

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**“ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
CANELA DA CHINA (*Cinnamomun cassia*), ORÉGANO (*Origanum vulgare*),
PIMENTA NEGRA (*Piper nigrum*) E TOMILHO (*Thymus vulgaris*) BRANCO
FRENTE À AMOSTRAS DE *SALMONELLA ENTERICA* ISOLADAS DE AVES”**

VANESSA LAVINIKI

PORTO ALEGRE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

“ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA DA CHINA (*Cinnamomun cassia*), ORÉGANO (*Origamun vulgare*), PIMENTA NEGRA (*Piper nigrum*) E TOMILHO BRANCO (*Thymus vulgaris*) FRENTE À AMOSTRAS DE *SALMONELLA ENTERICA* ISOLADAS DE AVES”

Autora: Vanessa Laviniki*

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, especialidade na área de Patologia Aviária.

Orientador: Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

PORTO ALEGRE

2013

* Médica Veterinária

CIP - Catalogação na Publicação

Laviniki, Vanessa

Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de canela da (*Cinnamomum cassia*), orégano (*Origanum vulgare*), pimenta negra (*Piper nigrum*) e tomilho branco (*Thymus vulgaris*) frente à amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves / Vanessa Laviniki. -- 2013.

51 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. salmonela. 2. óleos essenciais. 3. atividade antimicrobiana. I. Nascimento, Vladimir Pinheiro do, orient. II. Título.

Vanessa Laviniki

Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de canela da (*Cinnamomun cassia*), orégano (*Origanum vulgare*), pimenta negra (*Piper nigrum*) e tomilho branco (*Thymus vulgaris*) frente à amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves

Aprovado em 25 de março de 2013.

APROVADO POR

Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

APROVADO POR

Dr. César Augusto M. Avancini
Membro da Comissão

APROVADO POR

Dra. Luciana Ruschel dos Santos
Membro da Comissão

APROVADO POR

Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida e guiar meus passos.

Aos meus pais, Inácio e Salete, pelo amor, dedicação, exemplo de vida e por sempre estarem ao meu lado apoiando as minhas decisões e aos meus irmãos Humberto Carlos Laviniki e Fernanda Laviniki Duarte pelo apoio e mesmo longe sempre se fizeram presentes. A minha irmã Selma Rita Laviniki, que mesmo não estando mais conosco, sempre esteve presente em meus pensamentos.

Ao Vladimir Pinheiro do Nascimento pela oportunidade de realizar este trabalho, bem como pela orientação, paciência e amizade.

A Marisa Cardoso, por me receber em seu laboratório para que pudesse realizar meu projeto e pelos ensinamentos.

Aos colegas do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, pelo apoio e colaboração durante o mestrado.

A Martha Pulido, pela amizade, paciência, conselhos e por sempre estar disposta a conversar e auxiliar nas dúvidas que surgiam pelo meio do caminho.

Aos colegas do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, pelo apoio e colaboração durante o mestrado.

A Cristina Peter, pela amizade e por sempre estar disposta a ajudar.

A minha querida amiga Daiane de Abreu, pelos anos de amizade e mesmo não estando perto sempre estando presente em minha vida.

A todos, muito obrigada!

Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de canela da China (*Cinnamomun cassia*), orégano (*Origanum vulgare*), pimenta negra (*Piper nigrum*) e tomilho branco (*Thymus vulgaris*) frente à amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves

Autora: Vanessa Laviniki

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento

RESUMO

Infecções por bactérias do gênero *Salmonella* podem causar doenças em aves levando a perdas produtivas, como, queda de postura, diminuição do ganho de peso e mortalidade. Além disso, os produtos avícolas estão entre as principais causas de toxi-infecções alimentares em humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de Canela da China, Orégano, Pimenta Negra e Tomilho Branco frente a amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves, bem como comparar as técnicas de disco difusão e microdiluição em caldo. Para avaliar o efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento dos micro-organismos usou-se uma técnica de microdiluição em caldo empregando-se resazurina como indicador de viabilidade celular. Dos quatro óleos testados, apenas a pimenta negra não exibiu efeito inibitório sobre o crescimento das bactérias testadas e o óleo de orégano foi o único que apresentou atividade frente a todas as amostras com valores de concentração inibitória mínima (CIM) variando de 8-1% (v/v). Enquanto que, os óleos de tomilho e canela foram efetivos para 91,3% (42/46) e 80,43% (37/46) das amostras, respectivamente. Os valores de CIM para o tomilho variaram de 8-4% (v/v) e para a canela foram de 8-2% (v/v). Em relação às técnicas, pode-se observar que a técnica de microdiluição em caldo apresentou melhores resultados que a disco difusão, embora seja difícil comparar os resultados devido às características peculiares dos óleos, como a viscosidade, volatilidade e diferente afinidade com a água. Além disso, a microdiluição em caldo nos fornece valores semi-quantitativos, enquanto que o método de disco difusão os resultados são descritos qualitativamente. Embora não se tenha ainda hoje padronizações para avaliar o efeito inibitório dos óleos no crescimento dos micro-organismos, com este estudo podemos observar que os óleos, principalmente orégano, são uma alternativa natural para aplicações na indústria visando a redução de *Salmonella* nos produtos.

Palavras-chave: salmonela, óleos essenciais, atividade antimicrobiana

In vitro antimicrobial activity of essential oils of cinnamon (cinnamomun cassia), oregano (Origanum vulgare), thyme (Thymus vulgaris) and black pepper (Piper nigrum) against strains of Salmonella enterica isolated from poultry

Author: Vanessa Laviniki

Adviser: Vladimir Pinheiro do Nascimento

ABSTRACT:

Infections with bacteria of the genus Salmonella can cause disease in poultry leading to production losses, as falling posture, decreased weight gain and mortality. Furthermore, poultry products are among the major causes of human alimentary toxoinfections. The aim of this study was to evaluate the in vitro antimicrobial activity of essential oils of cinnamon from China, Oregano, Thyme and Black Pepper White against strains of Salmonella enterica isolated from poultry and compare the techniques disk diffusion and microdilution. To assess the inhibitory effect of essential oils on the growth of micro-organisms used was a broth microdilution technique employing resazurin as an indicator of cell viability. Of the four oils tested, only black pepper showed no inhibitory effect on the growth of bacteria and tested oregano oil was the only one that showed activity against all samples with values of minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 8-1% (v / v). While the oils of thyme and cinnamon were effective in 91.3% (42/46) and 80.43% (37/46) of samples, respectively. MIC values for the peas ranged from 8-4% (v / v) and cinnamon were 8-2% (v / v). Regarding the techniques, one can observe that the microdilution broth showed better results than disk diffusion, although it is difficult to compare the results due to the peculiar characteristics of oils, as viscosity, volatility, and different affinity for water. Furthermore, the broth microdilution provides semi-quantitative values, while the disk diffusion method results are described qualitatively. Although no standardizations today to evaluate the inhibitory effect of oils on the growth of micro-organisms, with this study we can see that the oils, especially oregano, are a natural alternative for applications in industry for the reduction of Salmonella in products.

Keywords: salmonella, essential oils, antimicrobial activity

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABELA 1 – Principais constituintes dos óleos essenciais usados neste estudo 26

TABELA 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais (pimenta, canela, tomilho e orégano) e antimicrobianos (amoxicilina, ciprofloxacina e gentamicina) em isolados de *Salmonella* 29

ARTIGO 2

TABELA 1 – Suscetibilidade das amostras frente ao óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) 39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Gênero <i>Salmonella</i>	13
2.1.1 <i>Salmonella</i> sp. em aves	15
2.2 Óleos essenciais	18
3 ARTIGO 1 – Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de canela da China, orégano, pimenta preta e tomilho branco frente à amostras de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de aves	23
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
Micro-organismos	25
Reagente	26
Óleos essenciais	26
Antimicrobianos	27
Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	27
Método de cultura	27
Análise estatística	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
4 ARTIGO 2 – Comparação entre técnicas <i>in vitro</i> para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano frente a amostras de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de aves	35
ABSTRACT	35
INTRODUÇÃO	36
MATERIAIS E MÉTODOS	37
Micro-organismos	37
Reagente	37
Óleos essenciais	37

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	37
<i>Método de cultura</i>	<i>37</i>
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, no ano de 2011, atingiu uma produção de carne de frango de 13,058 milhões de toneladas, com um crescimento de 6,8% em relação ao ano de 2010. Com este desempenho, o país aproxima-se da China, o segundo maior produtor mundial. Nesse país a produção em 2011 somou 13,2 milhões de toneladas, abaixo apenas dos Estados Unidos, com 16,757 milhões de toneladas, conforme dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Do volume total de frangos produzidos pelo país, 69,8% foi destinado ao consumo interno e 30,2% para exportações. Os embarques de 3,942 milhões de toneladas em 2011 representaram um aumento de 3,2% em relação a 2010, em novo recorde histórico para a carne de frango, principal produto das exportações avícolas brasileiras (UBA, 2012).

Por tais razões, a sanidade avícola brasileira merece especial atenção para que seu padrão de qualidade não seja prejudicado. A intensificação da produção contribui para a produtividade e eficiência da indústria avícola, porém como consequência aumenta o risco de disseminação das doenças infecciosas e a necessidade de um maior controle de qualidade dos produtos (GONÇALVES, 2005). A presença de *Salmonella* compromete a saúde do plantel e a saúde pública (GONÇALVES, 2005), constituindo importante barreira para o comércio internacional de alimentos (SANTURIO et al., 2007) e causando significantes perdas econômicas (GAST, 2008).

Infecções de aves por *Salmonella* podem ser agrupadas em três categorias, infecções com dois sorovares não móveis, *Salmonella* Galinarum e *Salmonella* Pullorum, que são geralmente hospedeiros - específico de aves. Pulorose causada por *S. Pullorum* é uma doença sistêmica aguda (GAST, 2008). É mais comum em aves jovens, nas três primeiras semanas de vida (BERCHIERI JUNIOR & FREITAS NETO, 2009). Febre tifóide causada por *S. Galinarum* é uma doença sistêmica aguda ou crônica que afeta mais aves maduras (GAST, 2008).

A terceira categoria envolve um grupo de *Salmonella* móvel e não hospedeiro - específico, referidas coletivamente como salmonelas paratífóides (GAST, 2008). Os sorotipos mais comuns são *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, mas outros também foram identificados como, por exemplo, *S. Hadar*, *S. Senftenberg*, *S. Agona*, *S. Infantis* e *S. Heidelberg*. Além dos transtornos causados, em função do acometimento das aves, as samonelas paratíficas poderão, por meio de alimento de

origem avícola, provocar toxi-infecção em seres humanos (BERCHIERI JUNIOR & FREITAS NETO, 2009).

Segundo os dados epidemiológicos de doenças transmitidas por alimentos, do Ministério da Saúde, o agente etiológico mais prevalente em surtos são *Salmonella* spp. seguido de *S. aureus*. As regiões onde mais ocorrem os surtos são a região sul e sudeste do Brasil (BRASIL, 2011). Isso ocorre, porque nestes estados as notificações de surtos são mais efetivas que em outros estados. Há, portanto ainda a necessidade de novos métodos para reduzir ou eliminar patógenos transmitidos por alimentos, possibilitando uma combinação com medidas já existentes (BURT, 2004). Muitas especiarias e ervas tem sido vistas como uma potencial alternativa, devido aos seus óleos essenciais que possuem atividade antimicrobiana. Há considerável interesse no seu possível uso como aditivo alimentar, para retardar a deterioração dos alimentos ou para impedir o crescimento de micro-organismos patogênicos de origem alimentar. Entre estes patógenos, estão *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* (TASSAU et al., 2000)

As propriedades de óleos voláteis e seus constituintes à partir de uma ampla variedade de plantas têm sido avaliados e revistos (DORMAN & DEANS, 2000). Uma vez que, os óleos essenciais e seus componentes são conhecidos por serem ativos contra uma ampla variedade de micro-organismos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas (HELANDER et al., 1998). Em particular, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e extratos tem fornecido uma base para aplicações, incluindo conservação de alimentos crus e processados, farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais (HAMMER et al, 1999). O uso de óleos essenciais na União Europeia ocorre principalmente em alimentos (como aromatizantes), em perfumes (fragrâncias e pós-barbas) e na indústria farmacêutica (BURT, 2004).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é atribuída a um número pequeno de terpenóides e compostos fenólicos que, também, na forma pura têm mostrado exibir atividade antifúngica e antibacteriana (HELENDER et al., 1998). Investigações sobre atividade antimicrobiana, modo de ação e uso potencial de óleos voláteis de plantas têm recebido novo impulso (DORMAN & DEANS, 2000).

