar realizado por Kruger (2006) em que utilizou o óleo essencial de orégano no controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal, a redução microbiana não se manteve estável

durante o armazenamento do produto, havendo a recuperação do patógeno. A autora sugere que tal recuperação foi possível devido à forte interferência que a matriz alimentícia possui na atividade antimicrobiana do óleo.

Embora não esteja bem elucidado, a gordura pode formar uma barreira protetora envolvendo a bactéria e/ou a fração lipídica pode absorver o óleo essencial, inibindo parcial ou totalmente a sua ação contra a bactéria, na fase aquosa (FARBOOD et al., 1976; AURELI et al., 1992.; PANDIT; SHELEF, 1994; TASSOU et al., 1995; LAMBERT et al., 2001; MEJLHOLM; DALGAARD, 2002; SILVA, 2007b). Esta suposição pôde ser observada nos resultados encontrados por Smith-Palmer et al. (2001), quando testaram óleos essenciais de cravo e canela contra *Salmonella* Enteritidis em queijo com baixo (16%) e alto (30%) teor de lipídios, obtendo melhor ação para o queijo com baixo teor de lipídios para ambos os óleos.

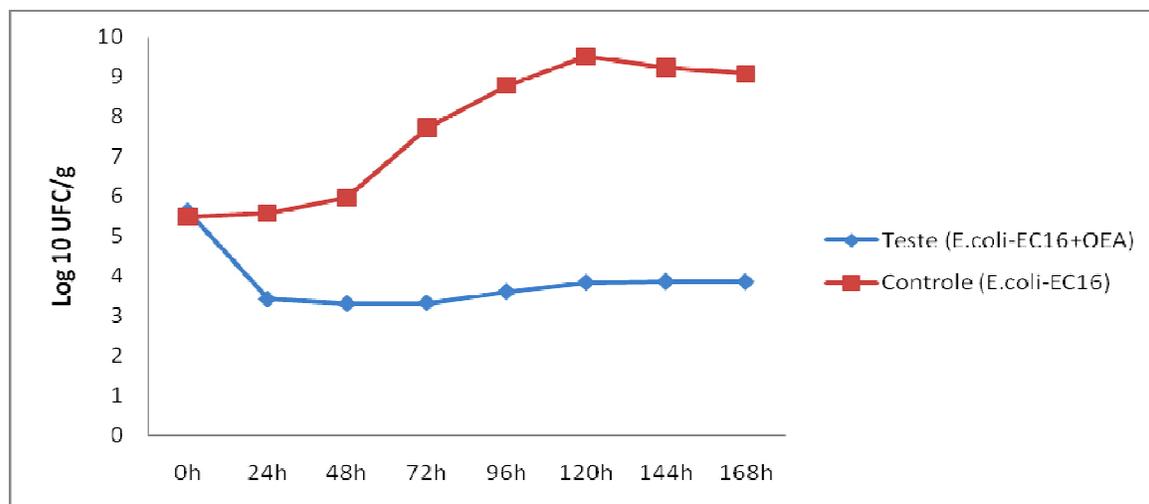


Figura 1: Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim frente a cepa de *Escherichia coli*- EC16 em queijo coalho durante 168 horas ($p \leq 0,05$).

Diversas pesquisas têm relatado altos índices de coliformes termotolerantes e confirmação do principal microrganismo indicador deste grupo, *Escherichia coli*, em queijos do tipo coalho (FLORENTINO; MARTINS, 1999; MENDES et al., 1999; LEITE JÚNIOR et al., 2000; LEITE et al., 2002; BORGES et al., 2003; FEITOSA et al., 2003; DUARTE et al., 2005a; OLIVEIRA et al., 2010), isto evidencia que esta bactéria, fermentadora de lactose, facilmente se adapta à matriz alimentícia, rica em lactose. Pode-se observar este fato analisando a amostra controle, sem adição de OEA (Figura

1), em que houve um aumento de 4 ciclos logarítmicos durante 120 horas de armazenamento.

