

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DOS ALIMENTOS**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CONDIMENTOS SOBRE  
*Escherichia coli* ISOLADAS DE SUÍNOS, AVES E  
BOVINOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Deise Flores Santurio**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CONDIMENTOS SOBRE  
*Escherichia coli* ISOLADAS DE SUÍNOS, AVES E BOVINOS**

**por**

**Deise Flores Santurio**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

**Orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leadir Lucy Martins Fries**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

S237a Santurio, Deise Flores  
Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos sobre Escherichia Coli isoladas de suínos, aves e bovinos / por Deise Flores Santurio. – 2011.  
54 f. ; 30 cm

Orientador: Leadir Lucy Martins Fries  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2011

1. Tecnologia dos alimentos 2. Escherichia coli 3. Óleos essenciais  
4. Atividade antimicrobiana I. Fries, Leadir Lucy Martins II. Título.

CDU 619: 636

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109  
Biblioteca Central UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria**  
**Centro de Ciências Rurais**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
CONDIMENTOS SOBRE *Escherichia coli* ISOLADAS DE  
SUÍNOS, AVES E BOVINOS**

elaborada por  
**Deise Flores Santurio**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Leadir Lucy Martins Fries, Dra.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Daniela Isabel Brayer Pereira, Dra.**  
(UFPel)

---

**Sydney Hartz Alves, Dr.**  
(UFSM)

Santa Maria, 03 de fevereiro de 2011.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por iluminar meu caminho e ter sempre me ajudado nos obstáculos da vida.

Aos meus pais Janio e Cléris pela dedicação, carinho, amor e incentivo, sem vocês jamais venceria essa etapa.

Ao meu esposo Marcelo pela paciência e amor dedicados.

A minha irmã Roberta e meu cunhado Nilmar por trazerem ao mundo a pequena Lorena que é uma benção de Deus em nossas vidas.

A minha orientadora Professora Leadir Lucy Martins Fries por sua amizade, disponibilidade, paciência e confiança.

Ao Professor Sydney Hartz Alves, pela amizade, apoio e sugestões recebidos na elaboração deste trabalho.

Ao Professor Mateus Matiuzzi da Costa por contribuir com materiais e conhecimentos para essa pesquisa.

Aos colegas do LAPEMI, pelo apoio durante esses anos.

A Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de realização desta pesquisa.

Ao CNPQ pela disponibilidade da bolsa de pesquisa.

Enfim, obrigado a todos, mesmo àqueles que não tenham sido citados, mas que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa .

## RESUMO

Avaliou-se a atividade antibacteriana dos óleos essenciais (OES) de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (orégano mexicano), *Zingiber officinale* (gengibre), *Salvia officinalis* (sálvia), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) frente a *Escherichia coli* sendo 31 isolados de suínos, 43 isolados de aves e 36 isolados de bovinos. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas através da técnica de microdiluição em caldo. Observou-se atividade antimicrobiana inferior ou igual à máxima concentração testada (6400µg/ml) para os óleos essenciais de orégano, orégano mexicano, tomilho, canela. Observou-se que o óleo essencial de orégano foi o que possuiu maior atividade sobre os microrganismos testados. O óleo essencial de canela apresentou menor atividade em relação aos demais óleos essenciais.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, óleos essenciais, atividade antimicrobiana

## ABSTRACT

This study evaluated the antimicrobial activity of the essential oils of *Origanum vulgare* (oregano), *Thymus vulgaris* (thyme), *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon), *Lippia graveolens* (Mexican oregano), *Zingiber officinale* (ginger), *Salvia officinalis* (sage), *Rosmarinus officinalis* (rosemary) and *Ocimum basilicum* (basil) against *Escherichia coli* 31 strains isolated from swine, 43 strains from poultry and 36 strains from cattle. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined for each isolate using the broth microdilution technique. Antimicrobial activity was observed with the maximum concentration tested (6400 µg/ml) or less for the essential oils of oregano, Mexican oregano, thyme and cinnamon; the oregano essential oil had the most potent activity against the evaluated microorganisms, whereas cinnamon essential oil had the lowest activity.