A concentração inibitória mínima (CIM) é citada por muitas pesquisas como uma medida de performance dos óleos essenciais (BURT, 2004). A determinação da CIM envolve um teste semi-quantitativo que dá um valor aproximado da menor concentração necessária para prevenir o crescimento bacteriano (LAMBERT & PEARSON, 2000). É qualitativo no sentido que a CIM é dependente de muitos fatores,

tais como temperatura de incubação, tamanho do inóculo e inóculo teste. Ainda, muitos destes fatores não têm sido ativamente pesquisados, mas, o método tem evoluído para reduzir suas influências em uma tentativa de racionalizar comparações entre os inibidores (LAMBERT, 2001).

A definição de diferentes CIM entre as publicações é outro obstáculo para as comparações entre estudos. Na maioria dos casos, a concentração bactericida mínima ou concentração bacteriostática (CBM) é determinada, mas em ambas os termos concordam intimamente com o CIM (BURT, 2004). A atual definição da concentração inibitória mínima é “a menor concentração que resulta na manutenção ou redução da viabilidade do inóculo” (LAMBERT & PEARSON, 2000).

A mais recente técnica disponível para determinação do CIM é baseada em microdiluição de agentes testados em caldo (LAMBERT et al., 2001). Ensaio de difusão, em que o agente é aplicado em poços ou discos de papel no centro de placas de ágar semeadas com o microrganismo teste, são inadequadas para óleos essenciais porque os componentes do óleo são difundidos através do ágar de acordo com sua afinidade com a água. Em testes com óleos essenciais, métodos de microdiluição em caldo, muitas vezes, empregam um indicador para determinar a viabilidade celular, na medida que a turbidez da emulsão óleo-água interfere na determinação do ponto-final dos testes (MANN & MARKHAM, 1998).

Quando a turbidez dos compostos do teste interfere com o teste, indicadores podem ser usados para a determinação do ponto-final (LAMBERT & PEARSON, 2000). Para fazer o crescimento bacteriano mais fácil para visualizar, timetil tetrazolio cloridrato (TTC) pode ser adicionado ao meio de crescimento. Embora o TTC seja um indicador de crescimento bacteriano, a mudança de coloração não correlaciona-se totalmente com a CIM (BURT, 2004). No ensaio proposto por Mann & Markham (1998), é usada resazurina, um indicador redox usado na indústria para avaliar a qualidade microbiológica do leite.

A resazurina possui um número de vantagens como indicador do ponto final de CIM. Resultados de redução facilmente identificam a mudança de coloração que ocorre na densidade celular medidas nos teste de CIM. Mais uma vantagem da resazurina sobre os demais corantes como TCC e diacetato de fluoresceína (FDA) é que a redução do corante não depende da absorção celular (MANN & MARKHAM, 1998).

Infecções com bactérias do gênero *Salmonella* são responsáveis por uma variedade de doenças agudas e crônicas em aves, causando perdas econômicas

significantes em muitos países e absorvendo um amplo investimento de recursos em pesquisas e esforços no controle (GAST, 2008). O surgimento de cepas resistente de *Salmonella spp.* é comum e este fato é agravado com a ampla utilização de antibióticos nas rações animais, principalmente como promotores de crescimento (CORTEZ et al., 2006). Além disso, segundo o Ministério da Saúde, de 1999 a 2010 foram notificados 6971 surtos de doenças transmitidas por alimentos, sendo que destes 46,6% tiveram o agente etiológico definido por critério laboratorial ou clínico-epidemiológico e destes a bactéria do gênero *Salmonella sp.* foi relacionada a 45,9% dos surtos.

Esse fato leva a indústria de alimentos a buscarem alternativas tecnológicas para reduzir ou eliminar *Salmonella enteritidis* de seus produtos (SILVA et al., 2010). E estudos *in vitro* têm demonstrado atividade antibacteriana dos óleos essenciais contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Echerichia coli* O157:H7, *Shigella dysenterica*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* em níveis entre 0.2 a 10 μ l ml⁻¹ (BURT, 2004).

Por este motivo, o estudo de óleos essenciais, como uma alternativa para a prevenção de patógenos torna-se importante, uma vez que o presente trabalho procura identificar a capacidade que os óleos de orégano, tomilho, canela e alecrim possuem para inibir o crescimento bacteriano.

A partir disto, os objetivos deste trabalho foram: *i.* avaliar a atividade antibacteriana de quatro óleos essenciais sobre amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves; *ii.* comparar duas técnicas *in vitro* usadas para determinar a ação inibitória do óleo de orégano sobre o crescimentos de micro-organismos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Salmonella*

Salmonella é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo pertencente à família Enterobacteriaceae (D'AOUST, 2000). São móveis por possuírem flagelos peritríqueos (exceto os sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*), oxidase negativa, catalase positiva, indol e teste de Voges-Proskauer negativo e vermelho de metila positiva. Utilizam citrato como única fonte de carbono e são capazes de descarboxilar lisina e ornitina. São produtoras de ácido sulfídrico (H₂S), não hidrolisam uréia e reduzem nitrato a nitrito. Geralmente fermentam arabinose, maltose, manitol, manose, ramanose, sorbitol, trealose e xilose, e não fermentam lactose (HOLT et al., 1994). Podem crescer em temperatura de 7° a 45°C, em pH variando de 4,5 a 9, sobrevivendo também ao congelamento e desidratação por longos períodos, quando em presença de matéria orgânica (D'AOUST, 1997; GRIFFITH et al., 2006). Porém, seu crescimento ótimo ocorre em temperatura de 35-37°C e em pH 6,5-7,5 (HOLT et al., 1994).

As bactérias do gênero *Salmonella* multiplicam-se em meios comuns com nutrientes. As colônias em ágar sangue medem 1 a 3 mm após incubadas durante 24 horas a 37°C, variando muito na forma, podendo ser lisas, circulares, convexas, achatadas, bordos denteados ou não. Não são hemolíticas (OLIVEIRA, 2012). Os meios seletivos de enriquecimento mais usados são caldo Selenito-cistina, que contém cistina para estimular o crescimento das salmonellas; caldo Tetrionato Muller- Kauffman, contendo verde brilhante, tetrionato e bile; e caldo Rappaport- Vassiliadis (RV), que contém verde malaquita, cloreto de magnésio e um pH ligeiramente reduzido como fator seletivo (ADAMS & MOSS, 2008). Os meios seletivos sólidos mais usados são o ágar Deoxicolato Citrato Lactose Sacarose (DCLS), ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BV/BPLS), ágar SS (*Salmonella-Shigella*) e ágar Xilose Lisina Deoxicolato (XLD). No ágar MacConkey, as colônias são incolores (não fermentam lactose) em 24 horas de incubação a 37°C (OLIVEIRA, 2012).

No gênero *Salmonella* estão incluídos mais de 2.500 sorotipos pertencentes a duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houstenae* e *indica*), que incluem vários sorotipos ou sorovares (BERCHIERI JUNIOR & FREITAS NETO, 2009).

Na rotina, utiliza-se um sistema de identificação denominado esquema de Kaufmann & White, que divide as salmonelas em sorotipos (FERREIRA & CAMPOS, 2008), baseado na caracterização dos antígenos somáticos (O), representados por lipopolissacarídeos da parede celular, e flagelar (H), de teor protéico. Nos sorovares *S. Thyphi*, *S. Paratyphi* e *S. Dublin* há ainda o antígeno capsular único (Vi), que contribui para a identificação e virulência dos mesmos (D'AOUST, 1994).

Os antígenos O são designados por números arábicos e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella*. Por esta razão, o mesmo antígeno O é comum a vários sorotipos de *Salmonella*. Já os antígenos flagelares podem ocorrer em duas fases, denominadas 1 e 2 e são designados pelas letras minúsculas do alfabeto (fase 1) e por números arábicos (fase 2), a letra z é utilizada como expoentes numéricos (FERREIRA & CAMPOS, 2008).

As salmonelas imóveis, sorotipos Pullorum e Gallinarum, podem ser diferenciadas dos demais sorovares de *Salmonella enterica* pela ausência do antígeno flagelar (H) detectado com antissoro poli H ou pelo resultado negativo no teste de motilidade (BACK, 2010).

Para a saúde das aves e para a saúde pública, os sorogrupos somáticos mais importantes são B e D. No grupo D estão incluídos os sorovares Pullorum, Gallinarum e Enteritidis, no sorogrupo B, estão os sorovares Typhimurium, Heidelberg e Agona, além de muitos outros. Do aspecto de saúde pública, todos os sorotipos são considerados potencialmente patogênicos para o homem. A sorotipificação de toda *Salmonella enterica* subespécie I é importante para a identificação de amostras mais patogênicas e para avaliações epidemiológicas (BACK, 2010).

A maioria dos incidentes de salmonelose em humanos e animais domésticos são causadas por relativamente poucos sorovares e estes podem ser subdivididos em três grupos com base na prevalência do hospedeiro (WALLIS, 2006). No grupo 1 estão incluídas a *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* que causam respectivamente tifo aviário e pulorose. Estes dois sorotipos são imóveis, têm as aves, e principalmente galinhas e perus, como hospedeiros específicos e são considerados de alta patogenicidade. No grupo 2 incluem-se as infecções causadas por *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, móveis, do tipo paratíficas, excluindo *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. As salmonelas do grupo 2 apresentam em torno de 1.500 sorotipos e podem ser encontradas nas aves e mamíferos clinicamente saudáveis. No grupo 3, da *Salmonella enterica* subespécie *enterica* estão os sorovares Enteritidis e Typhimurium. São bactérias móveis que

eventualmente podem causar doença clínica em aves jovens e estão relacionadas com a grande maioria de casos de toxi-infecções alimentares por *Salmonella* em humanos (BACK, 2010). Em humanos as doenças mais comuns causadas por salmonelas são a febre tifóide e as gastroenterites (MADIGAN et al., 2010).

2.1.1 *Salmonella* sp. em aves

Doença de Pullorum, causada por *S. Pullorum*, é rara na América do Norte, mas não no resto do mundo. A doença foi quase eliminada nos Estados Unidos devido a um programa de monitoramento dos plantéis (HIRSH, 2004). Atualmente, no Brasil, a doença está erradicada em praticamente 100% dos plantéis de avós e matrizes de frango de corte, de postura comercial e de perus. Alguns casos de pulorose ocorreram em aves de fundo de quintal e em galinhas de postura com programas de biosseguridade deficientes, principalmente em granjas de idades múltiplas (BACK, 2010).

A pulorose é uma enfermidade que acomete aves em qualquer idade, mas é mais comum em aves jovens, nas três primeiras semanas de vida (BERCHIERI JUNIOR & FEITAS NETO, 2009). Também denominada anteriormente de diarreia branca, é uma doença bacteriana das aves que causa septicemia, diarreia esbranquiçada, pintos refugos e alta mortalidade de aves jovens. As aves adultas podem sofrer a infecção sem apresentar sinais clínicos (BACK, 2010).

Salmonella Pullorum é uma bactéria bastante específica das aves, em particular das galinhas e perus. Não infecta mamíferos, portanto não é considerada importante em termos de saúde pública. Devido a sua importância para as aves, é uma enfermidade de notificação e sacrifício obrigatório no Brasil e na maioria dos países com avicultura industrial (BACK, 2010). O maior custo econômico da pulorose ao longo dos últimos 20 anos tem sido aqueles envolvidos em testes para certificar que os plantéis de aves e perus sejam livres da infecção (SHIVAPRASAD & BARROW, 2008).

