

INIBIÇÃO DE *Salmonella* POR EXTRATO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*) II - EFEITO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E AQUOSO¹.

Maria Célia Lopes Torres *
Alonso Salustiano Pereira **
Magdala Alencar Teixeira **
Paulo César Stringheta ***

RESUMO

Estudou-se os efeitos inibidores do extrato etanólico e do extrato aquoso de alecrim, obtidos em Soxhlet e após aquecimento a 121°C por 10 minutos respectivamente, sobre sete espécies de *Salmonella* isoladas de frangos.

Determinou-se a presença do princípio ativo bactericida do alecrim nos extratos aquoso e etanólico, sua concentração com efeito inibidor sobre *Salmonella*, "in vitro", e a ocorrência de um possível sinergismo entre o extrato de alecrim e os componentes do meio.

Verificou-se que o princípio ativo inibidor do alecrim concentra-se no extrato etanólico e que este efeito é obtido quando o extrato é esterilizado junto com o caldo de soja triptica, ocorrendo sinergismo entre o extrato e os componentes do meio.

1. Aceito para publicação em agosto de 1986

* Professor auxiliar da UFG.

** Professor adjunto - UFVigosa.

*** Professor assistente - UFVigosa.

ABSTRACT

Inhibitory effects presented by ethyl alcoholic and aqueous extracts of rosemary were analysed, obtained in Soxhlet and after heating at 121°C for 10 minutes, respectively, on seven species of *Salmonella* isolated from chicken.

The presence of bactericidal active principle of rosemary in aqueous and ethyl alcoholic extracts, its concentration with inhibitory effect on *Salmonella*, "in vitro", and the occurrence of a possible synergism between rosemary extract and milieu components.

It was verified that inhibitory active principle of rosemary is concentrated in the ethyl alcoholic extract and that this effect is obtained when extract is sterilized together with triptic soy broth, occurring synergism between extract and milieu components.

INTRODUÇÃO

O uso de condimentos no controle de microrganismos em alimentos, especialmente em produtos cárnicos, tem recebido grande destaque por diversos pesquisadores. Os condimentos apresentam ação conservadora, inibindo ou retardando a atividade de diversos microrganismos, incluindo os patogênicos, bem como retardando a rancidez dos produtos (AL-DELAIMY, 1970; HEBBEL, 1980; SHELEF *et alii*, 1980).

As salmonelas são organismos patogênicos para o homem e para os animais (MOUNTNEY, 1966; PROST *et alii*, 1967). Seu principal habitat é o trato intestinal do homem e dos animais. Através de inúmeros veículos contaminam matérias-primas e alimentos processados. Entre estes, as carnes e seus derivados ocupam posição de destaque (LEITÃO, 1978; SWAMINATHAN *et alii*, 1978).

A prevenção da salmonelose, devido ao consumo de alimentos contaminados, pode ser feita pela melhoria das condições higiênicas, desde a obtenção da matéria-prima, passando pela industrialização até a comercialização e pela utilização de processos que limitem o crescimento bacteriano ou destruam formas patogênicas. Condimentos, em conjunto com boa sanitização, podem ser usados para prolongar a vida útil dos produtos susceptíveis à contaminação (NKANGA *et alii*, 1981; SILLEKER, 1980).

JULSETH & DEIBEL (1974), observaram a inibição do crescimento de *Salmonella* na presença de cravo, cebola, orégano e pimenta-da-jamaica.

O alecrim tem ação fungistática, bacteriostática, bactericida e antioxidante (CHANG et alii, 1977; FARBOOD et alii, 1976, McNEIL et alii, 1975; SILLEKER, 1980; ZAIKA et alii, 1983). Sua adição a carnes propiciou a redução do número de bactérias (CHANG et alii, 1977; McNEIL et alii, 1973). FARBOOD et alii (1976), usando a concentração de 1% de extrato de alecrim em carnes de frango, verificaram uma redução de 43,2% e de 99,9% do número de *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Diante da oxidação da gordura, da contaminação da carne de frango por *Salmonella* e das perspectivas de sua inibição pelo alecrim, foi conduzido este estudo, "in vitro", fazendo uso do extrato de alecrim para controlar *Salmonella*, com o objetivo de determinar a presença do princípio ativo bactericida do alecrim no extrato etanólico ou no extrato aquoso, sua concentração com efeito inibidor sobre *Salmonella* e a ocorrência de um possível sinergismo entre o extrato e os componentes do meio.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos (D.T.A.), da Universidade Federal de Viçosa.