Tabela 3: Médias das contagens de *E.coli*-EC16 no queijo coalho nas amostras controle e nos tratamentos com OEA.

| Queijo coalho <i>in natura</i> | Contagem de <i>E.coli</i> - EC16 X tempo | | | | | | | |
|--------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | 0h | 24h | 48h | 72h | 96h | 120h | 144h | 168h |
| Controle | 3,0x10 ⁵ _b | 3,8x10 ⁵ _a | 9,1 x10 ⁵ _a | 5,1 x10 ⁷ _a | 6,1 x10 ⁸ _a | 3,2 x10 ⁹ _a | 1,7 x10 ⁹ _a | 1,1 x10 ⁹ _a |
| Tratamento | 4,3x10 ⁵ _a | 2,6 x10 ³ _b | 2,0 x10 ³ _b | 2,1 x10 ³ _b | 4,0 x10 ³ _b | 6,8 x10 ³ _b | 7,2 x10 ³ _b | 7,1 x10 ³ _b |

Valores seguidos da mesma letra, na mesma linha, não apresentam diferença estatística entre si (p≤0,05).

O uso de óleos essenciais pode melhorar a segurança dos alimentos e, especialmente, a qualidade microbiológica. Rahman e Kang (2009) recomendam aplicar os óleos essenciais ou seus compostos como parte de um sistema de barreira, isto é, usá-los como um componente antimicrobiano juntamente com outras técnicas de preservação. Porte e Godoy (2001) também concluíram, que extratos de alecrim associados a outros agentes, podem contribuir para o controle do crescimento bacteriano e impedir a rancificação de alimentos. Tais observações são importantes do ponto de vista organoléptico do uso de óleos essenciais como agentes antimicrobianos em alimentos que, segundo (DEL CAMPO et al., 2000) pode limitar sua utilização em alimentos. Nesta pesquisa não se objetivou avaliar sensorialmente o produto, todavia, esta análise é válida para futuros estudos, tendo em vista que o uso de altas concentrações de óleo essencial poderá comprometer a aceitação do produto.

Diante da concentração inibitória mínima utilizada no experimento, o óleo essencial das folhas de *Rosmarinus officinalis* foi capaz de reduzir a população da cepa de *Escherichia coli* – EC16 em 2,3 ciclos logarítmicos e manter o produto, praticamente, estável durante as 168 horas em que foi analisado. Tal redução foi significativa, pois, se aproximou do valor máximo aceitável de coliformes termotolerantes segundo a legislação RDC nº12/2001 (Brasil, 2001), que estabelece para queijo coalho 5x10² UFC/g.

Sendo os óleos essenciais substâncias consideradas GRAS - geralmente reconhecido como seguro (AL-REZA; RAHMAN; KANG, 2009) e a *Escherichia coli* uma bactéria indicadora da qualidade higiênico-sanitária em alimentos, é de fundamental importância que novas técnicas de conservação e preservação dos alimentos venham a ser investigadas, a fim de contribuir para segurança alimentar.

4 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais utilizadas, com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o óleo essencial das folhas frescas de *Rosmarinus officinalis* L. possui ação inibitória frente à cepa de *Escherichia coli* – EC16, *in vitro* e na matriz alimentícia, podendo o mesmo ser usado no controle deste microrganismo. No entanto, a sua utilização como conservante em alimentos deve ser pautada em análises sensoriais, a fim de avaliar a aceitação do óleo essencial de alecrim como aditivo nos alimentos, bem como associado a outras técnicas de conservação.

5 REFERÊNCIAS

- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COISSON, J.D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **J Agr. Food Chem.** v.52, p.3530-3535, 2004.
- AL-REZA, S. M., RAHMAN, A., KANG, S.C. Chemical composition and inhibitory effect of essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. on food-borne pathogens. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.1176–1182, 2009.
- AURELI, P., COSTANTINI, A., ZOLEA, S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection.**, v.55 n.5, p.344–348, 1992.
- BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação.** – São Paulo, Botucatu, 121p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010.
- BAUER, A.W.M.M.; KIRBY, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.3, p. 493-496, 1966.
- BEZIC, N., SKOCIBUCIC, M., DUNKIC, V., RADONIC, A. Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. **Phytother. Res.**, v.17, p.1037-1040, 2003.
- BERTINI, L. M., PEREIRA, A. F., OLIVEIRA, C. L. L., MENEZES, E. A., MORAIS, S. M., CUNHA, F. A., CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, p.80-83, 2005.
- BÍSCOLA, V. **Influencia da matriz alimentar no efeito antimicrobiano de óleo essencial de orégano e nisina contra *Listeria monocytogenes*: avaliação em modelos cárneos.** São Paulo, 74p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, 2007.
- BORGES, M.F.; FEITOSA, T.; NASSU, R.T.; MUNIZ, C.R.; AZEVEDO, E.H.F.; FIGUEIREDO, E.A.T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.21, n.1, p.31-40, 2003.
- BOZIN, B., MIMICA-DUKIC, N., SAMOJLIK, I., JOVIN, E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. **J Agric Food Chem.**, v.55, p.7879–7885, 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo de coalho** Instrução Normativo Nº 30, de 26 de junho de 2001b. Disponível em: < http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/leite_queijo_coalho.htm > Acesso em: 26 dez 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada nº 12 de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 02 de janeiro de 2001, seção I, p. 45-53, 2001a.