Tifo aviário, causado por *S. Gallinarum*, é uma infecção bacteriana aguda que acomete principalmente aves adultas, caracterizada por diarreia, hepatomegalia, esplénomegalia e mortalidade. Muitas das características da doença e do agente são semelhantes à pulorose (BACK, 2010; HIRSH, 2004). É uma enfermidade de distribuição mundial, que tem estado sob controle em países da Europa e da América do Norte. O tifo aviário tem sido descrito em países cuja avicultura industrial está em

desenvolvimento e naqueles onde se encontram aves criadas livremente (BERCHIERI JUNIOR & FEITAS NETO, 2009).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), dentro do Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), tem um programa de certificação de aves de corte reprodutoras. Dentro deste programa, as granjas são certificadas como livres de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* e livres ou controladas para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. As condições e os requisitos de certificação estão publicados na instrução normativa/ DAS nº 78 de 3 de novembro de 2003 (BRASIL, 2003).

A legislação prevê que a monitoria dos lotes deve ser acompanhada por fiscais ou veterinários habilitados e credenciados pelo Ministério e as análises realizadas em laboratórios credenciados pelo MAPA. Em caso de confirmação de pulorose ou tifo aviário, o lote deve ser sacrificado. Matrizes infectadas com *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* devem ser tratadas, mantidas em quarentenário e retestadas. Caso negativas, recebem o certificado de controladas para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Quando se trata de avós, o sacrifício é compulsório para qualquer uma das quatro salmonelas (BRASIL, 2003).

Paratifo aviário é o termo usado para definir à infecção causada por bactérias do gênero *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (BACK, 2010). Encontrado em todo o mundo, esse organismo pode infectar uma ampla variedade de hospedeiros (GAST, 2008). O sistema intensivo de criação adotado em avicultura industrial favorece a introdução, instalação, permanência e disseminação dessas salmonelas. Desse modo, a infecção paratífica aviária tornou-se um problema para os avicultores, embora muitas vezes tenha passado despercebida (BERCHIERI JUNIOR & FEITAS NETO, 2009). A infecção paratífóide tem sido adicionalmente identificada como importante agente de doença transmitida por alimento ao homem. Controle de infecção paratífóide em plantéis de aves tem assim tornado-se um importante objetivo para ambas as perspectivas econômicas e de saúde pública (GAST, 2008).

A infecção por salmonelas paratíficas, em aves adultas, raramente produz sinais clínicos. Quando aves jovens sofrem a infecção, as chances de manifestação de doença clínica são maiores (BACK, 2010). A contaminação de ovos com *Salmonella* pode levar à um alto nível de mortalidade embrionária e à rápida morte de aves recém-nascidas antes dos sinais clínicos serem observados. Mortalidade e morbidade podem ser altas durante as duas primeiras semanas de vida, com significativa perda de peso ou retardo

no crescimento (GAST, 2008). Os sinais clínicos são raramente observados em aves com mais de 14 dias de idade (BERCHIERI JUNIOR & FEITAS NETO, 2009).

Sinais severos de infecção paratífica em aves jovens são geralmente similares aqueles observados em conexão com outra infecção causada por *Salmonella* (Pulorose e Febre tifóide) ou por outra bactéria que cause septicemia aguda. Embora doença clínica não seja normalmente associada com infecção paratífica em aves adultas, algumas cepas de *S. Enteritidis* têm sido encontradas como causa de anorexia, diarreia e redução na produção de ovos em galinhas poedeiras experimentalmente infectadas (GAST, 2008).

Em aves jovens, quando ocorre septicemia, pode-se observar fígado, baço e rins hipertrofiados e congestos. Caso a infecção ocorra imediatamente após o nascimento ou durante a incubação (via vertical), a mortalidade geralmente ocorre até as três semanas de vida e é mais elevada em patos e perus do que em galinhas. A partir da quarta semana, os sinais clínicos e a mortalidade tendem a desaparecer. Os principais sinais clínicos são: sonolência, diarreia, desidratação, redução de consumo, desuniformidade, empastamento de cloaca, piados e amontoamento próximos a fontes de calor (BACK, 2010).

Doenças humanas resultante do consumo de produtos avícolas contaminados por *Salmonella* pode ser caro para a indústria avícola, para o governo e para os indivíduos afetados (GAST, 2008). Infecções em humanos podem variar de uma gastroenterite limitada, geralmente associada à *Salmonella* não-tifóide, à febre tifóide com complicações, como a úlcera intestinal (COOKE & WAIN, 2006).

De acordo com o Centro para Controle e Prevenção de Doença dos Estados Unidos ou *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), em 2004, nos EUA foram isolados 35.661 salmonelas de seres humanos, desse total 19,2% corresponderam à *S. Typhimurium* e 14,1% à *S. Enteritidis*, os dois sorotipos mais isolados. Os dados do CDC demonstram que ao longo de dez anos a frequência de isolados de *S. Enteritidis* em pessoas caiu sensivelmente, passando de 9.866 casos (26,3% do total) em 1994, para 5.012 (14,1%) em 2004 (BERCHIERI JUNIOR & FEITAS NETO, 2009).

Segundo os dados epidemiológicos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) – período de 2000 a 2011 - da Secretaria de Vigilância de Saúde, as regiões brasileiras com maior notificação de surtos alimentares foram: a região sul com 42,1%, sudeste com 37,3% e nordeste com 12% (BRASIL, 2011).

De acordo com o Ministério da Saúde, de 1999 a 2008 foram notificados 6.062 surtos de doenças transmitidas por alimentos e, destes, o agente etiológico mais

frequente, num total de 42,9% dos surtos, foi *Salmonella* spp (BRASIL, 2008). Esse fato leva às indústrias de alimentos a buscarem alternativas tecnológicas para reduzir ou eliminar *S. Enteritidis* de seus produtos. O uso de antimicrobianos naturais, como temperos, condimentos e extratos vegetais, tende a ser uma alternativa interessante (SILVA et al., 2010).

2.2 Óleos essenciais

Doenças infecciosas que afetam o trato digestivo de suínos e aves têm tradicionalmente sido, uma das principais causas de perdas econômicas. O aumento dos plantéis, o sistema de produção intensivo e a alta demanda produtiva, a que estes animais estão submetidos, levaram à diminuição da resistência para doenças e a habilidade para se adaptar, aumentando o risco de infecções. Confrontados com essa situação, os sistemas de produção têm sido amplamente baseados no controle de doenças infecciosas através do uso de antibióticos como promotores de crescimento com capacidade para controlar certas bactérias intestinais prejudiciais para o metabolismo animal (PEÑALVER et al., 2005)

Após o uso da maioria dos antimicrobianos como promotores de crescimento, e os aditivos alimentares haverem sido proibidos pela União Europeia devido à resistência cruzadas e resíduos teciduais, cientistas têm pesquisado alternativas para os antimicrobianos (ERTAS et al., 2005). Além disso, a regulamentação de criação de aves orgânicas limita o uso de antibióticos, permitindo seu uso apenas para tratamento de animais com doença clínica (GRIGGS & JACOB, 2005).

O uso de antimicrobianos naturais, como temperos, condimentos e extratos vegetais, tende a ser uma alternativa interessante para reduzir ou eliminar patógenos transmitidos por alimentos, possibilitando uma combinação com métodos já existentes (BURT, 2004; SILVA et al. 2010).

Além disso, devido ao aumento de cepas bacterianas resistentes, houve um aumento no número de publicações sobre atividade antibacteriana de extrato de plantas (ELOFF, 1998). Muitos autores têm pesquisado essa atividade tanto em óleos essenciais como em seus compostos frente a diversas bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas (GRIGGS & JACOB, 2005; PEÑALVER et al., 2005; HELANDER et al., 1998; SILVA et al., 2010; TASSOU et al., 2000; WALSH et al., 2003).

Os óleos de plantas e seus extratos têm sido usados com diversos fins por milhares de anos, seja como aromatizantes, conservantes ou como plantas medicinais (DORMAN & DEANS, 2000; HAMMER, et al., 1999). As propriedades antimicrobianas de substâncias e óleos essenciais que as plantas contêm como produtos de seu metabolismo secundário têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram confirmada cientificamente apenas recentemente (DUARTE, 2006).

Os óleos essenciais e seus compostos podem ser obtidos a partir de diferentes partes da planta como, por exemplo, das flores, sementes, folhas, brotos, caule, galhos, casca, frutas e raízes (BURT, 2004). E o teor de óleo essencial é altamente variável, dependendo de que parte da planta é obtido, da colheita, a estação e o método de cultivo (PEÑALVER et al., 2005). Os métodos de extração dos óleos são variáveis, mas o mais usado é a destilação a vapor ou hidrodestilação (BURT, 2004).

A composição dos óleos essenciais é bastante variável, mas compreende cerca de 50% de monoterpenos oxigenados e 50% de terpenos hidrocarbonados. Noventa e sete compostos já foram estudados (MANN & MARKHAM, 1998). Considerando o amplo número de compostos de diferentes grupos químicos presentes nos óleos, é mais provável que sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um específico mecanismo, mas que exista vários alvos na célula (BURT, 2004).

Embora o mecanismo de ação dos óleos ainda não tenha sido estudado em detalhes, acredita-se, por eles possuírem característica de hidrofobicidade, que eles interajam com a camada de lipídeo da membrana celular e com a mitocôndria, tornando-os mais permeáveis, podendo ocorrer vazamento de íons ou outras substâncias contidas nas células, o que levaria à sua morte (BURT, 2004).

A eficácia antimicrobiana de um composto é geralmente descrita em termos de concentração inibitória mínima, a concentração mais baixa do composto capaz de inibir o crescimento do organismo estudado (MANN & MARKHAM, 1998). Vários métodos estão disponíveis para a detecção da sua atividade antimicrobiana e uma vez que nem todos eles são baseados nos mesmos princípios, os resultados obtidos são influenciados não apenas pelo método selecionado, mas também pelos micro-organismos utilizados, pelo método de extração ou o grau de solubilidade de cada composto testado (KLANCNIK, et al., 2010).

Os métodos mais comumente usados são os de difusão em disco, difusão utilizando cavidades feitas no ágar, diluição em ágar e diluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados obtidos em cada

um destes testes podem diferir devido à fatores como as variações entre os testes (NASCIMENTO et al., 2007), o volume do inóculo, fase de crescimento, a composição do meio de cultura, pH, temperatura e tempo de inoculação, exposição do micro-organismo ao óleo, a solubilidade do óleos e seus componentes e o uso e a quantidade de emulsificador (BURT, 2004; RIOS et al., 1988; NASCIMENTO et al., 2007).

Os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards International* (CLSI) e desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos. Nos testes de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, a metodologia proposta pelo CLSI não pode ser seguida a risca, devido às propriedades químicas que eles apresentam. Desta forma, feita modificações, esses métodos podem ser usados em algumas situações (NASCIMENTO et al., 2007).

Muitos autores usam o ensaio de ágar difusão para determinar a atividade antibacteriana dos extratos. A técnica funciona bem com inibidor definido, mas quando os extratos examinados contêm componentes desconhecidos, existem problemas de leitura dos resultados para falso positivo ou falso negativo (ELOFF, 1998).

Os métodos de difusão são frequentemente usados na pesquisa, mas são modelos de baixa credibilidade para amostras que apresentam dificuldade para difundir no meio, não existindo relação entre o poder de difusão e a atividade antibacteriana (RIOS et al., 1988). Além disso, as técnicas de difusão não distinguem os efeitos bactericidas e bacteriostáticos e a concentração inibitória mínima não pode ser determinada (DEVIENNE & RADDI, 2002).