As culturas de *Salmonella* utilizadas nos testes de inibição foram fornecidas pelo Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro. Foram utilizadas sete espécies de *Salmonella* isoladas de frangos, a saber: *S. agona*, *S. anatum*, *S. derby*, *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. saint paul* e *S. typhimurium*.

O alecrim desidratado foi adquirido de ITAL CONDIMENTOS, São Paulo.

Os meios de culturas usados para o crescimento e para a semeadura em placas foram o caldo de soja triptica (TSB) e agar de soja triptica (TSA), respectivamente, adquiridos de DIFCO LABORATORIES (1972).

Todas as espécies de *Salmonella* foram ativadas mediante repicagens sucessivas em meio TSB, incubando-se, a 35°C, e as culturas foram utilizadas, para inóculo, 12 horas depois.

Efeito do extrato etanólico na inibição de *Salmonella*

Foram feitas curvas de crescimento para as espécies de *Salmonella*, usando o TSB e incubando, a 35°C. Foi escolhida como referência a *Salmonella agona*, espécie de maior crescimento no meio selecionado. Determinou-se o volume do extrato etanólico com efeito inibidor sobre essa espécie de *Salmonella*, confirmando-se, posteriormente, esse efeito sobre as demais espécies.

Alíquotas de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 ml de extrato etanólico foram colocadas em erlenmeyers de 250 ml, que continham 100 ml de T.S.B. As amostras foram esterilizadas a 121°C, durante 15 minutos. Feita a esterilização, 1 ml de uma suspensão com cerca de 10^3 células de *Salmonella* em tampão de fosfato, foi inoculado no meio, resultando numa contagem inicial de, aproximadamente, 10 células/ml. Incubou-se, a 35°C. Com 6, 12, 24, 48 e 7 dias de incubação fizeram-se diluições decimais, usando-se solução tampão de fosfato esterilizada e semeadura em placas de Petri com T.S.A. As placas foram incubadas a 35°C, durante 48 horas e as colônias foram enumeradas em contador Quebec.

Fez-se um controle, incubando-se a mesma suspensão de *Salmonella* no T.S.B., sem a adição do extrato de alecrim.

Paralelamente, fez-se um controle com 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 ml de etanol, com a finalidade de verificar o efeito inibidor do etanol no desenvolvimento das espécies de *Salmonella*.

Para cada tratamento foram feitas duas repetições, cada uma em duplicata.

Obtenção e efeito do extrato aquoso no desenvolvimento de *Salmonella*.

Foram usadas quantidades do pó de alecrim correspondentes à concentração de sólidos solúveis determinada para o extrato etanólico, fazendo-se uma suspensão, com água destilada e aquecendo-se a 121°C durante 10 minutos (SHARMA *et alii*, 1981), e filtrando-se em lâ de vidro.

O volume resultante da filtração foi completado até 100 ml, com água destilada, adicionando-se, a seguir, 3 g de T.S.B. desidratado. As amostras foram esterilizadas, a 121°C, durante 15 minutos. Após, foi inoculado 1 ml de uma suspensão padronizada, com aproximadamente 10^3 células de *Salmonella* em tampão fosfato. Procedeu-se como descrito para o extrato etanólico.

Efeito da esterilização do extrato etanólico, conjunto e separadamente do TSB, na inibição das espécies de *Salmonella*.

Para a esterilização conjunta, tomou-se o meio T.S.B., adicionou-se a quantidade do extrato etanólico com efeito inibidor e esterilizou-se, a 121°C, durante 15 minutos.

Para a esterilização separada, o meio T.S.B. e o extrato foram colocados em erlenmeyers separados e esterilizados a 121°C, durante 15 minutos. Feita a esterilização, foram reunidos, assepticamente, num único erlenmeyer.

Após a esterilização conjunta e separada, procedeu-se como descrito para o efeito do extrato etanólico.

Identificação dos componentes do meio em interação com o extrato de alecrim.

Esta interação foi verificada por meio da esterilização conjunta do extrato etanólico separadamente da triptona, da peptona de soja, dextrose, cloreto de sódio e fosfato dipotássico. Os outros componentes foram esterilizados e, logo após, assepticamente reunidos num só frasco.

