

AValiação da Ação de Diferentes Antimicrobianos Naturais Contra Microrganismos Patogênicos

Evaluation of the action of different natural antimicrobials against pathogenic microorganisms

Resumo:

O objetivo desse estudo foi avaliar a ação antimicrobiana de méis e especiarias contra microrganismos patogênicos (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Quatro amostras de méis e sete de especiarias foram adquiridas no comércio de Garanhuns, Pernambuco. Os méis foram pasteurizados e em seguida diluídos diferentes concentrações (100%, 75% e 50%). Um extrato hidroalcoólico foi preparado com especiarias (pimenta calabresa, gengibre, tomilho, alecrim, orégano, cravo-da-índia, canela, manjeriço e sálvia). Também foram realizadas associações com os extratos dessas. Os resultados desse experimento mostraram que os méis em suas diferentes concentrações demonstraram atividade inibitória contra *S. aureus* e *E. coli*, mas não contra a *S. enteritidis*. A amostra M4 a 75% apresentou maior halo contra o *S. aureus*. O extrato obtido de canela foi o único capaz de inibir os três tipos de microrganismos. O extrato de orégano apresentou maior halo, medindo 21 mm frente ao mesmo microrganismo.

Abstract:

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial action of honeys and spices against pathogenic microorganisms (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 14028 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Four samples of honeys and seven of spices were obtained from Garanhuns, Pernambuco. The honeys were pasteurized and then diluted to different concentrations (100%, 75% and 50%). A hydroalcoholic extract was prepared with spices (calabrian pepper, ginger, thyme, rosemary, oregano, cloves, cinnamon, basil and sage). It was also made associations with those extracts. The results of this experiment showed that the honeys in its different concentrations demonstrated inhibitory activity against *S. aureus* and *E. coli*, but not against *S. enteritidis*. The sample M4 to 75% presented the greater halo against *S. aureus*. The extract obtained from cinnamon was the only one able to inhibit the three types of microorganisms. The extract of oregano presented greater halo, measuring 21 mm in front of the same microorganism.



Juan Carlos da Silva Nascimento, Marilene da Silva Lima, Krause Gonçalves Silveira Albuquerque, Gerla Castello Branco Chinelate, José Jonas Cavalcante Silva¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns.
E-mail: juankarlos25@gmail.com

Contato principal

Juan Carlos da Silva Nascimento¹



Palavras chave: Mel, Especiarias, Atividade Antimicrobiana

Keywords: Honey, Spices, Antimicrobial Activity.



INTRODUÇÃO

O uso de antimicrobianos extraídos de vegetais e de origem animal foi uma alternativa terapêutica criada por povos indígenas e da Ásia, há milênios, e tem-se fortalecido nas últimas décadas, impulsionando as pesquisas sobre novos compostos, particularmente contra microrganismos multirresistentes. Nesse contexto, os experimentos têm evidenciado os potenciais antimicrobianos de diferentes espécies de folhas, frutas, méis, oleaginosas e sementes (STEFANELLO et al., 2016; LUND et al., 2009). Entretanto com os avanços industriais e a necessidade de produção em grande escala, foram surgindo os antibióticos sintéticos e semissintéticos, hoje responsáveis pela maior parte dos antimicrobianos comercializados pelas indústrias farmacêuticas e utilizados pelas indústrias de alimentos.

A utilização indiscriminada e irracional destes compostos iniciou processo de resistência microbiana aos antibióticos comerciais e com alta capacidade patogênica, o que remete a necessidade da intensificação das pesquisas na área e o controle do uso desses fármacos. Segundo Davidson e Harrison (2002) esta resistência é resultado, principalmente pelo uso irracional dos antimicrobianos como também, a utilização constante de conservantes, na produção de alimentos. De acordo com Fio, Mattos Filho e Groppo 2000, é consenso que o número crescente de microrganismos patogênicos que vem desenvolvendo resistência a estes compostos. As bactérias podem conter genes que codificam a produção de enzimas com propriedades de clivar ou promover alterações estruturais na molécula, como as betalactamases. Essas enzimas causam a hidrólise dos derivados betalactâmicos, alterando a configuração molecular do antibiótico, tornando-o incapaz de se ligar ao seu sítio receptor. Assim, o medicamento fica impossibilitado de inibir a síntese da parede celular bacteriana; dessa forma, a bactéria continua seu ciclo reprodutivo normalmente (ARAÚJO, 2016).

