

Comunicação

[Communication]

Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* e *Lippia rotundifolia* frente a enterobactérias isoladas de aves

[Antimicrobial activity of *Lippia origanoides* and *Lippia rotundifolia* oils against enterobacteria isolated from poultry]

D.S. Souza, A.C. Almeida*, V.A. Andrade, N.A. Marcelo, I.L. Azevedo,
E.R. Martins, L.S. Figueiredo

Universidade Federal de Minas Gerais – Campus Montes Claros, MG

A atividade avícola apresenta-se em grande expansão no Brasil devido à absorção de inovações tecnológicas pelo segmento que melhoraram a qualidade nutricional da carne, reduziram os custos de produção e aumentaram o escoamento do produto no mercado externo, elevando a aceitação pelos consumidores.

É comum no setor a utilização de antimicrobianos sintéticos como promotores de crescimento. Tais substâncias, utilizadas em doses subterapêuticas, atuam sobre as enterobactérias do trato gastrointestinal das aves, melhorando o desempenho dos animais. Porém existe uma grande preocupação com a possibilidade de que seu uso indiscriminado leve à biorresistência microbiana – causando a ineficácia dos medicamentos – e que os genes responsáveis por essa resistência sejam transmitidos para os micro-organismos patógenos de humanos (Praxedes, 2012).

Como alternativa a esse problema, surge a possibilidade de utilização de fontes antimicrobianas advindas de extratos vegetais, como os óleos essenciais, em que seus compostos e princípios ativos são analisados para possível substituição das bases sintéticas utilizadas.

Considerando a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sp., objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana

de óleos essenciais de Alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) e Rosmaninho (*Lippia rotundifolia*), espécies vegetais nativas do cerrado brasileiro, sobre enterobactérias presentes na avicultura.

Amostras fecais foram coletadas via cloaca de 49 aves de postura do setor de Avicultura do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG (Montes Claros – MG) e encaminhadas ao laboratório de Microbiologia Aplicada da mesma instituição, e foram submetidas às análises conforme recomendações de BRASIL (2003) para pesquisa de *E. coli* e *S. aureus*. Os experimentos envolvendo a coleta das fezes animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG sob Protocolo nº 102/2013.

Três cepas distintas de cada micro-organismo isolado foram utilizadas para os testes de avaliação de sensibilidade microbiana junto aos óleos essenciais de Rosmaninho (*Lippia rotundifolia*) e Alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*), nas concentrações de 160, 80 e 40µL/mL, obtidas a partir de um volume de 800µL de óleo, 20µL de Tween 80 e água destilada estéril para completar o volume de 5mL. A sensibilidade microbiana foi avaliada por meio do teste de Disco Difusão (NCCLS, 2003b), teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em tubos (NCCLS, 2003a) e teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM) em tubos (NCCLS, 2003a).

Recebido em 14 de abril de 2014

Aceito em 2 de março de 2015

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: aca2006@ica.ufmg.br

Os óleos essenciais foram obtidos de plantas coletadas do horto medicinal e extraídos no laboratório de plantas medicinais da UFMG, ambos no Campus Montes Claros, utilizando-se técnica de destilação por arraste de vapor em destilador piloto (Linax®, modelo D20), com aquecimento a gás GLP. Após três horas de extração, o óleo foi separado do hidrolato por partição líquido-líquido, retirado com micropipeta e acondicionado em frascos âmbar estéreis sob refrigeração (4 a 8°C) (Rostagno e Prado, 2013).

Avaliaram-se os resultados por meio da análise de variância (ANOVA) e *Bonferroni posttests* a 5% pelo programa “*Graf Pad Prism*” e análise de regressão por meio do programa estatístico SAEG, para determinação de um valor ótimo da concentração dos óleos a ser utilizada.

Os resultados do teste de disco difusão utilizando óleo essencial de Alecrim-pimenta frente a *Staphylococcus aureus* indicaram que as concentrações teste apresentaram diferença estatística quando comparadas com as cepas do tratamento controle e também apresentaram diferença estatística entre elas (Fig. 1A). Frente a *Escherichia coli*, a concentração de 40µL/mL apresentou diferença estatística quando comparada à concentração de 160µL/mL e ao tratamento controle sob as cepas 1 e 2 do micro-organismo. Já as concentrações de 80 e 160µL/mL mostraram-se significativas, respectivamente, quando comparadas ao tratamento controle (Fig. 1B). Esses resultados indicam um efeito inibitório mais efetivo sobre *E. coli*, considerando atividade de doses menores sobre o micro-organismo.