Cada amostra foi inoculada com 1 ml de uma suspensão com 10^3 células de *Salmonella* por ml. Procedeu-se como descrito para o efeito do extrato etanólico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO.

A concentração do extrato etanólico, com efeito inibidor para as espécies de *Salmonella* testadas foi de 0,53 g de sólidos solúveis por 100 ml de T.S.B., que correspondem a 5 ml de extrato líquido. Esta mesma concentração em extrato aquoso não inibiu totalmente as espécies de *Salmonella*. Pelo Quadro 1 podemos observar o efeito dos diversos tratamentos sob as espécies de *Salmonella*.

A esterilização conjunta do extrato aquoso e T.S.B., mostrou-se mais efetiva na inibição do que a esterilização separada do extrato etanólico e T.S.B. Supõe-se que no extrato aquoso ocorre alguma interação do T.S.B. com o alecrim. Entretanto essa interação não foi totalmente inibitória, possivelmente em razão da me

nor concentração do princípio ativo no extrato aquoso. Segundo WEBB & TANNER (1945), os óleos dos condimentos, em razão da maior concentração de princípio ativo, são mais diretos na ação preservativa do que os condimentos inteiros ou moídos.

Nos testes de controle com o etanol, pode-se verificar que este não interferiu no efeito inibidor do extrato de alecrim. Possivelmente, ocorreu a evaporação total do etanol quando se fez a esterilização a 121°C por 15 minutos.

O efeito da esterilização conjunta e separada do extrato etanólico e do TSB mostrou acentuada diferença na inibição das espécies de *Salmonella*. Quando se fez a esterilização conjunta, houve inibição total. Na esterilização em separado, as espécies de *Salmonella* foram apenas parcialmente inibidas. Conclui-se que houve alguma interação entre os constituintes do meio T.S.B. e algum composto presente no extrato de alecrim, interação responsável pela formação de um princípio bactericida para as espécies de *Salmonella*. Quanto à inibição parcial, quando o extrato de alecrim foi esterilizado separadamente do T.S.B., pode-se supor a ocorrência de um pequeno efeito inibidor ou de um maior período de adaptação das espécies de *Salmonella* ao meio. Esse efeito da esterilização no desenvolvimento das espécies de *Salmonella*, confirma os resultados obtidos por FARBOOD *et alii* (1976). Usando um extrato de alecrim para inibir *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, os aludidos pesquisadores notaram que o efeito do extrato de alecrim foi acentuado quando o extrato foi esterilizado junto com T.S.B. Atribuíram esse efeito a uma reação química entre o extrato e os constituintes do meio.

Os componentes do meio T.S.B. envolvidos na interação com o extrato etanólico foram a dextrose e o fosfato. A esterilização conjunta, de cada um (dextrose e fosfato), com o extrato etanólico inibiu totalmente as espécies de *Salmonella*, apresentando o mesmo comportamento da esterilização conjunta com o T.S.B. O efeito da triptona esterilizada em conjunto com o extrato etanólico foi inibidor para todas as espécies de *Salmonella*, com exceção da *Salmonella saint-paul*, que mostrou somente efeito parcial na inibição. A esterilização do extrato etanólico com a peptona foi inibidora somente para a *Salmonella anatum*. O cloreto de sódio esterilizado com o T.S.B. inibiu apenas parcialmente as espécies de *Salmonella*. FABIAN *et alii* (1939), observaram grande variação na resistência de diferentes microrganismos a um mesmo condimento e verificaram que a resistência de um microrganismo varia de acordo com os diferentes tipos de condimentos.

Quadro 1 - Efeito das espécies de *Salmonella* nos diversos tratamentos

TRATAMENTOS	ESPECIES DE SALMONELLAS									
	S. agona	S. anatum	S. derby	S. gallinarum	S. pullorum	S. saint-paul	S. typhimurium	S.	S.	S.
Esterilização conjunta TSB + extrato etanólico	+	+	+	+	+	+	+			
Esterilização conjunta TSB + extrato aquoso.	-	-	-	-	-	-	-			
Esterilização separada TSB e extrato etanólico	-	-	-	-	-	-	-			
Esterilização conjunta tryptona + extrato etanólico	+	+	+	+	+	+	+			
Esterilização conjunta peptonal + extrato etanólico	-	+	-	-	-	-	-			
Esterilização conjunta Dextrose + extrato etanólico	+	+	+	+	+	+	+			
Esterilização conjunta cloro to de sódio + ext. etanólico	-	-	-	-	-	-	-			
Esterilização conjunta fosfato + extrato etanólico	+	+	+	+	+	+	+			

+ = Totalmente inibidas

- = Parcialmente inibidas.