Outro problema observado quando se utiliza técnicas de difusão em ágar, é a difusão irregular dos compostos lipófilos dos óleos resultando em concentrações desiguais dos óleos no ágar, causando a formação de regiões com atividade antibacteriana variável e, finalmente, a determinação de um número de bactérias viáveis remanescentes, após a adição do óleo (NASCIMENTO et al., 2007).

Atualmente, o método de diluição é usado para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um micro-organismo. Os procedimentos para determinar a atividade inibitória podem ser realizados tanto pelas técnicas de diluição em caldo ou em ágar. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um micro-organismo é considerada como a CIM (ALVES et al., 2008). Ambos os métodos são baseados na dispersão da amostra do meio de cultura seletivo

para o micro-organismo. Estes métodos são os melhores, quando é necessária para o ensaio a solubilidade em água ou amostras lipofílicas e para determinar a CIM dos compostos (RIOS et al., 1988).

O método de microdiluição em caldo pode ser usado por uma ampla variedade de micro-organismos, não é caro e apresenta resultados reprodutíveis (DEVIIENNE & RADDI, 2002). Fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos micro-organismos. Sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de testes de materiais clínicos (OSTROSKY et al., 2008).

Visando melhorar a qualidade dos procedimentos com óleos essenciais, tornou-se comum a utilização de solventes, detergentes, ou agentes emulsificadores, a exemplo de Tween 20, Tween 80, DMSO e etanol, para facilitar a dispersão dos mesmos através do meio de cultura (NASCIMENTO et al., 2007). Estes emulsificantes são usados para assegurar que o micro-organismo entre em contato com o composto testado durante todo o ensaio. Tais agentes, entretanto, podem causar mudanças nas propriedades físico-químicas dos ensaios resultando ou no aprimoramento ou na redução da atividade antimicrobiana (MANN & MARKHAM, 1997).

Um outro método de microdiluição para determinar a concentração inibitória mínima de óleos e seus compostos usa um indicador redução de resazurina como um indicador visual do CIM. Os resultados compararam favoravelmente com aqueles obtidos por contagem viável e mensuração de densidade óptica e o método é mais sensível que o método de diluição em ágar (BURT, 2004).

O uso da resazurina em testes de microdiluição permite a detecção de crescimento microbiano em volumes extremamente pequenos de solução em microplacas sem o uso de um espectrofotômetro (SARKER et al., 2007).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (BARREIRO & FRAGA, 1999). É importante destacar, que apesar de toda a importância atribuída as plantas, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOULÉ, 1991; SIMÕES, 1999).

A canela da China (*cinnamomun cassia*) pertence à família *Lauraceae*, é uma árvore originária do sul da China e do Vietnã, muito similar a canela verdadeira (*cinnamomun zeylanicum*) que usualmente cresce no sul e sudeste da Ásia. É uma das várias espécies de *cinnamomun* que são usadas principalmente por sua casca aromática como condimento (RAVINDRAN et al., 2004). Tradicionalmente usada na medicina

chinesa como remédio natural para tratar tosse e resfriado (CUNHA et al., 2006). Devido à sua ação antibacteriana, muitos autores vêm pesquisando seu efeito inibitório sobre micro-organismos (LIMA ET AL., 2006; ERNANDES & GARCIA-CRUZ, 2007; SANTURIO ET AL., 2007; FEI ET AL., 2011).

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), arbusto trepador e perene da família *Piperaceae*, também conhecida como família da pimenteira, é uma das espécies cultivadas mais antigas do mundo (MARTIN & CREGORY, 1962; ZEVEN, 1974). Trata-se de uma das mais numerosas famílias das Dicotiledôneas, representada nas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios. Existem cinco gêneros, representados por cerca de 1400 espécies. São eles: *Ottonia*, *Piper*, *Peperomia*, *Pothomorphe* e *Sarcorrhachis* (REITZ, 1984).

A maior parte dos estudos realizados com representantes desta família refere-se ao gênero *Piper*, provavelmente por ser este o mais promissor na produção de óleos essenciais (RORIG & POSER, 1991).

O grupo do orégano (*Oreganum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), os quais são ervas da família *Labiatae*, tem sido usado como agentes aromatizantes em vários produtos alimentícios. Os óleos essenciais de ambas as ervas possuem considerável propriedade antibacteriana devido primariamente a seu conteúdo de carvacrol e timol (BURT, 2004; GOVARIS et al.; 2011). A atividade antibacteriana dos óleos essenciais de orégano e tomilho contra patógenos de origem alimentar tem sido explorada extensivamente em muitos estudos *in vitro* (PREUSS ET AL.; 2005). Na literatura existem muitos estudos relatando a composição química e propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de várias espécies de orégano, e suas aplicações em várias preparações comerciais, como antimicrobiano e antioxidante (BAYDAR et al., 2004; KULISIC et al., 2004).

3 ARTIGO 1

Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de canela da China, orégano, pimenta preta e tomilho branco frente à amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves¹

In vitro antimicrobial activity of essential oils of cinnamon, oregano, thyme and black pepper against strains of Salmonella enterica isolated from poultry

Laviniki, V.¹; Machado, G.²; Corbellini, L.G²; Nascimento, V.P.¹

¹ Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

²Laboratório de Epidemiologia (EPILAB), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

ABSTRACT

*The aim of this study was to evaluate the in vitro antimicrobial activity of essential oils of cinnamon (*Cinnamomum cassia*), Oregano (*Origanum vulgare*), Black Pepper (*Peper nigrum*) and Thyme (*Thymus vulgaris*) against forty-five clinical isolates of *Salmonella enterica* poultry and a standard strain *E. coli* ATCC 25922. Amoxicillin, gentamicin and ciprofloxacin were used as positive control standard and to assess the susceptibility of the tested samples. It was a method of microdilution employing resazurin as a marker of cell viability to test the effect of oils on the isolates. The four oils were diluted at concentrations of 8-0, 003% (v / v) in a sterile solution of agar (0.15%). The essential oil of oregano exhibited inhibitory effect on all the forty-six pathogens and the value of minimum inhibitory concentration (MIC) ranging between 8-1% (v / v). The oils of thyme and cinnamon had also inhibitory effect on the growth of bacteria and MIC values ranged from 8 to 4% and 8-2% respectively. Black pepper had no inhibitory effect on the isolates.*

Keywords: antimicrobial activity, essential oils, salmonella.

¹Artigo a ser submetido à comissão editorial da revista: "Revista Brasileira de Ciência Avícola"

INTRODUÇÃO

Infeções por *Salmonella* aviária são importantes causas de doença clínica em aves e também como fonte de transmissão de doença alimentar para humanos (GAST, 2008). Além disso, a presença de *Salmonella* constitui importante barreira para o comércio internacional de alimentos (SANTURIO et al., 2007), causando significantes perdas econômicas (GAST, 2008). O uso de antimicrobianos tem contribuído para a otimização da produção animal. Porém, esta prática desencadeia pressões seletivas que potencializam a emergência e a distribuição de cepas de *Salmonella* resistentes em carnes e outros produtos de origem animal, sendo as aves o principal reservatório de *Salmonella* resistente (TESSI et al., 1997). Como a maior parte das infecções humanas por *Salmonella* é decorrente da ingestão de alimentos de origem animal contaminados, o emprego de agentes antimicrobianos em animais destinados à alimentação humana é causa provável da emergência de cepas de *Salmonella* resistentes (ANGULO et al., 1999; SILVA & DUARTE, 2002). Por tais razões, muitos pesquisadores têm estudado as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais e seus compostos (DEANS & RITCHIE, 1987; HELANDER et al., 1998; HAMMER et al., 1999; DORMAN & DEANS, 2000; ARAÚJO et al., 2004; PREUSS et al., 2005)

Os óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos, que são obtidos a partir de várias partes da planta, como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, madeiras, frutos e raízes por destilação a vapor. São uma fonte rica em aromas e usados na conservação de alimentos e aromaterapia. Seu efeito curativo é conhecido desde a antiguidade (DORMAN & DEANS, 2000; HAMMER et al., 1999). Eles possuem múltipla ação antimicrobiana, como por exemplo, antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, antiviral, inseticida e propriedades antioxidantes (BURT, 2004; RANA et al., 2011).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais ainda não é bem compreendido (BURT, 2004; LAMBERT et al., 2001). Tem sido relatado que a atividade antibacteriana deriva de terpenos e compostos fenólicos presentes nos óleos (BURT, 2004). Alguns dos principais grupos encontrados nos óleos essenciais incluem álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e terpenos. E cada grupo consiste em numerosos compostos. Frequentemente, todos são necessários para a atividade antibacteriana e os óleos não possuem um alvo específico na célula. Assim o mecanismo dos óleos essenciais não pode ser atribuído a um mecanismo específico, mas podem existir

diversos alvos na célula. A maioria dos alvos da atividade antimicrobiana para óleos são a membrana celular e alvos interligados com a membrana (KACÁNIOVÁ et al., 2012).

Os óleos essenciais e seus compostos são conhecidos por ser ativo contra uma ampla variedade de micro-organismos, incluindo bactérias Gram-negativas (HELANDER et al., 1998). Özkalp et al. (2010), estudaram o atividade antibacteriana do óleo essencial de orégano e ampicilina em *Escheria coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* meticilina resistente e observaram que houve inibição do crescimento de todos os micro-organismos testados. Muitas pesquisas têm observado o efeito inibitório dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomun cassia*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e pimenta preta (*Peper nigrum*) em bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e leveduras (SANTURIO et al., 2007; RUSENOVA & PARVANOV, 2009; POZZATTI et al., 2006; PENÁLVER et al., 2005; FEI et al., 2011; TASSOU et al., 2000; HULÁNKOVÁ & BORILOVÁ, 2011).

Este estudo teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Canela da China (*Cinnamomun cassia*), Orégano (*Origanum vulgare*), Pimenta Preta (*Peper nigrum*) e Tomilho Branco (*Thymus vulgaris*) frente às amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismos

Foram utilizados 44 isolados de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovares Enteritidis, Heidelberg, Hadar, Thyphimurium, Gallinarum e Agona, proveniente de produtos avícolas, estocadas no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, durante os anos de 1996 a 2011, uma cepa de *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 e uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, que serviu como controle positivo. Os micro-organismos estavam estocados à – 20°C em caldo infusão cérebro e coração (BHI) adicionado de glicerol 20%. As amostras foram repicadas em ágar Triptona de soja (TSA) e incubadas por 24 horas a 37°C.

Reagente

A solução de resazurina (Vetek) foi preparada em 0,01% (v/v) em água destilada estéril.

Óleos essenciais

Quatro diferentes óleos (*Cinnamomun cassia*, *Piper nigrum*, *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare*) foram obtidos comercialmente em frasco âmbar, lacrados, com volume de 10 ml e fabricados por Laszlo Aromaterapia (www.lazlo.ind.br, Belo Horizonte, Brasil). A identificação química dos principais constituintes foi fornecida pela empresa através da análise por cromatografia gasosa de alta resolução, os quais estão descritos na Tabela 1. Cada óleo essencial foi preparado diluído em uma solução de ágar estéril (0,15%) em concentrações que variaram de 8% a 0,03%.

TABELA 1 - Principais constituintes dos óleos essenciais usados neste estudo.