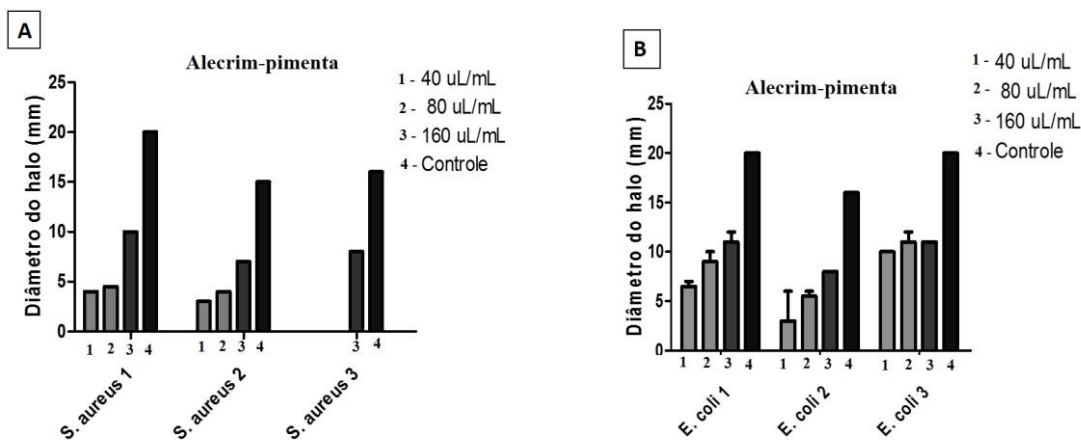


Figura 1. Óleo essencial de Alecrim-pimenta em teste de Disco Difusão, ($p < 0,05$), frente a *S. aureus* (A) e *E. coli* (B). As cores das barras são referentes às concentrações teste utilizadas. As barras referentes às concentrações de 40 e 80µL/mL não aparecem no gráfico (A) por não terem apresentado diferença estatística sob a cepa microbiana *S. aureus* 3.

O modelo ajustado à análise de regressão para ambos os micro-organismos utilizando óleo de Alecrim-pimenta foi o quadrático. Frente a *S. aureus* (equação: $y = 0,0505952x^2 - 0,166667$), o coeficiente x^2 apresentou-se negativo, coeficiente de variação igual a 87,269 e $R^2 = 0,96$; devido a esses resultados não foi possível determinar um valor máximo ou mínimo do óleo essencial para se utilizar em experimentos futuros.

Frente a *E. coli* (equação: $y = -0,000625x^2 + 0,1600x + 0,3000$), o coeficiente x^2 foi negativo, o coeficiente de variação igual a 38,699 e $R^2 = 0,77$. Porém obteve-se um ponto máximo no

valor de 128 µL/mL do óleo de Alecrim pimenta, pressupondo-se que essa concentração do óleo pode produzir melhor efeito de inibição sobre esse micro-organismo.

Através dos testes de CIM e CBM com óleo de Alecrim-pimenta, os resultados indicaram atividade inibitória em todas as cepas de micro-organismos a partir da concentração de 40µL/mL do óleo essencial. No entanto, a atividade bactericida em estudo só foi obtida na concentração de 160µL/mL para as cepas de *E. coli* e para *S. aureus*, não foi possível observar a CBM nas concentrações utilizadas.

O teste de Disco Difusão com óleo de Rosmaninho frente a *S. aureus* (Fig. 2A) apontou que as concentrações teste não apresentaram diferença estatística entre si, mas diferiram

estatisticamente do tratamento controle. Frente a *E. coli* (Fig. 2B), os resultados obtidos foram semelhantes aos adquiridos com óleo de Alecrim-pimenta.