Em função da relevância que a resistência microbiana, principalmente bacteriana, aos antibióticos sintéticos, tornou relevante a retomada dos estudos em busca de novas substâncias fitoterápicas, em busca do controle dos microrganismos patogênicos.

O mel de abelhas sem ferrão tem sido uma das principais alternativas terapêuticas, no controle de patógenos, principalmente em zonas rurais, graças a sua função medicinal (CARPES et al.2009). Ele, assim como os demais produtos das abelhas, está associado a uma imagem de produto saudável, sendo atribuídas propriedades medicinais como atividade antimicrobiana e antifúngica. Este é amplamente utilizado por suas características energéticas, principalmente pelo seu poder adoçante. Rico em vitaminas e polifenóis e minerais, ele é muito utilizado como suplemento alimentar (BOGDANOV, 2006; MOLAN, 1999). Seu uso na medicina como um agente terapêutico de 2100 anos antes de Cristo (ALMASAUDI et al., 2016). Na América, ainda antes de Cabral, substâncias produzidas pelas abelhas

eram apreciadas como alimento ou utilizadas na medicina. A ação antimicrobiana do mel de abelha despertou o interesse da comunidade científica, particularmente em casos clínicos (BALLIVIÁN, 2008; GONÇALVES, ALVES FILHO, MENEZES, 2005). Alguns estudos têm demonstrado seu efeito benéfico quanto à ação antibacteriana e antifúngica no controle de infecções causadoras de otite, infecções urinárias e vaginal (SILVA et al., 2015; GONÇALVES, ALVES FILHO, MENEZES, 2005).

Dentro da indústria alimentícia existe uma forte utilização de aditivos químicos com a finalidade de inibir o crescimento de patógenos e deteriorantes. Algumas alternativas comprovadas para a substituição destes produtos são ervas e temperos, tais como: cravo (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum verum*), coentro (*Coriandrum sativum*), alho (*Allium sativum*), gengibre (*Zingiber officinale*), tomilho (*Thymus vulgaris*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e sálvia (*Salvia officinalis*). Estes podem ser utilizados tanto *in natura* como também nas formas de extratos, farinhas e óleos essenciais, os quais têm possibilidade de aplicação direta ou indireta, na forma de ingrediente na constituição de determinados alimentos. O presente trabalho tem por finalidade avaliar a capacidade antimicrobiana de diferentes agentes antimicrobianos naturais contra microrganismos patogênicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esse experimento foi realizado no Laboratório de Ensino de Biologia Animal UFRPE, Unidade Acadêmica de Garanhuns. As amostras de méis (M1, M2, M3 e M4) foram adquiridas em feiras-livres da cidade de Garanhuns, Pernambuco durante o mês de fevereiro do ano de 2017. Em seguida as amostras foram congeladas a -18 °C para as análises futuras. Os extratos dos méis foram preparados em três concentrações distintas (100%, 75% e 50%) utilizando caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) estéril. As amostras passaram por processo de pasteurização a 57 °C durante 120 minutos em banho-maria e posteriormente resfriada a -5° C imediatamente. Em seguida, os extratos foram armazenados a -18 °C para posterior realização do teste antimicrobiano.

Nesse experimento foram utilizadas as especiarias: canela (CAN) (*Cinnamomum verum*), cravo (CRV) (*Syzygium aromaticum*), pimenta calabresa (CAL) (*Capsicum baccatum*), orégano (ORE) (*Origanum vulgare*), gengibre (GEN) (*Zingiber officinale*), manjeriço (MAN) (*Ocimum basilicum*) e sálvia (SAL) (*Salvia officinalis*). Foi produzido um extrato hidroalcolico para cada uma delas. Para a produção do extrato, foram trituradas 25 gramas de cada especiaria e em seguida adicionados de 100 mL de uma solução de álcool etílico a 50% em *Erlenmayer*. Estes foram levados ao banho-maria a 60 °C durante 60 minutos. Posteriormente foi realizada filtração em papel de filtro estéril. A solução foi levada para evaporar em estufa a 40 °C até peso constante. O material foi

ressuspendido com água destilada estéril (10mL) (PINHO et al., 2012). Foram preparadas associações dos extratos canela+cravo (CAN/CRA), gengibre+cravo (GEN/CRA), sálvia+orégano (SAL/ORE), utilizando a proporção 1:1. Todas as amostras foram mantidas sob congelamento a -18 °C até o momento das análises.