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.

CARVALHO Júnior, R.N. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo**. Campinas, 2004. 151p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

CELIK TAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chem.** v.100, p.553-559, 2007.

DEL CAMPO, J., AMIOT, M.J., NGUYEN-THE, C. Antimicrobial effect of rosemary extracts. **Journal of Food Protection**, v.10, p.1359-1368, 2000.

DEL CAMPO, J., AMIOT, M.J., NGUYEN-THE, C. Determination of most bioactive phenolic compounds from rosemary against *Listeria monocytogenes*: influence of concentration, pH and NaCl. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 6, p. 2066-2071, 2003.

DELLACASSA, E.; LORENZO, D.; MOYNA, P.; FRIZZO, C.D.; ATTI-SERAFINI, L.; DUGO, P. *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) essential Oils from the South of Brazil and Uruguay. **Journal of Essential Oils Research**, v.11. p.27-30. 1999.

DUARTE, D.M.S; SCHUSH, D.M.T; SANTOS, S.B; RIBEIRO, A.R; VASCONSELOS, A.M.M; SILVA, J.V.D; MOTA, R.A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n.3, p.297-302, 2005a.

DUARTE, M.C.T., FIGUEIRA, G.M., SARTORATTO, A., REHDER, V.L.G, DELARMELINA, C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **J Ethnopharmacol.** v.97, p.305-311, 2005b.

FARBOOD, M. I., MACNEIL, J. H., OSTOVAR, K. Effect of rosemary spice extractive on growth of microorganisms in meat. **J. Milk Food Technol.**v.39, p.675-679, 1976.

Farmacopéia Brasileira. 4. ed., parte II. São Paulo: Atheneu, 2000.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H.F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênicos-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.162-165, 2003.

FERNANDEZ-LOPEZ, J., ZHI, N., ALESON-CARBONELL, L., PEREZ-ALVAREZ, J.A., KURI, V. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. **Meat Science**, v.69, p.371-380, 2004.

FIGUEIREDO, E.A.T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira CEPPA**, v.21, n.1, p.31-40, 2003.

FLORENTINO, E.R., MARTINS, R.S. Características microbiológicas do “queijo de coalho” produzido no Estado da Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, v.13, n. 59, p. 43-48, 1999.

GACHKAR, L., YADEGARI, D., REZAEI, M.B., TAGHIZADEH, M., ASTANEH, S.A., RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v.102, p.898-904, 2007.

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.

HARRIS, R. Sinergism in the essential oil world. **The International Journal of Aromatherapy**, v.12, p.179-186. 2003.

HENTZ, S. M., SANTIN, N.C. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 2, p. 93-100, 2007.

JAY, J.M. Introdução aos microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: _____. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, cap.22, p. 454-489, 2005.

KRUGER, M.F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça fresca refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. São Paulo, 91p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, 2006.

LAMBERT P.A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram positive bacteria and mycobacteria. **J. Appl. Microbiol.** 92, Supplement 1, p.46S-54. 2002.

LAMBERT, R.J.W., SKANDAMIS, P.N., COOTE, P., NYCHAS, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.453–462, 2001.

LEITE JÚNIOR, A.F.S., FLORENTINO, E.R., OLIVEIRA, E.B., TORRANO, A.D.M. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado à temperatura ambiente

ou sob refrigeração, em Campina Grande-PB. **Revista Higiene Alimentar**, v.14, n. 73, p.53-59, 2000.

LEITE, C.C.; GUIMARÃES, A.G.; RIBEIRO, N.S.; SILVA, M.D.; ASSIS, P.N. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em queijo do tipo “coalho” comercializado em Salvador (BA). Importância para saúde pública. **Revista Analytica**, n.2, p.8-41, 2002.