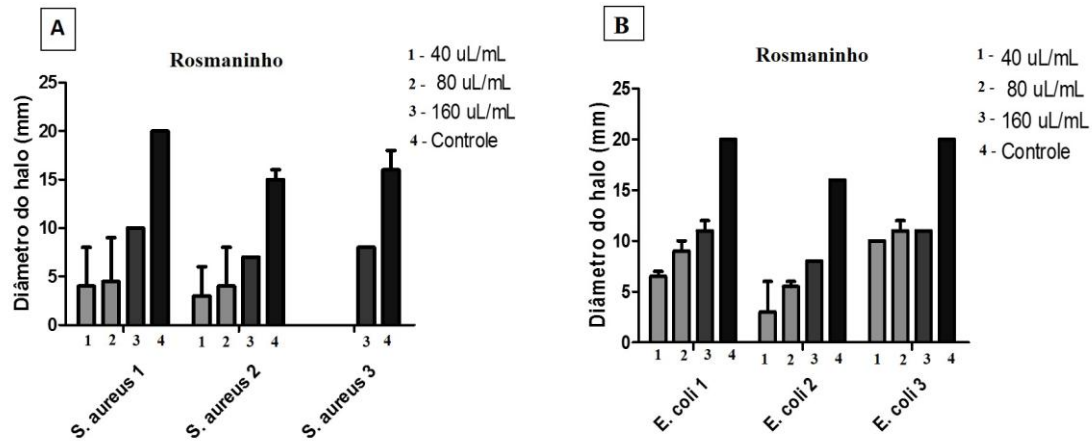


Figura 2. Óleo essencial de rosmaninho em teste de Disco Difusão ($p < 0,05$), frente a *S. aureus* (A) e *E. coli* (B). As cores das barras são referentes às concentrações teste utilizadas. As barras referentes às concentrações de 40 e 80µL/mL não aparecem no gráfico (A) por não terem apresentado diferença estatística sob a cepa microbiana *S. aureus* 3.

Ajustou-se o modelo quadrático à análise de regressão. Frente a *S. aureus* (equação: $y = -0,000643939x^2 + 0,153258x + 2,13939$), o coeficiente x^2 apresentou-se negativo, o coeficiente de variação de 36, 164 e $R^2 = 0,65$, sugerindo o valor de 119µL/mL como a concentração ótima para inibir esse micro-organismo. Frente a *E. coli* (equação: $y = -0,00056108x^2 + 0,138693x + 1,67121$), coeficiente x^2 negativo, coeficiente de variação de 31, 165 e $R^2 = 0,69$, a análise estatística apontou o valor de 123,59µL/mL como ponto ótimo de inibição.

Os resultados da CIM para o óleo de rosmaninho indicaram que a concentração de 160µL/mL apresentou efeito sobre o micro-organismo *S. aureus* e *E. coli* a CIM observada foi de 80 µL/mL. Não foi possível observar a CBM nas condições deste estudo frente a nenhuma das cepas em estudo.

Quanto aos resultados obtidos com o óleo de Alecrim-pimenta, estes são compatíveis com os descritos em pesquisas utilizando plantas de Alecrim-pimenta provenientes desse mesmo horto medicinal (Andrade et al., 2014). Ressalta-se que as concentrações de Alecrim-pimenta observadas como doses recomendáveis são

também compatíveis com aquelas encontradas pelos autores citados e que não apresentaram toxicidade em testes *in vivo*.

Estudos com óleo essencial de Rosmaninho ainda são escassos, mas, conforme demonstrado pelo presente trabalho, essa espécie vegetal possui efeito antimicrobiano, necessitando de mais estudos para comprovação dos resultados. Resultados obtidos por Quintão (2010) avaliaram atividade antimicrobiana de *L. rotundifolia* frente a *S. aureus* e outras bactérias isoladas de bovinos. Porém, com as frações hexânica (FH), acetato de etila (FAE), butanólica (FB), metanólica (FM) e etanólica (FE) não foi observada atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* nas condições de estudo. Leitão et al. (2006) também não encontraram resultados satisfatórios ao analisarem extratos hexânicos da planta frente à *Mycobacterium tuberculosis*.

Os resultados permitem observar uma coerência dos resultados obtidos entre as técnicas utilizadas, as quais permitiram determinar o efeito inibitório dos dois óleos sobre os micro-organismos em teste. No entanto, a técnica de difusão em disco permitiu obter uma concentração para o do ponto ótimo de inibição para os dois óleos frente aos micro-organismos

Atividade antimicrobiana...

E. coli, sendo mais eficiente na indicação de uma possível dose de uso dos óleos visando à ação farmacológica, evitando que altas dosagens possam acarretar em outros inconvenientes, como, por exemplo, odor forte e modificação na palatabilidade do alimento em que for adicionada ou mesmo alterar a sensibilidade dos microorganismos aos óleos e até mesmo ter ação tóxica sobre os animais.