Foram utilizados os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enteritidis* ATCC 14028 para testar a atividade antimicrobiana dos extratos. Os microrganismos foram adquiridos do laboratório de microbiologia do CENLAG, UFRPE e mantidos sob congelamento a -18 °C em caldo BHI. A reativação dos mesmos ocorreu 48 horas, antes do experimento, utilizando caldo BHI.

Para preparo do inóculo, todas as bactérias, nesse experimento, foram previamente repicadas em caldo BHI e incubadas a 37 °C por 24 horas antes do teste. A suspensão bacteriana foi preparada em tubos com solução salina a 0,85% até a turbidez conforme padrão McFarland

0,5 (10⁸ UFC/mL) em espectrofotômetro a 580 nm.

O teste da atividade antimicrobiana foi realizado por difusão em ágar (metodologia dos poços). Cada inóculo bacteriano foi semeado em placas, contendo ágar *Muller Hinton*, através da técnica de esgotamento com *Swabs*. Em seguida foram feitos poços (6 mm) sobre o gel e inoculados 100µL de cada extrato produzido. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi medida através da medida dos halos de inibição. As análises foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados, da atividade antimicrobiana, dos diferentes méis, constam na Tabela 1. Conforme os dados, se observou que as amostras M1 e M2, na concentração de 100%, não demonstram inibição ao crescimento do *S. aureus*. As demais amostras demonstraram atividade contra a bactéria.

Tabela 1. Média dos halos (mm) da atividade antimicrobiana de méis comercializados na cidade de Garanhuns, PE

Microrganismos/Concentrações dos méis (%)	Amostras de méis			
	M1	M2	M3	M4
<i>S. aureus</i> 25923				
100	R	R	19	6
75	19	19	24	12
50	15,3	12	19	12
<i>E. coli</i> 25922				
100	22	22	15	16
75	R	16	19	23
50	R	10,6	11	19
<i>S. enteritidis</i> 14028				
100	R	R	R	R
75	R	R	R	R
50	R	R	R	R

R – microrganismo resistente; M1- amostra de mel 1; M2- amostra de mel 2; M3- amostra de mel 3; M4- amostra de mel 4.

Nos testes de inibição conta a *E. coli*, esta mostrou-se resistente a amostra M1, nas concentrações de 75% e 50%. O maior halo obtido (Figura 1B) com esse microrganismo ocorreu com a amostra M4 na concentração de 75% (23 mm de halo). De modo geral, os menores halos foram observados à medida que as amostras foram diluídas. Em um estudo utilizando diferentes concentrações de méis (10%, 20% e 50%) contra *S. aureus*, Almasaudi et al. (2016) também observaram esse comportamento. Quanto menos concentrado, menor a atividade antimicrobiana dos méis. Porém, foi observado, que as amostras, não inibiram o crescimento da *S. enteritidis*. Esses dados são semelhantes aos encontrados por Stachissini, Sekine e Umada et al. (2012) que também não observaram atividade inibitória do mel de abelhas jataí (*Tetragonista angustula*) frente a espécies de *Salmonella sp.* De acordo com Borsato et al. (2013), um dos fatores que contribui para a atividade antimicrobiana do mel, está no sistema glicose/oxidase com a formação do peróxido de hidrogênio, substância tóxica para a célula.

A resistência dessa bactéria também foi evidenciada nos

testes de inibição, utilizando as especiarias (Tabela 2), no qual se verificou que apenas o extrato obtido de canela (CAN) foi capaz de inibir o crescimento da *Salmonella enteritidis* (14 mm de halo) assim como do *S. aureus* e *E. coli*.