Nome botânico	Família	Nome popular	Composição (%)
<i>Cinnamomun cassia</i>	Laureceae	Canela da China	Benzoato de benzila 5-8% Aldeído cinâmico 80-85% Eugenol < 1% α – pineno 1-2 % ρ – cimeno < 1% Canfeno < 1% β – cariofileno < 1%
<i>Piper nigrum</i>	Piperaceae	Pimenta Negra	Pimeno 25-30% Cariofileno 25-30% Linoleno 7-10% Careno 5% Sabileno 6-8% Copaeno 1-2% c – neronidol 5-6% Eleneno 2-3% α – hunuleno 2-3%
<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	Tomilho branco	ρ - cimeno 37-40% Linalol 3-4% Timol 45-48% Miceno 1-2% Linoleno < 1% 1,8 – cineol 1-2% Canfeno 1% ? – pineno 4-5%
<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	Orégano	Carvacrol 65-69% ρ - cimeno 12-14% ? terpineno 7% Linalol < 1% Miceno 1-2% Pinemo 2-3% Omiceno < 2% ? – cariofileno < 2% ? – terpineno 1%

Antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos testados foram: amoxicilina, 256 a 0, 5 µg/ml; cirpofloxacina, 8 a 0, 003 µg/ml e gentamicina 32 a 0, 125 µg/ml (Sigma - pó) como padrões positivos de referência e para definir o perfil de suscetibilidade antimicrobiana das amostras estudadas. A obtenção e interpretação dos resultados foi feita com base no documento M31-A3 do CLSI (2008).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Método de cultura: tubos contendo caldo Nutriente (NB, Himedia) foram inoculados com cada micro-organismo e incubados durante 24 horas a 37°C. Primeiramente, foi determinada a concentração de células necessárias para causar redução da resazurina dentro de 2 horas. Uma diluição seriada de cada cultura foi preparada em caldo Nutriente. Dispensou-se 1,7 ml do inóculo em tubos contendo 20 µl de solução de ágar (0,15% v/v) e 10 µl de solução de resazurina que foram incubados por 2 horas a 37°C. A diluição apropriada de trabalho foi àquela capaz de reduzir a resazurina. Resazurina é um indicador redox que na forma oxidada apresenta a coloração azul e na forma reduzida coloração roxo-rósea.

Os isolados foram incubados em ágar Triptona de soja (TSA, Oxoid) por 24 horas a 37°C. A partir desta cultura, preparou-se uma suspensão bacteriana, em solução salina, equivalente a o padrão 0,5 da escala McFarland e diluída em caldo Müller-Hinton (MHB, Himedia) para obtenção aproximada de um ciclo de log menor que o necessário para reduzir a resazurina. Para o teste utilizou-se uma placa estéril de 96 poços onde cada micro-organismo foi testado em duplicata. Na coluna 1 a 9, adicionou-se 170µl de inóculo e 20µl do óleo diluído; na coluna 10, 170µl do inóculo e 20µl de solução de ágar estéril 0,15% (controle positivo); colunas 11 e 12, 170µl de MHB e 20µl de solução de ágar estéril 0,15% (controles negativos). As placas foram vedadas com parafilme e incubadas a 37°C por 24 horas. Após adicionou-se 10µl de solução de resazurina 0,01% nas colunas 1 a 11 e 10µl de água destilada estéril na coluna 12, que foram novamente incubadas a 37°C por 2 horas, decorrido este período se realizou a leitura visual da mudança de cor, com a maior diluição remanescente azul indicando a CIM. O conteúdo dos poços de coloração azul foi dispensado em placas de ágar Xilose Lisina Dextrose (XLD, Oxoid) incubados por 24 horas a 37°C. A concentração bactericida mínima Placas que não apresentaram crescimento foram consideradas como

a concentração inibitória mínima/concentração bactericida mínima (MANN & MARKHAM, 1998).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram organizados em planilhas do Microsoft Excel® 2010 e analisadas no programa R (pacote Epicalc). Realizou-se análise descritiva dos dados e realizou-se também análise estatística inferencial com testes não paramétricos para dados quantitativos dispostos nominal ou categoricamente – testes de Wilcoxon-rank, Kruskal-Wallis. Utilizou-se com o nível α de significância valores iguais ou menores a 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados, a partir de estudos *in vitro*, têm mostrado que os óleos essenciais inibem o crescimento bacteriano e fúngico, mas sua efetividade é variável (RUSENOVA & PARVANOV, 2009). Sendo difícil comparar os resultados obtidos neste estudo com estudos já publicados, pois existe uma ampla variação nas metodologias empregadas para avaliar o efeito inibitório dos óleos essenciais, incluindo a exposição do micro-organismo ao óleo, a quantidade de agente emulsificante, a solubilidade do óleo e tipos de fonte de micro-organismos utilizados no ensaio. Observou-se em nosso estudo que o orégano apresentou atividade inibitória no crescimento de todas as bactérias testadas com valores de CIM de 8-1% (v/v), enquanto que o tomilho e canela exibiram efeito inibitório em 91,3% (42/46) e 80,43% (37/46) das amostras, respectivamente. Os valores de CIM para o tomilho variou de 8-4% (v/v) e canela variou de 8-2% (v/v). O óleo de pimenta negra não teve efeito sobre nenhuma dos isolados testados. Todos foram também sensíveis aos antimicrobianos amoxicilina, ciprofloxacina e gentamicina. Os resultados estão descritos na Tabela 2.

Não houve diferença estatística quando se avaliou o efeito dos óleos entre si sobre os isolados estudados ($p = 0.9845$). O óleo essencial de canela não apresentou diferença estatística quando se avaliou o efeito sobre os diferentes sorovares de *Salmonella* ($p = 0.9166$), enquanto que os óleos de orégano e tomilho apresentaram diferença estatística, com valores de $p = 0.04322$ e $p = 0.0505$, respectivamente.

TABELA 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) de óleos essenciais (pimenta, canela, tomilho e orégano) e antimicrobianos (amoxicilina, ciprofloxacina e gentamicina) em isolados de *Salmonella*.

Isolados	Concentração Inibitória Mínima (CIM)																					
	% (v/v)												µg/ml									
	Pimenta (0,003 - 8)			Canela (0,003 - 8)			Tomilho (0,003- 8)			Orégano (0,003 - 8)			Amoxicilina (0,5 - 256)			Ciprofloxacina (0,003 - 8)			Gentamicina (0,125 - 32)			
NI	8%	4%	2%	NI	8%	4%	2%	NI	8%	4%	2%	1%	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
S. Enteritidis n = 10	10	3	5		2	5	4		1	3	7		10			10			10			
S. Heidelberg n = 10	10	1	7	1	1		8		2		7	2	1	10			10			10		
S. Hadar n = 10			2	5		3		10			3	6	1		10			10			10	
S. Typhimurium n = 6	6	2	3		1		6			1	5			6			6			6		
S. Gallinarum n = 5	5	1	3		1		5				3	2		5			5			5		
S. Agona n = 3	3	1	2				2		1	1	1	1		3			3			3		
S. Enteritidis ATCC 13076 n = 1	1	1					1							1			1			1		
<i>E. coli</i> ATCC 25923 n = 1	1				1		1					1		1			1			1		

n igual ao número de isolados; NI: não inibiu o crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações testadas; S isolado sensível; I isolado intermediário; R isolado resistente.

Irkin & Korukloughlu (2009), observaram que o óleo de orégano foi o mais eficaz, e apenas *C. oloephila* não foi sensível a este óleo. O óleo de tomilho teve efeito inibitório sobre todos os micro-organismos, e principalmente, para as leveduras testadas. E o óleo de pimenta preta não apresentou efeito contra as bactérias testadas.

Lopéz et al. (2007), observaram que o óleo essencial de tomilho foi o menos efetivo contra as bactérias testada, enquanto que o óleo essencial de orégano foi o mais efetivo. Já o óleo de canela foi mais efetivo contra cepas fúngicas.

O óleo essencial de orégano foi inibitório para o crescimento de vários micro-organismos testados por Özkalp et al. (2010). *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus* foram os mais susceptíveis ao óleo de orégano. Observou-se também que mesmo em concentrações baixas do óleo foram suficiente para prevenir o crescimento microbiano e que os micro-organismos gram-negativos são mais sensíveis as especiarias do que aqueles não gram-negativos.

Os óleos essenciais de *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans* (tomilho), *O. acutidens* (orégano) e *O. rotundifolium* (orégano) mostraram diferentes atividades antimicrobianas contra 26 patógenos e/ou saprófitas, 14 fungos e 3 leveduras testadas. O óleo essencial de *O. rotundifolium* mostrou notável atividade antimicrobiana, exibindo efeito inibitório para 23 de 26 bactérias, 13 de 14 fungos e leveduras testadas, enquanto todos os micro-organismos testados foram inibidos pelos óleos de *T. sipyleu* ssubsp. *sipyleus* var. *rosulae* *O. acutidens* (ÇETIN et al., 2011).

Um estudo usando óleos essenciais de orégano, canela e sua combinação mostraram que os óleos foram ativos contra todos os bacilos gram-negativos testados. Orégano foi ligeiramente menos ativo contra *P. aeruginosa* com um CIM e CBM chegando a 800mg/L e uma maior atividade contra uma cepa de *A. baumannii* com CIM de 100mg/L. O óleo essencial de canela mostrou valores de CIM de 200 – 400 mg/L, não havendo diferenças substanciais entre as cepas. A combinação dos óleos não mostrou efeitos sinérgicos ou antagônicos. Desta forma, o óleo de canela poderia ser um melhor candidato que o orégano para uso como um agente antimicrobiano (BECERRIL et al., 2012).

O óleo de canela mostra forte efeito antibacteriano contra *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium* com CIM de 0,2, 0,1, 0,1, 0,4 e 0,4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. Tomilho e cravo tiveram a mesma CIM contra *E.coli* e *S. Typhimurium* (0,8 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Mas o efeito do óleo de tomilho foi mais forte que do óleo de cravo contra *B. subtilis*, *B. cereus* e *S. aureus* (FEI et al., 2011).

Rana et al., (2011), estudaram 19 óleos essenciais e apenas 12 apresentaram atividade antibacteriana. Capim-limão (*Cymbopogon citrus*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e ajwain (*Carum copticum*) exibiram altos níveis de atividade antibacteriana contra todas as cepas bacterianas. *Pseudomonas aeruginosa* e *S. Typhimurium* mostraram inibição somente com estes três óleos. Sete óleos nomeadamente, patchuli (*P. cablin*), erva-doce (*F. vulgare*), cúrcuma (*C. longa*), pinho (*P. roxburghii*), cardamomo (*E. cardamomum*), cominho (*C.cuminum*) e pimenta negra (*P. nigrum*) não mostraram qualquer atividade antibacteriana. Madeira de cedro vermelho (*C. deodora*) exibiu fraca atividade somente contra *S. aureus*. Outros óleos apresentaram atividade alta a moderada. De todos os óleos testados, canela (*C. zeylanicum*) foi a mais ativa com mais alta inibição em todas as bactérias testadas.

No estudo realizado por Hulánková & Borilová (2011), o mais potente óleo foi o tomilho, seguido por orégano, canela e árvore de chá. Óleos de tomilho, canela, hortelã, capim-limão e orégano apresentaram concentração inibitória mínima em $\leq 2\%$ (v/v). Leveduras testadas foram mais sensíveis para canela, orégano e capim-limão com CIM de 0,03 – 0,06% (v/v). *P. aeruginosa* foi a mais resistente entre as cepas testadas. Outros pesquisadores também têm reportado a resistência a óleos essenciais por *P. aeruginosa* (KACÁNIOVA et al., 2012; SOKOVIC et al., 2010).

O óleo de orégano apresenta significativa atividade antibacteriana contra *Citrobacter* spp., *S. Typhi* e *E. coli* (CHAUDHRY et al., 2007). Já é sabido que o óleo

de orégano encontra-se entre os mais ativos contra cepas de *E. coli* e também apresenta atividade antibacteriana contra micro-organismos patogênicos como *S. Choleraesuis*, *S. Typhi*, *S. Typhimurium* e muitos outros bacilos gram-negativos da família das *Enterobacteriaceae* (PENÁLVER et al., 2005).

Estudos demonstram forte atividade antibacteriana dos óleos de tomilho e orégano contra cepas de *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *S. Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Lactobacillus sakei* e *Pseudomonas putia* (KACÁNIOVA et al., 2012; TURGIS et al., 2012).