LEUSCHNER, R. G. K.; ZAMPARINI, J. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella enterica* serovar *enteridis* in broth model systems and mayonnaise. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 6-7, p. 399-404, 2002.

LOPEZ, P., SANCHEZ, C., BATLE, R., NERIN, C. Solid and vapor phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.7, p.6939–6946, 2005.

LUQMAN, S.; DWIVEDI, G.R.; DAROKAR, M.P., KALRA, A.; KHANUJA, S.P. Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. **Altern Ther Health Med**, v.13, n.5, p.54-59. 2007.

MEJLHOLM, O., DALGAARD, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p.27– 31, 2002.

MENDES, E.S., LIMA, E.C., NUMERIANI, A.K.M., COELLHO, M.I.S. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes em queijo de “coalho” comercializado em Recife. **Revista Higiene Alimentar**, v.13, n. 66/67, p.122-126, 1999.

MENDONÇA, A.T. **Efeito de óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa.** Lavras, 72p. Tese (doutorado), Universidade Federal de Lavras, 2004.

MENDOZA-YEPES, M.J., SANCHEZ-HIDALGO, L.E., MAERTENS, G. MARIN-INIESTA, F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. **J. Food Saf.**, n.1, v.17, p.47–55, 1997.

MORENO, S., SCHEYER, T., ROMANO, C.S., VOJNOV, A.A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v.40, p.223-231, 2006.

NASCIMENTO P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI A.A.; SANTOS, P.O.; BARBOSA Junior, A.M.; TRINDADE R.C; Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, p.108-113. 2007.

NASCIMENTO, M.G.F., NASCIMENTO, R.E., CUNHA, C.P., CORBIA, G.C.A. Estudo transversal sobre alguns fatores de risco na contaminação natural de coliformes fecais em queijo minas frescal. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 86, p. 55-59, 2001.

- OLIVEIRA, K.A., EVÊNCIO NETO, J., PAIVA, J.E., MELO, L.E.H. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v.77, n.3, p.435-440, 2010.
- OLSEN, S.J., MacKINON, L.C., GOULDING, J.S., BEAN, N.H., SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, n.SS01, p.1-51, March 17, 2000.
- OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**, v.65, p.3249-3254. 2004.
- PANDIT, V.A., SHELEF, L.A. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Microbiology**. v.11, p.57– 63, 1994.
- PAULA, C.J.S., MARIN, J.M. Isolation of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from diarrheic dogs and their antimicrobial resistance profile. **Braz. J. Microbiol.**, v.39, p.498-500, 2008.
- 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, 2001.
- RAHMAN, THUNB. A.; KANG, S.C. *In vitro* control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica*. **Food Chemistry**. v.116, p.670–675. 2009.
- RÍOS, J.L, RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.** v.100, p80-84, 2005.
- SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBANEZ, E.; SENORANS, F. J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, v.68, n.4, p.790–795. 2005.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3ª edição. São Paulo: Livraria Varela, 2007 a. 552p.
- SILVA, J.P.L. **Avaliação da ação de antimicrobianos naturais no controle de *Salmonella* Enteritidis em salada de legumes com maionese**. São Paulo. 90p.Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, São Paulo, 2007b.
- SINGH, R., CHANDRA, R., BOSE, M., LUTHRA, P. M. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. **Current Science**, v.83, n.6, p.737-740, 2002.
- SOUSA, R.A; FUIGUEIREDO, E.A.T.; MAIA, G.A; FRIZZOS. E. Incidência de *Listeria Monocytogenes* em Queijo de Coalho Artesanal, Comercializado a temperatura Ambiente, em, Fortaleza, CE. **Higiene alimentar**, v. 20, n.138, p.66-69, 2006.

SOUZA, S. M. C., PEREIRA, M.C., ANGÉLICO, C.L., PIMENTA, C.J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciênc. Agrotec.**, v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.

SOUZA, E. L., STAMFORD, T. L.M., LIMA, E.O., BARBOSA FILHO, J.M., MARQUES, M.O.M. Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.28, n.2, p.418-422, 2008.

SOUZA, E.L., LIMA, E.O., FREIRE, K.R.L., SOUSA, C.P. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. **Braz Arch Biol Technol.**, v.48, p.245-250, 2005.

SMITH-PALMER, A., STEWART, J., FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**. v.18, p.463– 470, 2001.