De maneira geral, observa-se, na Tabela 2, que a atividade antimicrobiana, dos extratos, pouco inibiu o crescimento das bactérias testadas. O extrato de pimenta calabresa (CAL), alecrim (ALE) e manjerição (MAN) não demonstraram atividade antimicrobiana nos três microrganismos testados, corroborando com os achados de Pinho et al. (2012) que também não evidenciaram o efeito inibitório dessas especiarias frente *E. coli* e *S. aureus* em seu experimento. O extrato do orégano apresentou maior halo de inibição (21 mm) frente ao *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 1A). Em um levantamento bibliográfico, sobre experimentos com ervas e seus efeitos antimicrobianos Tarcitano e Mesquita (2017) concluiu que o orégano foi a especiaria mais eficaz, utilizada no controle bacteriano. Segundo Marino, Bersano e Comi et al. (2001), A ação antimicrobiana observada nos extratos contendo orégano é devida principalmente a presença de

compostos fenólicos, biomoléculas capazes de transpor a membrana plasmática celular, chegando em seu interior e comprometendo suas funções vitais, podendo provocar inclusive, a morte do microrganismo.

Tabela 2. Média dos halos (mm) da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólico de especiarias adquiridas no comércio da cidade de Garanhuns, PE.

Especiarias	Microrganismos		
	<i>S. aureus</i> 25923	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. enteritidis</i> 14028
CAL	R	R	R
GEN	6	R	R
TOM	9	R	R
ALE	R	R	R
ORE	21	R	R
CRA	9	5,6	R
CAN	11	14,3	14
MAN	R	R	R
SAL	14	R	R
CRA/CAN	9	R	R
SAL/ORE	14	R	R
GEN/CRA	6	R	R

R- microrganismos resistentes à ação do extrato; **CAL-** pimenta calabresa; **GEN-** gengibre; **TOM-** tomilho; **ALE-** alecrim; **ORE-** orégano; **CRA-** cravo da índia; **CAN-**canela; **MAN-** manjerição; **SAL-** sálvia; **CAN/CRA-**canela+cravo; **GEN/CRA-** gengibre+cravo; **SAL/ORE-** sálvia+orégano.

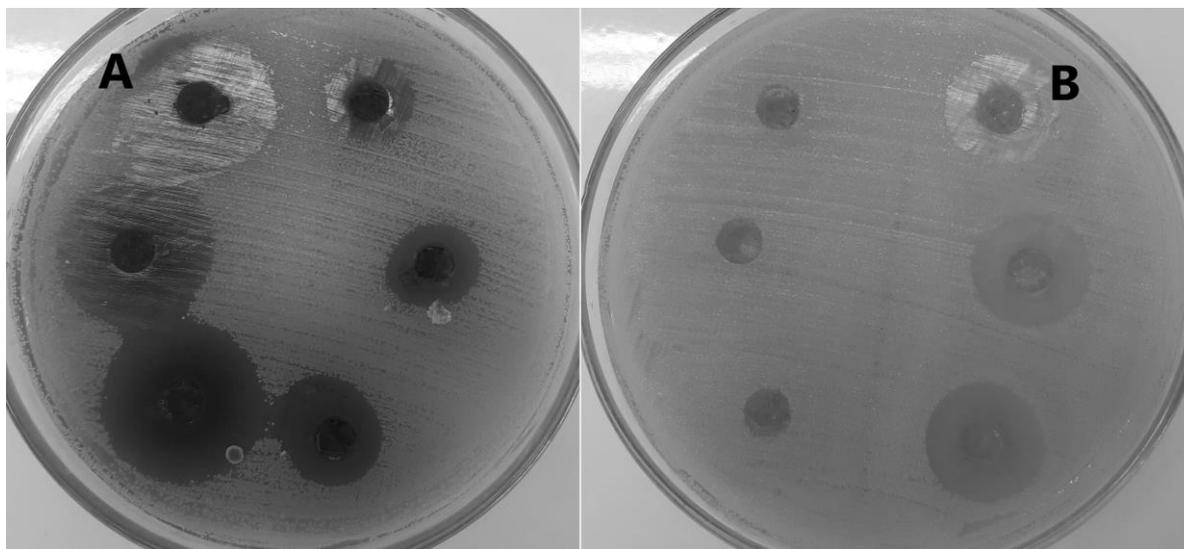


Figura 1. A- Halo de inibição (halos a esquerda da placa) do extrato de orégano frente ao *S. aureus* ATCC 25923. B- Halo de inibição (halos a direita da placa) da amostra M4, frente a *E. coli* 25922.