**Keywords:** *Escherichia coli*, essential oils, antimicrobial activity

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>9</b>
2.1 <i>Escherichia coli</i> : Aspectos microbiológicos.....	9
2.2 Infecção por <i>Escherichia coli</i> nos animais domésticos.....	9
2.2.1 Suínos .....	9
2.2.2 Aves .....	11
2.2.3 Bovinos .....	11
2.3 Emprego de antimicrobianos como “Promotores de Crescimento” e a pressão por sua substituição. ....	12
2.4 Óleos essenciais .....	12
2.5 Alternativas à terapêutica antimicrobiana clássica; o emprego dos óleos essenciais ....	13
2.5.1 <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Canela) .....	13
2.5.2 <i>Lippia graveolens</i> (Orégano mexicano) .....	14
2.5.3 <i>Ocimum basilicum</i> (Manjeriço) .....	14
2.5.4 <i>Origanum vulgare</i> (Orégano).....	15
2.5.5 <i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim) .....	15
2.5.6 <i>Salvia officinalis</i> (Sálvia).....	16
2.5.7 <i>Thymus vulgaris</i> (Tomilho).....	16
2.5.8 <i>Zingiber sp.</i> (Gengibre).....	17
<b>3 MANUSCRITO.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Manuscrito 1.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Manuscrito 2.....</b>	<b>30</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>



# 1 INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos. Esse microrganismo pertence à família *Enterobacteriaceae* e entre suas principais características destacam-se: bacilos Gram-negativos, não esporulados capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás. A maioria fermenta também a lactose, com produção de ácido e de gás, embora alguns sejam anaerogênicos (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Em suínos, *E.coli* manifesta sua patogenicidade de acordo com os sorotipos: colibacilose neonatal *E.coli* enterotoxigênica (ETEC), diarreia pós-desmame *E.coli* enterotoxigênica e *E.coli* enteropatogênica (ETEC e EPEC), doença do edema (EHEC), infecções urinárias e septicemias *E.coli* uropatogênica e *E.coli* enteroinvasiva (UPEC e EIEC) (CHOI & GIL 2005; BRITO et al., 1999).

Diarréias em leitões têm sido um dos principais problemas enfrentados pela produção de suínos. Em leitões recém-nascidos e desmamados, *E.coli* induz diarreia aguda e aquosa que pode ser seguida de bacteremia terminal, sendo uma importante causa de perdas econômicas aos suinocultores (DEBROY & MADDOX, 2001).

Nas diarréias em leitões, os isolados patogênicos demonstram ao menos um dos fatores de virulência: fímbrias K88-F4, K99-F5, 987P-F6, F16, F107 e F41, e toxinas LT, STa e STb. Por outro lado, isolados obtidos de casos de doença do edema possuem a fímbria F18 e a toxina STx2e. As *E.coli* associadas a infecções urinárias apresentam geralmente as fímbrias F1, FP (operon pap) e os fatores de virulência CNF1 e CNF2, bem como a hemolisina codificada pelo gene *hlyA* (BRITO et al., 2004).

A ocorrência de cepas toxigênicas de *E.coli* em humanos e bezerros com diarreia é bastante relatada, e os bovinos têm sido considerados um importante reservatório de Shiga like toxina (STX) produzida por cepas de *E.coli*, envolvidas em doenças humanas (SARIDAKIS et al., 1997).

*Escherichia coli* é um dos mais comuns patógenos em infecções de aves e é responsável por perdas econômicas para a indústria avícola. *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) abrange um conjunto específico de *E.coli* que causa doenças extra-intestinais como aerossaculite, pericardite e septicemia (BARNES, 2003).