TASSOU, C., DROSINOS, E.H., NYCHAS, G.-J.E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4°C and 10°C. **Journal of Applied Bacteriology** v.78, p.593– 600, 1995.

WHO. Food safety and foodborne illness, nº237. **World Health Organization**, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>, acesso em: 22 Jan.2011.

ZAGO, J.A.A., USHIMARU, P.I., BARBOSA, L.N., FERNANDES JR, A. Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains from human infections. **Rev Bras Pharmacogn.**, v.19, p.828-33. 2009.

CONCLUSÕES GERAIS

- O óleo essencial das folhas frescas de *Rosmarinus officinalis* analisado, apresentou como constituintes majoritários o α -pineno (19,8%), β -mirreno (24,2%), 1,8 cineol (22,2%) e verbenona (9,3%).
- As cepas bacterianas avaliadas de ***Salmonella Enteritidis*, *Infantis* e *Oranienburg*** (MOA25, MOA23, SAL16 respectivamente), ***E.coli*** (MOA51, MOA46, EC16) e ***Staphylococcus coagulase positiva*** (SA06), foram susceptíveis ao óleo essencial de alecrim.
- A CIM do óleo foi 200 μ L/mL (20% v/v) para as cepas MOA51, MOA46, EC16, SA06, SAL16 e MOA25 e de 400 μ L/mL (40% v/v) para a cepa MOA23.
- As cepas MOA51, EC16, MOA25 e SAL16 apresentaram resistência frente aos fármacos testados.
- Houve sinergismo em 58% dos ensaios que avaliou a combinação do óleo essencial de alecrim com os fármacos, frente às cepas resistentes.
- O óleo essencial de alecrim na concentração inibitória mínima (20% v/v) reduziu a população da cepa EC16 inoculada em queijo coalho, em 2,3 ciclos logarítmicos.

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que o emprego do óleo essencial de alecrim pode contribuir no controle de bactérias associadas à DVA, tanto no setor alimentício, quanto no setor farmacêutico, de forma:

- preventiva, na conservação de alimentos, controlando o desenvolvimento bacteriano.
- terapêutica, associado a fármacos, utilizados na medicina humana, visando reverter à resistência bacteriana;

No entanto, ambos os empregos deverão ser pautados em estudos futuros, tais como: avaliar se o efeito sinérgico do óleo essencial de alecrim com os fármacos será eficaz em estudo *in vivo* e analisar sensorialmente o queijo coalho, para avaliar a aceitabilidade do consumidor.

ANEXOS

CAPÍTULO 2



Figura 1. Extração do óleo essencial das folhas frescas de alecrim em aparelho Clevenger modificado.