A espécie *E. coli* ATCC 25922 mostrou-se sensível apenas quando testados os extratos de cravo (CRA) e canela (CAN) com halos de 5, 6 e 14,3 mm, respectivamente. A *S. enteritidis* mostrou-se sensível apenas quando utilizado o extrato de canela, como citado anteriormente. Segundo Pinho et al. (2012) sugere que a concentração do extrato

assim como a qualidade dos vegetais testados, pode ser um dos motivos para ausência da atividade antimicrobiana.

Ainda, conforme os dados desse experimento foram observados que, as associações, entre as especiarias só mostrou atividade antimicrobiana quando utilizadas frente

ao *S. aureus* ATCC 25923. As demais bactérias foram resistentes. De acordo com Cunha (2006), a ação antimicrobiana de extratos de espécies vegetais, geralmente não se deve a apenas a uma substância, mas a diferentes, presentes em um mesmo vegetal. Essas substâncias geralmente são as de menor proporção na planta.

Em um estudo avaliando a ação antibacteriana de óleos essenciais Trajano et al. (2009) observaram que o óleo essencial de alecrim não apresentou atividade quando testados em *S. aureus* e *E. coli*. Um estudo realizado por Cruz e Pereira (2010) encontrou resultados contrários ao deste trabalho, onde o extrato de alecrim apresentou atividade antimicrobiana com halo de inibição superior a 20 mm, quando testado frente ao *S. aureus*.

CONCLUSÃO

Os resultados mostraram potencial de inibição contra *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922, entretanto não foram eficazes no controle da *S. enteritidis* ATCC 14028. Essa demonstrou resistência à maioria das amostras testadas. A amostra M4 a 75% apresentou melhor resultado dentre as amostras de méis testados. O extrato obtido com canela foi o único que apresentou atividade antimicrobiana nos três microrganismos testados. O maior diâmetro de halo foi obtido com o extrato do orégano quando testado frente ao *S. aureus*. Os dados apontam para o potencial dos antimicrobianos frente a microrganismos patogênicos. Entretanto fazem-se necessários estudos para aperfeiçoar a concentração dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMASAUDI, S. B.; AL-NAHARI, A. A. M.; EL-GHANY, E. S. M. A.; BARBOUR, E.; MUHAYAWI, S. M. A.; AL-JAOUNI, S.; AZHAR, E.; QARI, M.; QARI, Y. A.; HARAKEH, S. Antimicrobial effect of different types of honey on *Staphylococcus aureus*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, p. 1255-1261, 2017.

ARAUJO, M. M.; LONGO, P. Teste da ação antimicrobiana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 83, n. 1, p.1-7, 2016. Disponível em :<http://www.scielo.br/pdf/aib/v83/1808-1657-aib-83-e0702014.pdf>. Acesso em 15/09/2017.

BALLIVIÁN, J. M. P. P. Abelhas Nativas sem ferrão. São Leopoldo-RS. **Oikos**, 2008. 129p. Disponível em: <http://comin.org.br/static/arquivos-publicacao/abelhas-nativas-1229104261.pdf>. Acesso em: 01/09/2017

BOGDANOV, S. Contaminants of bee products. **Apidologie**, v. 37, n. 1, p. 1-18, 2006.

BORSATO, D. M.; ESMERINO, L. A.; FARAGO, P. V.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Atividade antimicrobiana de méis produzidos por meliponíneos nativos do Paraná (Brasil). **Boletim do CEPPA**, v. 31, n. 1, p. 57-66, 2013.

CARPES, S.T.; CABRAL, I.S.R.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; MASSON, M.L. Caracterização do potencial antimicrobiano dos extratos de pólen apícola da região sul do Brasil. **Revista Alimento e Nutrição**, v.20, n.2, p 217-277, 2009.