CONCLUSÃO

Conclui-se, que o extrato etanólico, quando foi feita a esterilização conjunta com o T.S.B., foi bactericida para todas as espécies de *Salmonella* e que a quantidade de extrato aquoso correspondente ao extrato etanólico mostrou apenas pequeno efeito inibidor.

Observou-se, também, uma interação do meio T.S.B. com o extrato etanólico de alecrim onde a dextrose e o fosfato foram os componentes do meio identificados como coadjuvantes do extrato de alecrim na inibição de todas as espécies de *Salmonella*.

LITERATURA CITADA

- AL-DELAJMY, K.S. & ALI, S.H. Antibacterial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria. J.Sci.Agric., 21(2): 110-112, 1970.
- CHANG, S.S.; OSTRIC-MATIJASEVIC, B.; HSIEH, D.A.; HUANG, C. Natural antioxidants from rosemary and sage. J.Food.Sci. 42(4):1102-1106, 1977.
- DIFCO MANUAL OF DEHYDRATED CULTURE MEDIA AND REAGENTS FOR MICROBIOLOGICAL AND CLINICAL LABORATORY PROCEDURES 9th ed. Detroit Michigan, Difco Laboratories, 1972. 350 p.
- FABIAN, F.W.; KREHL, C.F.; LITTLE, N.W. The role of spice in Pickled-food spoilage. Food Res., 4(1): 269-288, 1939.
- FARBOOD, J.H.; McNEIL, J.B.; OSTOVAR, K. Effect of rosemary spice extractive on growth of microorganism in meat. J.Milk Food Technol. 39(10):675-679, 1976.
- HEBBEL, S.H. Las especiarías. Santiago, Chile, Editorial Universitaria, 1980. 193 p.
- JUSELTH, R.M. & DEIBEL, R.H. Microbial profile of selected spices and herbs at import. J.Milk Food Technol. 37(8):414-419, 1974.
- LEITÃO, M.F.F. Microorganismos patogênicos na carne e derivados. In: ITAL. Curso internacional sobre tecnologia da carne. Campinas, SP, 1978. Cap. 12, p. 1 - 24.

- McNEIL, J.H.; DIMICK, P.S.; MAST, M.G. Use of chemical compounds and a rosemary spice extract in quality maintenance of deboned poultry meat. J. Food Sci., 38(4): 1080-1081, 1973.
- MOUNTNEY, G.J. Poultry products technology. Westpoint. Conn. AVI, 1968, 264 p.
- NKANGA, E.J. & URAIH, N. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in meat samples from traditional markets in Benin City, Nigeria, and possible control by use of condiments. J. Food Prot., 44(1): 4 - 8, 1981.
- PROST, E & RIEMANN, H. Food borne Salmonellosis. Ann.Rev.Microbiol. 21:495-528, 1967.
- SHARMA, A.; PADWALL-DESAI, S.R.; TEWARI, G.W.; BANDYOPADHYAY, C. Factors affecting antifungal activity of onion extractives against aflatoxin producing fungi. J.Food.Sci., 46(3): 741-744, 1981.
- SHELEF, L.A.; NAGLIK, O.A.; BOGEN, D.M. Sensitivity of some common food-born bacteria to the spices: sage, rosemary and allspice. J. Food. Sci. 45(4): 1042 - 1044, 1980.
- SILLEKER, J.H. Status of *Salmonella* ten years later. J.Food.Prot., 43(4):307-313, 1980.
- SWAMINATHAN, B.; LINK, M.A.B.; AYRES, J.C. Incidence of *Salmonella* in raw meat and poultry samples in retail stores. J. Food Prot., 41(7):518-520, 1978.
- WEBB, A.R. & TANNER, F.W. Effects of spices and flavoring materials on growth of yeast. Food Res., 19(7): 273-282, 1945.
- ZAICA, L.L.; KISSINGER, J.C.; WASSERMAN, A.E. Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. J. Food. Sci., 48(5): 1455-1458, 1983.