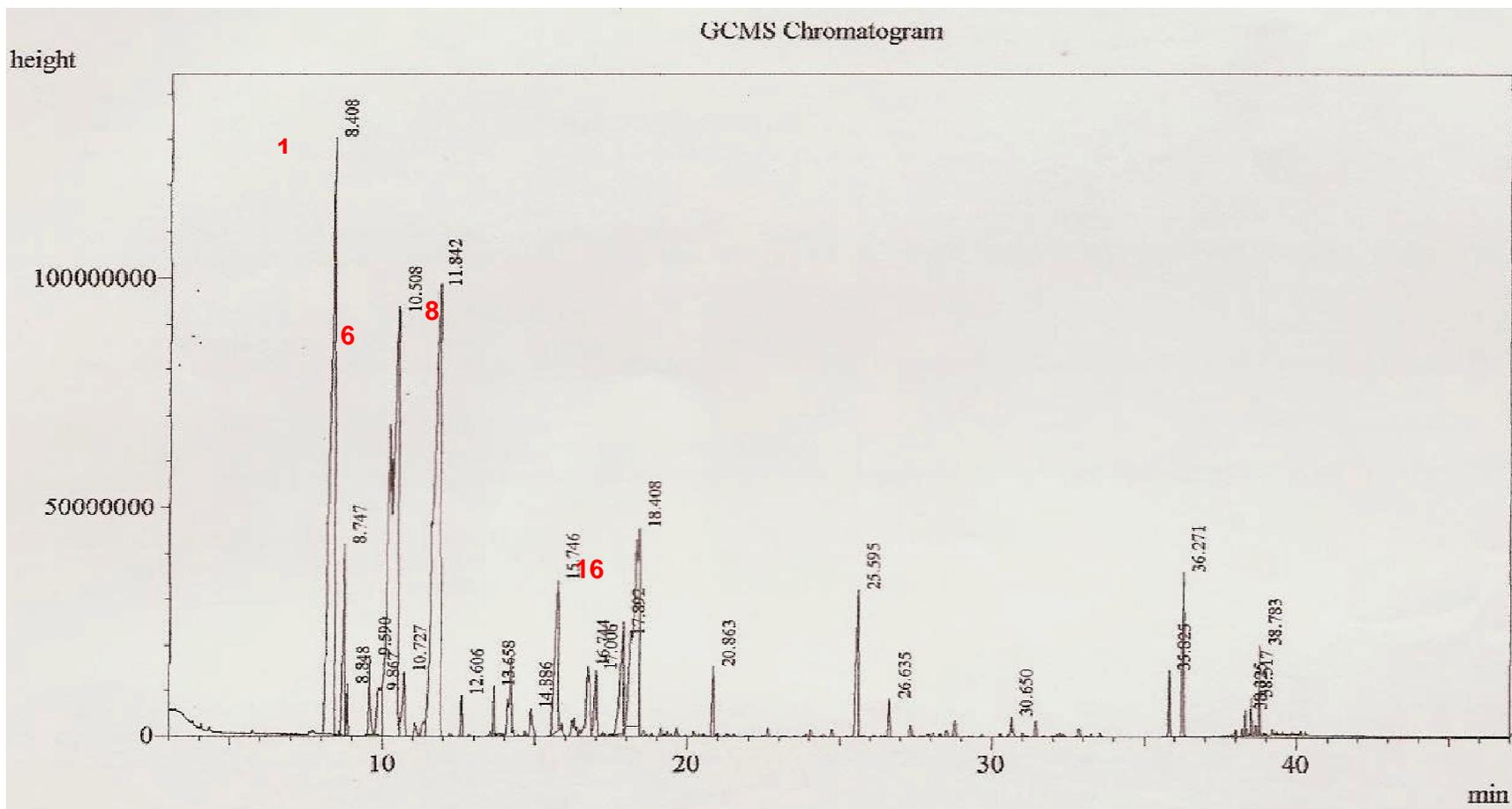


Figura 2. Cromatograma do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). Os picos numerados representam os principais compostos encontrados (1- α -pineno, 6 - β -mirceno, 8 - 1,8 cineol e 16 - verbenona).