Muitos pesquisadores têm estudado o efeito inibitório dos componentes dos óleos essenciais, como thymol, carvacrol, eugenol, ácido trans-cinâmico entre outros. Entre os compostos naturais, o thymol apresentou ser mais efetivo com menores valores de CIM de 1.0 e 1.2 mmol l⁻¹ contra *S. Typhimurium* e *E. coli*, respectivamente (OLASUPO et al., 2003). Helander et al. (1998), mensuraram o efeito inibitório de thymol, carvacrol, (+) – carvone e trans-cinamaldeído contra cepas de *E.coli* e *S. Typhimurim* e observaram que houve o mesmo efeito inibitório para os compostos, menos para o carvone que apresentou menor atividade.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostraram que os óleos de orégano, tomilho e canela são possíveis fontes naturais para usar-se *in vitro* no controle de *Salmonella enterica*, pois o óleo essencial de orégano inibiu o crescimento de todos isolados testados e os óleos de tomilho e canela inibiram 91,3% dos isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angulo, F. J.; Tauxe, R. V.; Cohen, M. L. Significance and sources of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in humans in the United States: the need for prudent use of antimicrobial agents, including restricted use of fluoroquinolones, in food animals. In: AGRICULTURE'S ROLE IN MANAGING ANTIMICROBIAL RESISTANCE CONFERENCE, 1999, Canada. In: ANNALS OF THE AGRICULTURE'S ROLE IN MANAGING ANTIMICROBIAL RESISTANCE CONFERENCE, Canada, 1999, p. 14-28.

Araújo, J. C. L. V.; Lima, E. O.; Ceballos, B. S. O.; Freire, K. R. L.; Souza, E. L.; Santos Filho, L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre micro-organismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. Revista de Patologia Tropical, 2004; 33 (1): 55-64.

Becerril, R.; Nerin, C.; Gómez-Lus, R. Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2012; 9 (8): 699-705.

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2004; 94: 223 – 253.

Çetin, B.; Çakmakçi, S.; Çakmakçi, R. The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. *Turkish Journal of Agriculture & Forestry*, 2011; 35: 145-154.

Chaudhry, N. M. A.; Saeed, S.; Tariq, P. Antimicrobial effects of oregano (*Origanum vulgare*) against gram-negative bacilli. *Pakistan Journal of Botany*, 2007; 39 (2): 609-613.

CLSI. Performance Standards of Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard- Third Edition. CLSI document M31- A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

Deans, S. G.; Ritchie, G. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 1987; 5: 165-180.

Dornam, H. J. D.; Deans, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 2000; 88: 308- 316.

Fei, L.; Yi-Cheng, D.; Xing-Qian, Y.; Yu-Ting, D. Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil. *Agriculture Science in China*, 2011; 10 (9): 1482-1487.

Gast, R. K. Salmonella Infections. *In*: Calnek, B. W.; John Barnes, H.; Beard, C. W.; Reid, W. M.; Yoder Jr.H. W. (Eds.) *Diseases of Poultry*, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 2008. p. 619-619.

Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 1999; 86: 985-990.

Helander, I. M.; Alakomi, H-L.; Lavta-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E. J.; Gorris, L. G. M.; Von Wright, A. Characterization of the action of selected essential oils components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998; 46: 3590-3595.

Hulánková, R.; Borilová, G. In vitro combined effect of oregano essential oil and caprylic acid against Salmonella serovars, Echerichia coli O157:H7, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. *Acta Veterinaria Brno*, 2011; 80: 343-348.

Irkin, R.; Korukluoglu, M. Growth inhibition of pathogenic bacteria and some yeasts by selected essential oils and survival of L. monocytogenes and C. albicans in Apple – Carrot juice. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2009; 6 (3): 387-394.

Kacániová, M.; Vukovic, N.; Hleba, L.; Bobková, A.; Pavelkova, A.; Rovina, K.; Arpášová, H. Antimicrobial and antiradicals activity of *origanum vulgare* L. and *thymus vulgaris* essential oils. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 2012; 2 (1): 263-271.

Lambert, R. J. W.; Skandamis, P. N.; Coote, P. J.; Nychas, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal Applied Microbiology*, 2001; 91: 453-462.

López, P.; Sánchez, C.; Batlle, R.; Nerín, C. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007; 55: 4348-4356.

Mann, C.M; Markham, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 1998; 84: 538-544.

Olasupo, N. A.; Fitzgerald, D. J.; Gasson, M. J.; Narbad, A. Activity of natural antimicrobial compounds against *Echerichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*, 2003; 36: 448-451.

Özkalp, B.; Sevgi, F.; Özcan, M.; Özcan, M. M. The antibacterial activity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.). *Journal of Food Agriculture & Environment*, 2010; 18 (2): 272-274.

Peñalver, P.; Huerta, B.; Borge, C.; Astorga, R.; Romero, R.; Perea, A. Antimicrobial activity of Five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *APMIS*, 2005; 113: 1-6.

Pozzatti, P.; Müller, L. G.; Spader, T. B.; Alves, S. H. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de condimentos. *Saúde, Santa Maria*, 2006; 32 (1): 53 – 58.

Pressus, H. G.; Echard, B.; Enig, M.; Brook, I.; Elliott, T. Minimum inhibitory concentrations of herbal oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Molecular and Celular Biochemistry*, 2005; 272 (1-2): 29-34.

Rana, I. S.; Singh, A.; Gwal, R. In vitro study of antibacterial activity of aromatic and medicinal plants essential oils with special reference to cinnamon oil. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 2011; 3 (4): 376-380.

Rusenova, N.; Parvanov, P. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia Journal of Science*, 2009; 7 (1): 37-43.

Santurio, J. M.; Santurio, D. F.; Pozzatti, P.; Moraes, C.; Franchin, P. R.; Alves, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. *Ciência Rural, Santa Maria*, 2007; 37 (3): 803-808.

Silva, E. N.; Duarte, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 2002; 4 (2): 1- 4.

Sorovic, M.; Glamoclija, J.; Marin, P. D.; Brkic, D.; Griensven, L. J. L. D. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 2010; 15: 7532-7546.

Tassou, C.; Koutsoumanis, K.; Nychas, G. -J. E. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 2000; 33: 273- 280.

Tessi, M. A.; Salsi, M. S.; Caffer, M. I.; Moguivelsky, M. A. Drug resistance of *Enterobacteriaceae* isolated from chicken carcasses. *Journal of Food Protection*, 1997; 60 (8):1001-1005.

Turgis, M.; Vu, K. D.; Dupont, C.; Lacroix, M. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Research International*, 2012; 48: 696-702.

4 ARTIGO 2

Comparação entre técnicas *in vitro* para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano frente a amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves²

Comparison of in vitro techniques to evaluate the antimicrobial activity of essential oil of oregano against strains of Salmonella enterica isolated from poultry

Vanessa Laviniki¹; Caroline Pissetti²; Marisa Ribeiro de Ipanema Cardoso²; Vladimir Pinheiro do Nascimento¹.

¹ Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ABSTRACT

*Infections with Salmonella enterica cause negative impact and great economic losses to the industry as it affects the production and may cause food poisoning in humans. Essential oils and their constituents has been studied as an alternative for controlling these pathogens, as they have antibacterial activity for both gram-negative and gram-positive. Many methods are used to evaluate the inhibitory effect of the oils and their compounds, and the most used techniques are the disc diffusion and broth microdilution. Being difficult to compare the results because the techniques used suffer many modifications. This study aimed to compare the two techniques in vitro essential oil of oregano (*Origanum vulgare*) against 45 strains of *Salmonella enterica* isolated from poultry. In the disc diffusion technique oregano oil was diluted in ethanol at concentrations of 8, 4, 2 and 1%, while in microdilution broth oil was diluted 8-0, 003% in a sterile agar 0.15%. The minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 8 to 1%, and the diameter of inhibition ranged from 21 to 7 mm. The results obtained from both techniques are different, although in both techniques oregano oil has shown inhibitory effect.*

² Artigo a ser submetido à comissão editorial da revista: "Revista Brasileira de Microbiologia"

Keywords: atividade antimicrobiana, óleo essencial de orégano, *Salmonella*

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas que afetam o trato digestivo de suínos e aves têm tradicionalmente sido uma das principais causas de perdas econômicas (1). O surgimento de cepas resistentes de *Salmonella* spp. é comum e este fato é agravado com a ampla utilização de antimicrobianos em rações animais, principalmente como promotores de crescimento (2). Além disso, a presença de *Salmonella* compromete a saúde do plantel e constitui em importante barreira para o comércio internacional de alimentos (3,4).

Uma variedade de métodos tem sido desenvolvidos para testes *in vitro* de suscetibilidade antimicrobiana de amostras clínicas de bactérias. E estes testes, muitas vezes, têm sido realizados por indivíduos que tem pouco conhecimento, treinamento ou experiência em microbiologia. A variabilidade no potencial dos métodos de ensaio e a competência das técnicas determinam que os testes *in vitro* de suscetibilidade antimicrobiana devem ser gerados por meio de adesão à métodos padronizados, tais como os descritos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*(CLSI) (5).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem métodos de difusão em ágar, métodos de macrodiluição e microdiluição (6). Mas a escolha do método tem sido dificultada pela peculiaridade que os óleos apresentam, quais sejam: volatilidade, insolubilidade em água e complexidade, características que interferem significativamente nos resultados. Por isso, em testes de suscetibilidade antimicrobiana, deve-se levar em consideração a técnica usada, o meio de cultura, os micro-organismos e o óleo essencial testado (7).

Há poucos estudos, que relatam qual é o melhor método de *screening* a ser utilizado de acordo com o tipo de extrato a ser testado, mesmo no que se refere às técnicas mais simples. Por vezes, relatos de resultados em diferentes artigos publicados com uma mesma planta são apresentados de maneira distinta em relação à atividade antimicrobiana, às vezes até mesmo discrepantes, mesmo naqueles em que foram utilizadas as mesmas condições de experimento (ex: solvente utilizado para extração, temperatura, tempo de incubação e micro-organismos indicadores), embora as técnicas

ou modificações empregadas nos métodos de *screening* para avaliar a atividade antimicrobiana por diferentes autores não tenham sido as mesmas (8).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo comparar duas técnicas *in vitro* de atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano frente a amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismos: Foram utilizados 44 isolados de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovares Enteritidis, Heidelberg, Hadar, Thyphimurium, Gallinarum e Agona, proveniente de produtos avícolas, estocadas no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, durante os anos de 1996 a 2011, uma cepa de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, que serviu como controle positivo. Os micro-organismos estavam estocados à - 20°C em caldo infusão cérebro e coração (BHI) adicionado de glicerol 20%. As amostras foram repicadas em ágar Triptona de soja (TSA) e incubadas por 24 horas a 37°C.

Reagente: A solução de resazurina (Vetek) foi preparada em 0,01% (v/v) em água destilada estéril.

Óleos essenciais: Foi usado o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), obtido comercialmente em frasco âmbar, lacrado, com volume de 10 ml, composto por: carvacrol 65-69%, p-cimeno 12-14%, linalol < 1%, miceno 1-2%, pinemo 2-3%, ? cariofileno < 2%, ? terpinenol 1%, ? terpineno 7% e ocimeno < 2%, fabricado por Laszlo Aromaterapia (www.laszlo.ind.br, Belo Horizonte, Brasil). Para a técnica de microdiluição em caldo o óleo de orégano foi diluído em concentrações de 8% a 0,03% em MHB e para a técnica de disco difusão o óleo foi diluído em etanol nas concentrações de 8%, 4%, 2% e 1%, armazenados em frascos âmbar e lacrados com parafilme.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Método de cultura: tubos contendo caldo Nutriente (NB, Himedia) foram inoculados com cada micro-organismo e incubados durante 24 horas a 37°C. Primeiramente, foi determinada a concentração de células necessárias para causar redução da resazurina

dentro de 2 horas. Uma diluição seriada de cada cultura foi preparada em caldo Nutriente. Dispensou-se 1,7 ml do inóculo em tubos contendo 20 µl de solução de ágar (0,15% v/v) e 10 µl de solução de resazurina que foram incubados por 2 horas a 37°C. A diluição apropriada de trabalho foi àquela capaz de reduzir a resazurina. Resazurina é um indicador redox que na forma oxidada apresenta a coloração azul e na forma reduzida coloração roxo-rósea.