No entanto, discute-se atualmente que as diferenças na sensibilidade de agentes microbianos a óleos essenciais e outros compostos descritas na literatura estão associadas também à metodologia adotada, como a extração dos compostos ativos (Radulovick *et al.*, 2013; Othman *et al.*, 2011). Acredita-se que a atividade antimicrobiana é dependente de vários alvos de ação dos óleos na célula que podem potencializar a atividade (Negi, 2012),

indicando que a comparação entre estudos deve ser criteriosa.

Os óleos essenciais de Alecrim-pimenta (*Lippia organoides*) e de Rosmaninho (*Lippia rotundifolia*) apresentaram resultados significativos como antimicrobianos frente às enterobactérias isoladas. O Alecrim-pimenta mostrou atividade mesmo à concentração mais baixa do óleo (40µL/mL). O Rosmaninho obteve maior eficácia na concentração de 160µL/mL. Tais resultados indicam o potencial de uso dos óleos essenciais dessas plantas em rações para aves como produto alternativo aos antimicrobianos convencionais.

Palavras-chave: óleos essenciais, produtos naturais, promotores de crescimento, frangos de corte

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of essential oils on enterobacteria Escherichia coli and Staphylococcus aureus isolated from poultry fecal samples in the cloaca from 49 laying hens. To analyze the antimicrobial sensibility an agar diffusion susceptibility test was performed and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericida Concentration (MBC) of Lippia organoides and Lippia rotundifolia essential oils was determined. The concentrations used were 160, 80 and 40 µL/mL. The L. organoides essential oil showed antimicrobial effect from 40 µL/mL dose against both microorganisms, with larger efficiency in E. coli. The L. rotundifolia essential oil was more efficient at the concentration of 160µL/mL. Its effect was observed in all microorganisms. These results suggest that L. organoides oil is more effective than L. rotundifolia oil in inhibiting the growth of microorganism isolated from poultry, although it also has a satisfactory antimicrobial effect. Results indicate the potential use of these plant's essential oils in poultry feed as an alternative to conventional antimicrobial products.

Keywords: essential oils, herbs, growth promoters, broilers

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), CNPq, PROBIC/FAPEMIG e UFMG/PRPq pelo suporte financeiro e concessão de bolsas de pesquisas na execução deste projeto.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, V.A., ALMEIDA, A.C., SOUZA, D.S. *et al.* Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of *Lippia organoides*. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.34, p.1153-1161, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 265 p., 18 de setembro de 2003.

LEITÃO, S.G.; CASTRO, O., FONSECA, E.M. *et al.* Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.16, p.6-11, 2006

METODOLOGIA dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: norma aprovada – sexta edição. NCCLS documento M7-A6, v.23, n.2, 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM7_A6.pdf. Acessado em: 20 jan. 2014.

NEGI, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *Int. J. Food Microbiol.*, v.156, p.7-17, 2012.

OTHMAN, M.; LOH, H.S.; WIART, C. et al. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *J. Microbiol. Methods*, v.84, p.161-166, 2011.

PADRONIZAÇÃO dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada - oitava edição. NCCLS documento M2-A8,v.23, n.1, 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acessado em: 20 jan. 2014

PRAXEDES, C.I.S.; ZÚNIGA, N.O.C.; BASTOS, P.A.M.B. et al. Identificação de *Enterobacteriaceae* da microbiota intestinal de frangos de corte submetidos a dieta com nitrofuranos. *Rev. Bras. Cienc. Vet.*, v.19, p.46-49, 2012.

QUINTÃO, C.C.R.; SERAPIÃO, R.V.; SINGULANI, J.L. et al. Citotoxicidade de *Lippia Lacunosa* e *Lippia Rotundifolia* em fibroblastos bovinos por diferentes métodos. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 24., 2009, Águas de Lindóia. *Anais... Águas de Lindóia: FESBE*, 2009.

RADULOVIĆ, N.S.; MLADENOVIĆ, M.Z.; BLAGOJEVIĆ, P.D. et al. Toxic essential oils. III. Identification and biological activity of new allylmethoxyphenyl esters from a Chamomile species (*Anthemis segetalis* Ten.). *Food Chem. Toxicol.*, v.62, p554-565, 2013.

ROSTAGNO, M.A.; PRADO, J.M. *Natural product extraction: principles and applications*. Londres: Royal Society of Chemistry, 2013. 500p. Disponível em <http://dl.1chemist.ir/ebook/chemistry/0061-book-2013-8091.%5B1chemist.ir%5D.pdf>. Acessado em 1 jan.2014.