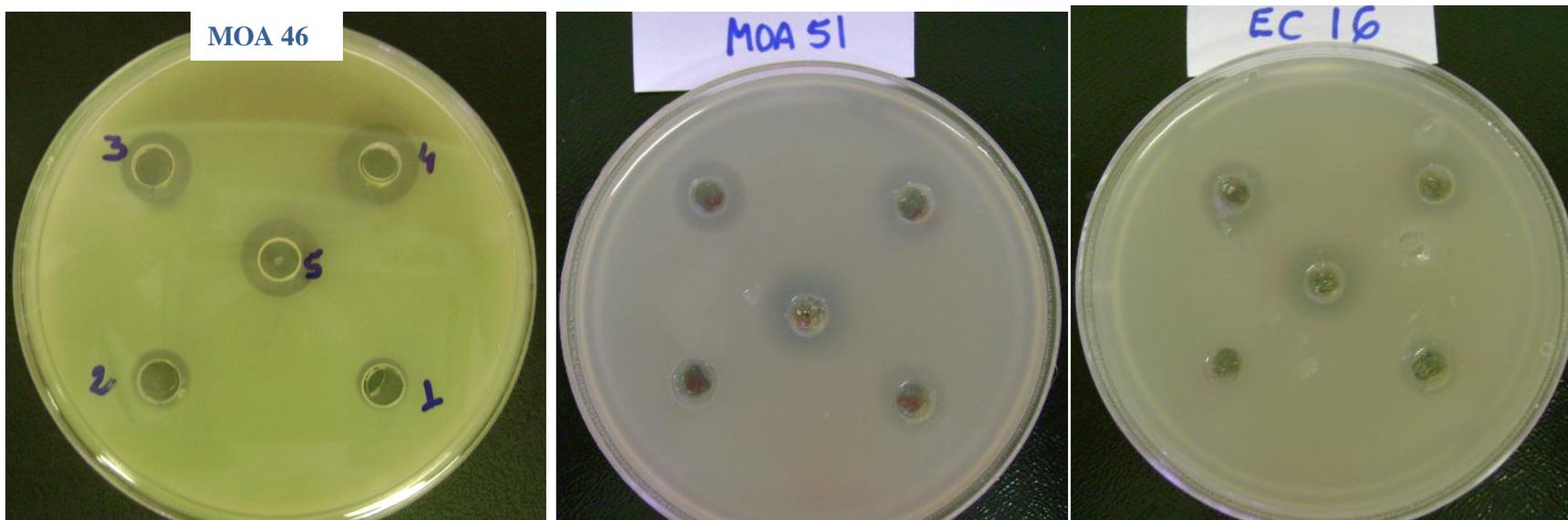


Figura 3. Determinação da CIM para a linhagem de *E.coli* (MOA46, MOA51 e EC16).

CAPÍTULO 3

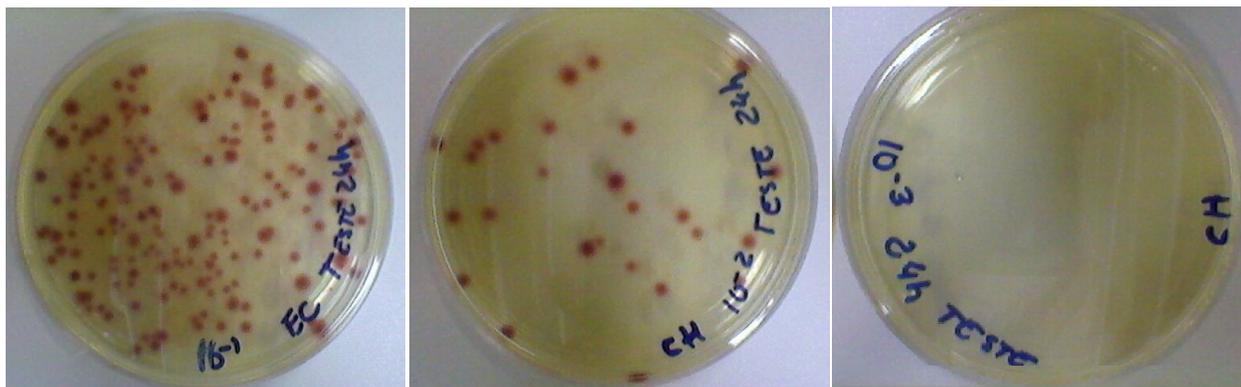


Figura 1. Crescimento da cepa EC16 após 24h em ágar Chromocult – Amostra de queijo coalho tratada com OEA.

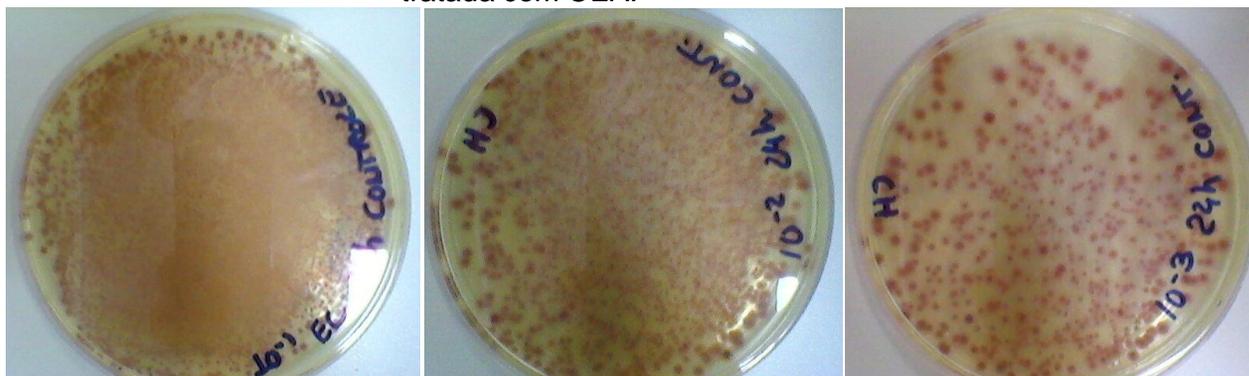


Figura 2. Crescimento da cepa EC16 após 24h em ágar Chromocult – Amostra de queijo coalho CONTROLE.