Os isolados foram incubados em ágar Triptona de soja (TSA, Oxoid) por 24 horas a 37°C. A partir desta cultura, preparou-se uma suspensão bacteriana, em solução salina, equivalente a o padrão 0,5 da escala McFarland e diluída em caldo Müller-Hinton (MHB, Himedia) para obtenção aproximada de um ciclo de log menor que o necessário para reduzir a resazurina. Para o teste utilizou-se uma placa estéril de 96 poços onde cada micro-organismo foi testado em duplicata. Na coluna 1 a 9, adicionou-se 170µl de inóculo e 20µl do óleo diluído; na coluna 10, 170µl do inóculo e 20µl de solução de ágar estéril 0,15% (controle positivo); colunas 11 e 12, 170µl de MHB e 20µl de solução de ágar estéril 0,15% (controles negativos). As placas foram vedadas com parafilme e incubadas a 37°C por 24 horas. Após adicionou-se 10µl de solução de resazurina 0,01% nas colunas 1 a 11 e 10µl de água destilada estéril na coluna 12, que foram novamente incubadas a 37°C por 2 horas, decorrido este período se realizou a leitura visual da mudança de cor, com a maior diluição remanescente azul indicando a CIM. O conteúdo dos poços de coloração azul foi dispensado em placas de ágar Xilose Lisina Dextrose (XLD, Oxoid) incubados por 24 horas a 37°C. A concentração bactericida mínima Placas que não apresentaram crescimento foram consideradas como a concentração inibitória mínima/concentração bactericida mínima (MANN & MARKHAM, 1998). Já a técnica de disco difusão foi feita com base no documento M2-A8 do CLSI (10), consistiu na semeadura do inóculo com suabe em toda a superfície da placa de petri contendo ágar Müller – Hinton (MHA, Merck) e após depositou-se na superfície do ágar discos de papel sem reagente (Oxoid) embebidos em 10µl do óleo diluído. Incubou-se por 24 horas a 37°C e depois se realizou a medição dos halos. Todos os testes foram feitos em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em ambas as técnicas foram observadas ação antibacteriana do óleo essencial de orégano frente às 46 amostras analisadas (Tabela 1). Os valores de CIM ficaram na

faixa entre 8 – 1% (v/v). Já os diâmetros dos halos variaram de 21-7 mm. Os resultados mostram-se divergentes, pois em amostras onde o halo de inibição foi maior em diluição do óleo a 8%, quando comparado com a CIM a concentração do óleo foi de 8%.

TABELA1 - Suscetibilidade das amostras frente ao óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)

Micro-organismos	Atividade Antimicrobiana				
	Microdiluição em caldo	Disco difusão (mm)			
	CIM (% v/v)	8%	4%	2%	1%
<i>Salmonella</i> Enteritidis	8	12,5	10	8,6	8
<i>Salmonella</i> Enteritidis	4	12,5	10	8	7
<i>Salmonella</i> Enteritidis	8	12	10	8	6,5
<i>Salmonella</i> Enteritidis	8	11,5	9	8	7
<i>Salmonella</i> Enteritidis	4	12	10	9	8
<i>Salmonella</i> Enteritidis	4	11	10	9	8
<i>Salmonella</i> Enteritidis	4	12	10,5	9	8
<i>Salmonella</i> Enteritidis	4	12	10	9	8
<i>Salmonella</i> Enteritidis	4	11	10	9	8
<i>Salmonella</i> Enteritidis	4	11	10	9	8
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	2	13	11	10	8,5
<i>Salmonella</i> Heidelberg	4	11	10,5	9,5	8,5
<i>Salmonella</i> Heidelberg	4	12,5	10,5	9	8
<i>Salmonella</i> Heidelberg	2	13	11	10	9
<i>Salmonella</i> Heidelberg	4	12	11	10	9
<i>Salmonella</i> Heidelberg	1	12	11	10	9,5
<i>Salmonella</i> Heidelberg	4	13	11,5	10	9
<i>Salmonella</i> Heidelberg	2	13	12	10	8,5
<i>Salmonella</i> Heidelberg	4	12,5	11,5	9	8
<i>Salmonella</i> Heidelberg	4	12,5	11	9	8,5
<i>Salmonella</i> Heidelberg	4	13	11	9,5	8
<i>Salmonella</i> Hadar	4	14	12	11	9
<i>Salmonella</i> Hadar	4	13	11	10	8
<i>Salmonella</i> Hadar	4	13	12	10	8
<i>Salmonella</i> Hadar	8	12	11	10	8
<i>Salmonella</i> Hadar	8	12	11	10	8
<i>Salmonella</i> Hadar	8	13	12	10	8
<i>Salmonella</i> Hadar	2	13	11	10	8
<i>Salmonella</i> Hadar	4	13	12	10	8
<i>Salmonella</i> Hadar	4	13	12	9	8
<i>Salmonella</i> Hadar	4	13	11,5	10	8
<i>Salmonella</i> Typhimurium	4	12,5	11	10	9
<i>Salmonella</i> Typhimurium	8	12,5	11	9,5	8,5
<i>Salmonella</i> Typhimurium	4	13	11,5	9,5	8
<i>Salmonella</i> Typhimurium	4	14,5	12	10	9,5
<i>Salmonella</i> Typhimurium	4	12	10,5	8	7
<i>Salmonella</i> Typhimurium	4	13	12	10	8
<i>Salmonella</i> Gallinarum	2	21	14	10	9
<i>Salmonella</i> Gallinarum	2	21	12,5	10	9
<i>Salmonella</i> Gallinarum	4	17	13	10	8
<i>Salmonella</i> Gallinarum	4	12	11	10	9
<i>Salmonella</i> Gallinarum	4	13	11	9	8
<i>Salmonella</i> Agona	8	13,5	12	10,5	9
<i>Salmonella</i> Agona	4	12	11	10	8
<i>Salmonella</i> Agona	2	13,5	11,5	9,5	8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	4	13	11,5	10	8

Tradicionalmente os resultados dos testes antimicrobianos são reportados qualitativamente e/ou quantitativamente. Resultados qualitativo são reportados como suscetível, intermediário ou resistente, já resultados quantitativos são reportados como concentração inibitória mínima em $\mu\text{g/ml}$ ou mg/L (3). Como os testes com óleos essenciais não possuem uma norma padrão, pesquisadores têm adaptado métodos experimentais para melhor representar possíveis futuras aplicações em seus particulares campos. Contudo, uma vez que os resultados dos testes podem ser afetados por vários fatores como a metodologia usada para extrair o óleo a partir da planta, meio de cultura usado, pH do meio e o tempo de incubação e temperatura, a comparação dos dados publicados é complicada (11).

Alves et al.(12), comparam três metodologias diferentes de difusão em ágar para avaliar a atividade antibacteriana de extratos brutos de plantas, e observaram que houve discordância estatística significativa entre as três técnicas analisadas. E embora em uma das técnicas houvesse inibição da maioria dos isolados testados, pôde-se considerar que o método de diluição em caldo foi a melhor opção para se determinar a atividade antimicrobiana.

Já Mann & Markham (9), observaram que o método de microdiluição em caldo apresentou valores de CIM menores para a maioria dos organismos testados, indicando que o método de resazurina é mais sensível que o método de diluição em ágar.

Rios et al. (8), citam que quando autores compararam a atividade de óleo essencial contra dois micro-organismos diferentes (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), eles obtiveram resultados contraditórios: o óleo essencial foi mais ativo contra *S. aureus* pelo método de disco difusão, mas para *E. coli* foi mais sensível quando usado o método de microdiluição em caldo.

As substâncias normalmente testadas pelos métodos propostos pelo CLSI têm natureza hidrófila e os testes são padronizados para esta condição. Nos ensaios com óleos essenciais, deve-se considerar que os óleos são voláteis, insolúveis em água, viscosos e complexos. O que pode ser um problema quando se utiliza a microdiluição em caldo, pois o óleo pode formar uma suspensão turva que impede a determinação visual da eficácia antimicrobiana do óleo (7).

A avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais muitas vezes é feita por disco difusão, em que um disco de papel filtro impregnado com o óleo é depositado sobre ágar inoculado com o micro-organismo em teste (11). Alguns pesquisadores que utilizam a técnica de disco difusão estão usando a seguinte escala de medição: ≥ 20 mm

a zona de inibição é fortemente inibidora, < 20 – 12 mm de inibição é moderada e < 12 mm não é inibitória. Sendo que os valores são uma média de três medições paralelas (12).

Fatores, tais como, o volume do óleo essencial colocado no disco de papel, a espessura da camada de ágar e se for utilizado solvente variam consideravelmente entre os estudos (11). Muitos autores têm relatado que quando se utiliza disco difusão alguns extratos não apresentam atividade antimicrobiana, o que se deve a dificuldade de difusão dos óleos no meio de cultura devido a sua característica lipofílica e à sua massa molecular (13).

Eloff (14) observou inconvenientes na técnica de microdiluição em placas, tais como células de alguns micro-organismos que se aderiam à base do poço, enquanto que as de outros permaneciam em suspensão. Ainda, compostos presentes em alguns extratos precipitavam, e a coloração verde da clorofila em concentrações muito altas interferia na análise. Mas mesmo assim, concluiu que o método de microplacas é barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de amostra, pode ser usado para um grande número de amostras e deixa registro permanente.

Sarker et al. (15), observaram que o método de resazurina modificado é simples, sensível, rápido, robusto e confiável, e pode ser usado com sucesso para avaliar as propriedades antibacterianas de produtos naturais.

Liu et al. (16), utilizaram três métodos diferentes para avaliar a ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Candida* spp. e observaram que todos os métodos têm seus inconvenientes. No método de microdiluição proposto pelo CLSI (M 27 - A2) notou-se que os extratos podem formar precipitados e serem confundidos com células e a turbidez pode ser influenciada pela coloração mais escura de alguns extratos, o que gerou resultados falsos - negativos. Entretanto, no método utilizando resazurina observou-se a redução drástica da interferência dos extratos e uma boa reprodutibilidade.

O'Brain et al. (17) estudaram seis óleos essenciais de citrus contra 11 amostras de *Salmonella* spp. usando o método de disco difusão. Os três óleos mais ativos foram selecionados para determinar a concentração inibitória mínima para as mesmas amostras de *Salmonella*. Os compostos mais ativos foram os terpenos de essência de laranja, que produziram um CIM de 0,125% a 0,5%, seguidos dos terpenos de laranja e d-limoneno ambos com CIM de 1%.

Silveira et al. (18) , também utilizaram disco difusão para selecionar os óleos essenciais que apresentaram maior atividade e após determinaram a concentração inibitória mínima dos mesmos. Os óleos que apresentaram forte atividade antimicrobiana, em ordem decrescente, foram erva cidreira, manjeriço, orégano, canela, folha de louro e alecrim. Os valores de CIM variaram de 0,075 a 10 mg ml⁻¹. Os óleos essenciais de orégano e canela apresentaram moderada atividade contra as bactérias testadas. Os valores obtidos de CIM para o óleo essencial de orégano contra *E. coli* e *S. Typhimurim* foram menores que os obtidos por Peñalver et al. (1).

CONCLUSÕES

A técnica de disco difusão é muito usada para avaliar o efeito inibitório de óleos essenciais e seus compostos, mas em nosso estudo pode-se observar que não houve diferença significativa entre as concentrações testadas do óleo de orégano frente aos isolados testados. Os melhores resultados foram obtidos com a técnica de microdiluição em caldo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1). Peñalver, P.; Huerta, B.; Borge, C.; Astorga, R.; Romero, R.; Perea, C (2005) Antimicrobial activity of Five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. *Acta Pathologica, Microbiologia et Immunologica Scandinavica* 113: 1-6.
- (2). Cortez, A.L.L.; Carvalho, A.C. de F.B.; Ikuno, A.A.; Bürger, K.P.; Vidal-Martins, A.M.C (2006) Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella spp.* isoladas de abatedouros de aves. *Arquivo do Instituto Biológico* 73 (2): 157-163.
- (3). Gonçalves, P. M. R (2005) *Escherichia coli* com detecção do gene ISS por PCR, *Mycoplasma* e *Salmonelas* na qualidade sanitária de frangos de corte ao abate. Rio de Janeiro, Brasil, 84p. (Tese. Universidade Federal Fluminense)
- (4). Santurio, J. M.; Santurio, D. F.; Pozzatti, P.; Moraes, C.; Franchin, P. R.; Alves, S. H (2007) Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente à sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. *Ciência Rural* 37: 803-808.
- (5). Walker, R (2006) Antimicrobial Susceptibility Testing Methods and Interpretation of Results. In: Giguère, S.; Prescott, J.F.; Baggot, J. D.; Walker, R. D.; Dowling, P.M. (eds). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Blackwell Publishing, Oxford, 11-25.