CUNHA, L. S. Avaliação de atividade antimicrobiana de extratos brutos de plantas do cerrado, substâncias isoladas e derivados semi sintéticos frente a microrganismos bucais. 2006. 170 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Universidade de Franca, Franca, 2006

CRUZ, P. B.; PEREIRA, C. A. M. Avaliação da presença de antimicrobianos naturais em condimentos industrializados. **Revista Simbio-logias**, v. 3, n.5, p. 125-131, 2010. Disponível em: <http://www.redesans.com.br/redesans/wp-content/uploads/2012/10/avaliacao-da-presen%C3%A7a-paraleitura.pdf>. Acesso em: 03/09/2017.

DAVIDSON, P.M.; HARRISON, A.M. Resistance and adaption to food antimicrobials, sanitizers and others process controls. **Food Technology**, v. 56, n. 11, p.69-78, 2002.

FIO, F.S.D.; MATTOS FILHO, T.R.; GROppo, F.C. Resistência bacteriana. **Revista Brasileira de Medicina**, v.57, n.10, 2000. Disponível em https://www.researchgate.net/profile/Fernando_DEL_FIO/publication/257645108_Resistencia_Bacteriana/links/0deec5323c888b5bec000000/Resistencia-Bacteriana.pdf. Acesso em: 15/09/2017.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel de abelha nativa sem ferrão *Nannotrigon testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Arquivos do instituto de Biologia**. São paulo, v. 72, n. 4, p. 455-459, 2005.

LUND, R.G.; DEL PINO, F.A.B.; SERPA, R.; NASCIMENTO, J.S.; SILVA, V.M.; RIBEIRO, G.A.; ROSALEN, P.L. Antimicrobial activity of ethanol extracts of *Agaricus brasiliensis* against mutants *streptococci*. **Pharmaceutical Biology**, v.47, p.910-915, 2009.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Laminaceae and Compositae. **Journal of Food Microbiology**, v.67, n.3, p. 187-195, 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/>

S0168160501004470. Acesso em: 02 de setembro de 2017.

MOLAN, P. C. Why honey is effective as a medicine. I. Its use in modern medicine. **Bee Word**, v. 80, n. 2, p. 80-92. 1999. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/2efa/7541f14672a1b5411c10b2e17ce9dc128dce.pdf>. Acesso 03/09/2017.

PINHO, L.; SOUZA, P. N.S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Atividade Antimicrobiana de Extratos hidroalcoolicos das Folhas de Alecrim-pimenta, Aroeira, Barbatimão, Erva baleeira e do farelo da casaca de Pequi. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.

STACHISSINI, M. G.; SEKINE, E. S.; UMADA, M. K. Potencial Antimicrobiano de Amostras de Mel de Jatá in natura e pasteurizado. XVII SICITE – SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA. UTFPR. 2012. Disponível em: <http://conferencias.utfpr.edu.br/ocs/index.php/sicite/2012/paper/viewFile/533/423>. Acesso em 02/01/2017

STEFANELLO, F. S.; CAVALHEIRO, C. P.; LUDTKE, F. L.; SILVA, M. S.; MILANI, L. G. KUBOTA, E. H. Efeito da extração de compostos fenólicos sobre a atividade antioxidante e antibacteriana in vitro de cogumelo-do-sol. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 83, n. 1, p.1-7, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/aib/v83/1808-1657-aib-83-e0522014.pdf>. Acesso: 15/09/2017.

SILVA, A. P. V.; ALENCAR, M. C. B.; MARACAJÁ, P. B.; CABRAL, S. A. de O.; SILVEIRA, D. C.; CARMO, E. S. Atividade antifúngica de mel de abelha plebeia c. Flavocineta contra *Aspergillus niger*. **Acta apícola brasileira**, v. 03, n.1, p. 01-09, 2015.

TARCITANO, J. A. C.; MESQUITA, E. F. M. Ação dos condimentos alimentares in natura sobre a microbiota patógena durante o processamento, preparo e/ou consumo do pescado: Uma revisão sistemática de literatura, **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 50, n.1, p. 141-162, 2017.

TRAJANO, V.N.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; TRAVASSOS, A.E.R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v., 29, n.3, p. 542-545, 2009.