- (6). Ostrosky, E.A.; Mizumoto, M.K.; Lima, E.L.; Kaneko, T.M.; Nishikawa, S.O.; Freitas, B.R (2008) Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação de concentração inibitória mínima (CIM) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacologia* 18: 301-307.
- (7). Nascimento, P.F.C.; Nascimento, A.C.; Rodrigues, C.S.; Antonioli, A.R.; Santos, P.O.; Barbosa, A.M.Jr.; Trindade, R.C (2007) Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacologia* 17: 108-113.
- (8). Rios, J.L.; Recio, M.C.; Villar, A (1988) Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23: 127-149.
- (9). Mann, C.M.; Markham, J.L (1998) A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology* 84: 538-544.
- (10). National Commite for Clinical Laboratory Standards (2003) Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: norma aprovada M2-A8. Wayne, Pensilvânia: National Commite for Clinical Laboratory Standards, 58p.
- (11). Burt, S (2004) Essential oils: their antibacterial proprieties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- (12). Rusenova, N.; Parvanov, P (2009) Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Tarkia Journal of Science* 7 : 37-43.
- (13). Alves, E.G.; Vinholis, A.H.C.; Casemiro, L.A.; Furtado, N.A.J.C.; Silva, M.L.A.; Cunha, W.R.; Martins, C.H.G (2008) Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova* 31: 1224-1229.
- (14). Eloff, J. N (1998) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extracts for bacteria. *Planta Médica* 64: 711-713.
- (15). Sarker, S. D.; Nahar, L.; Kumarasamy, Y (2007) Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemical. *Methods* 42: 321-324.
- (16). Liu, M.; Seidel, V.; Katerere, D. R.; Gray, A. I (2007) Colormetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeast. *Methods* 42: 325- 329.
- (17). O’Brayn, C. A.; Grandall, P. G.; Chalova, V. I (2008) Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. *Journal Food Science* 73: M264-M267.
- (18). Silveira, S. M.; Cunha Junior, A.; Scheuermann, G. N.; Secchi, F. L.; Vieira, C. R. W (2012) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. *Ciência Rural* 42: 1300-1306.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial de orégano pode ser considerado uma alternativa natural para ser usado *in vitro* no controle de crescimento de *Salmonella*. Embora mais estudos tenham que ser feitos para avaliar o seu efeito *in vivo*. Apesar de os óleos de tomilho e canela não apresentarem efeito inibitório sobre todas as amostras estudadas, eles também podem ser considerados como uma fonte alternativa de antimicrobianos, pois os valores da concentração inibitória mínima para os três óleos permaneceram na faixa de 8-1% (v/v).

A melhor metodologia para avaliar o efeito inibitório dos óleos essenciais é a microdiluição em caldo, pois nos fornece valores semi-quantitativos e devido às peculiaridades que os óleos possuem, mostrou possuir menores interferências do que quando comparada a disco difusão.

A padronização de uma metodologia para avaliar a ação dos óleos seria muito importante, pois assim poderíamos comparar os dados gerados com outras publicações, o que até agora se torna difícil, devido às diferentes modificações feitas nas técnicas, como, tamanho do inóculo, uso ou não de agente emulsificante, temperatura de incubação, meio de cultura utilizado, volume de óleo diluído e bem como é feita a sua diluição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. Bacterial Agents of Foodborne illness. In: **Food Microbiology**. 3ª edição. University of Surrey Guilford, UK. RSC Publishing, 2008. p. 235-244.
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, V. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, vol. 31 (nº5), p. 1224- 1229, 2008.
- BACK, A. Salmonelose. In: **Manual de Doença das Aves**. 2ª edição. Cascavel: Editora Integração, 2010. p. 174-195.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. 2ª Edição. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2009. p. 435-454.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf>. Acesso em 23 de janeiro de 2013.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_periodo_2000_2011_site.pdf>. Acesso em 23 de janeiro de 2013.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003. Disponível em: <<http://www.idaf.es.gov.br/Download/Legislacao/DDSIA%20-%20INSTRU%C3%87%C3%83O%20NORMATIVA%20N%C2%BA%2078,%20SALMONELLA.pdf>>. Acesso em 23 de janeiro de 2013.
- BARREIRO, E.L.; FRAGA, C. A. M. A utilização do Safrol principal componente do óleo de Sassafrás, na Síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: anti-inflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. **Química Nova**, v. 5, n. 22, p. 744-759, 1999
- BAYDAR, H. - SAGDIC, O. - OZKAN, G. - KARADOGAN, T. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, vol. 15, p. 169-172, 2004.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 94, p.223 – 253, 2004.
- CORTEZ, A. L. L.; CAVALHO, A. C de F. B. de; IKUNO, A. A.; BURGER, K. P.; VIDAL-MARTINS, A. M. C. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella spp.* isolada de abatedouros de aves. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, vol. 73, n.2, abr./jun, 2006.

COOKE, F. J.; WAIN, J. Antibiotic resistance in *Salmonella* infections. In: **Salmonella infections: clinical, immunological and molecular aspects**. New York: University Press, 2006. p. 25-56

CUNHA, A.; SILVA, A.; ROQUE, O. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 2ª edição. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. 2006.

D'AOUST, J. Y. Salmonella and the international food trade. **International Journal of Food Microbiology**, vol.24 (nº 1-2), p. 11-31, 1994.

D'AOUST, J. Salmonella. In: LUND, B. M.; BAIRD-PARKER, T. C.; GOULD, G. W. **The microbiological Safety and Quality of Foods**. Maryland: Aspen Publishes, 2000. p. 1233- 1276.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol.33, p. 166-168, 2002.

DORNAM, H. J. D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 88, p. 308- 316, 2000.

ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extracts for bacteria. **Planta Médica**, vol. 64, p. 711-713, 1998.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em micro-organismos isolados do meio-ambiente. **BCEPPA**, v. 25 (2), p. 193-206, 2007.

ERTAS, O. N.; GÜLER, T.; ÇIFTÇI, M.; DALKILIÇ, B.; SIMSEK, Ü. G. The effect of essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. **International Journal of Poultry Science**, vol. 4 (Issue 11), p. 879-884, 2005.

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

GAST, R. K. Salmonella Infections. In: CALNEK, B. W.; JOHN BARNES, H.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER Jr. H. W. **Diseases of Poultry**. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p. 619-619.

GOVARIS, A. - BOTSOGLOU, E. - SERGELIDIS, D. - CHATZOPOULOU, P.S. Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 44, p. 1240-1244, 2011.

GRIFFIT, R. W.; SCHWARTZ, K. J.; MAYERHOLTZ, D. K. Salmonella. IN: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**. 9ª ed. Cap. 45, 739 -751, 2006.

GRIGGS, J. P.; JACOB, J. P. Alternatives to Antibiotics for Organic Poultry production. **The Journal of Applied Poultry Research**, CIDADE, vol. 14 (n° 4), p. 750-756, 2005.

GONÇALVÉS, P. M. R. *Escherichia coli* com detecção do gene ISS por PCR, *Mycoplasma* e *Salmonelas* na qualidade sanitária de frangos de corte ao abate. 2005. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2005.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 86, p. 985-990, 1999.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H-L.; LAVTA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oils components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 46, p. 3590-3595, 1998.

HIRSH, D.C. Enterobacteriaceae: Salmonella. In: **Veterinary Microbiology**. 2 Ed. Ames, Iowa: Blackwell, 2004. p. 69-74.

HOLT, J. G.; KRIEG, N.R.; SNATH, P. H. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9° ed. Williams & Wilkims, 787p., 1994.

KLANCNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERSEK, B.; MOZINA, S. S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plants extracts. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 81, p. 121- 126, 2010.

KULISIC, T. - RADONIC, A. - KATALINIC, V. - MILOS, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, vol. 85, p. 633-640, 2004.

LAMBERT, R. J. W. Susceptibility testing: inoculum size dependency of inhibition using the Colworth MIC technique. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 89, p. 275-279, 2001.

LAMBERT, R. J. W.; PERSON, J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 88, p. 784-790, 2000.

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

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIA, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre espécies de Candida. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 16 (2), p. 197-201, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARCK, D. P. 12ª edição. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre; Artmed, 2010. p. 398-444.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 84, p. 538-544, 1998

MARTIN, F. W.; GREGORY, L. E. Mode of pollination and factors affecting fruit set in *Piper nigrum* in Puerto Rico. **CropScience**, v. 2 (4), p. 295-339, 1962.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 17 (Issue 1), p. 108-113, 2007.

OLIVEIRA, S. J. **Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária**. 3 Ed. Canoas: Editora ULBRA, 2012. p. 121-127.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANECO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antibacteriana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 18 (Issue 2), p. 301-307, 2008.

PEÑALVER, P.; HUERTA, B.; BORGE, C.; ASTORGA, R. R.; PEREA, A. Antimicrobial activity of Five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavia**, vol.113 (Issue 1), p. 1-6, 2005.

PREUSS, H. G.; ECHARD, B.; ENIG, M.; BROOK, I.; ELLIOTT, T. B. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 272 (Issue 1-2), p. 29-34, 2005.

RAVIDRAN, P. N.; BABLU, K. N.; SHYLAJA, M. **Cinnamon and Cassia: Medical and Aromatic Plants**. Industrial Profiles. CRC Press. 2004.

REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Piperáceas: Peperomia, Itajaí, 1984.

RORIG, L. R.; POSER, G. L. V. Investigação fitoquímica em espécies de Piperaceae, **Revista Brasileira de Farmacologia**., v. 1, n. 72, p. 15-17, 1991.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol. 37, p.803-808, mai/jun, 2007.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as na indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, San Diego, vol. 42 (Issue 4), p. 321-324, 2007.

SILVA, J. P; DUARTE-ALMEIDA, J. M; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. DE MELO. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente à

Salmonella Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol. 30 (Supl. 1), p. 136-141, 2010.

SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia : Da Planta ao Medicamento. Porto Alegre/Florianópolis, UFRS/UFSC, p. 14, 328-405, 1999

SHIVAPRASAD, H. L.; BARROW, P. A. Pullorum Disease na Folw Typhoid. In: CALNEK, B. W.; JOHN BARNES, H.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER Jr. H. W. **Diseases of Poultry**. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p. 619-619.

SOULÉ, M. E. Conservation: tactics for a constant crisis. **Science**, n. 253, p. 744-750, 1991.

TASSOU, C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International**, vol. 33, p. 273-280, 2000.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBA). Relatório Anual 2012. Disponível em : <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3293>> . Acesso em 23 de janeiro de 2013.

ZEVEN, A. C. Black pepper: *Piper nigrum* (Piperaceae). In: Simmonds, N. W (Ed). **Evolution of Crop Plants**. New York: Logman, 1974, p. 234-235.

WALLIS, T. S. Host-specificity of *Salmonella* infections in animal species. In: MASTROENI, P.; MASKELL, D. **Salmonella infection: clinical, immunological and molecular aspects**. New York: University Press, 2006. p. 57-88.

WALSH, S. E.; MAILLARD, J. Y.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEU, D. L.; BARTOLO, R. G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal Applied Microbiology**, vol. 94, p. 240-247, 2003.