Os agentes antimicrobianos são utilizados tanto no tratamento das infecções bem como aplicados às rações dos animais para preveni-las e melhorar o desempenho alimentar (BARCELOS & SOBESTIANSKY, 1998). Tais agentes, em concentrações subclínicas, são chamados de promotores de crescimento, pois atuam no controle profilático pela destruição dos patógenos além de inibirem microrganismos competidores e produtores de vitaminas. A presença de resíduos de antibióticos nos alimentos constitui-se num problema grave, pela exposição da microbiota humana a tais agentes e também pelo desenvolvimento de reações de hipersensibilidade (WALLMANN, 2006).

A atividade antimicrobiana de óleo essenciais e extratos de plantas tem tido muitas aplicações, incluindo conservação de alimentos crus e processados, produtos farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais (HAMMER et al., 1999).

A maior parte da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias e ervas aromáticas parece estar associada com compostos fenólicos (DAVIDSON & NAIDU, 2000). O efeito antimicrobiano está relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001).

Neste contexto, o presente estudo foi realizado tendo como objetivos:

- 1) Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais de condimentos *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (orégano mexicano), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (sálvia), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Zingiber officinale* (gengibre) sobre isolados de *Escherichia coli* de aves, bovinos e suínos.
- 2) Verificar a susceptibilidade dos isolados de *Escherichia coli* frente a antibacterianos diversos.
- 3) Avaliar se a atividade dos óleos essenciais de condimentos é variável em função da resistência e da virulência de *Escherichia coli* a antibacterianos diversos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Escherichia coli* : Aspectos microbiológicos

*Escherichia coli* é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos. Esse microrganismo pertence à família *Enterobacteriaceae* e entre suas principais características destacam-se: bacilos Gram-negativos, não esporulados capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás. A maioria fermenta também a lactose, com produção de ácido e de gás, embora alguns sejam anaerogênicos (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

*Escherichia coli* pode ser causa de doença septicêmica em potros, bezerros, leitões, filhotes de cães e cordeiros; de diarreia enterotoxigênica em neonatos de animais de produção; e de doença edematosa em suínos. Pode também ser oportunista em quase todas as espécies animais, como a doença do trato urinário, abscessos e pneumonia (HIRSH & ZEE, 2003).

### 2.2 Infecção por *Escherichia coli* nos animais domésticos

#### 2.2.1 Suínos

Em suínos, *E.coli* manifesta sua patogenicidade de acordo com os sorotipos: colibacilose neonatal (ETEC), diarreia pós-desmame (ETEC), doença do edema (EHEC), infecções urinárias e septicemias (UPEC e EIEC) (BRITO et al, 1999).

Diarreia em neonatos é causada por *E.coli* enterotoxigênica (ETEC) e frequentemente responsável por morbidade e mortalidade (FRANCIS, 2002).

A maioria das ETEC isoladas de suínos expressa 1 ou mais de 5 fímbrias chamadas K88 (F4), K99 (F5), F41, 987P (F6) e F18 (NAGY & FEKETE, 1999).

A colibacilose neonatal ocorre pela ingestão de bactérias de origem materna e ambiental, ausência das defesas naturais, como flora normal do intestino e barreira gástrica, presença de receptores para fímbria nos recém-nascidos e a alta susceptibilidade dos animais

às enterotoxinas produzidas por *E.coli* (GYLES & FAIRBROTHER,2004). Os sintomas são de diarreia aquosa e amarelada, resultado da desidratação. O curso é rápido, geralmente a desidratação e morte ocorrem em 4 a 24 horas. A mortalidade é alta. Nos casos mais graves, pode haver morte dos leitões afetados sem a observação de diarreia. Nesses casos, ocorre a desidratação aguda, com acúmulo de líquidos dentro do intestino delgado, podendo atingir volume equivalente a 30 a 40% do peso corporal (SOBESTIANSKY et al., 1999).

*Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) é um patógeno emergente que tem despertado interesse no meio acadêmico devido a sua relação com surtos de toxinfecções alimentares.

EHEC pode causar diarreia, diarreia com sangue, e síndrome hemolítica urêmica (HUS). O mais importante fator de virulência de EHEC é uma potente citotoxina denominada de shiga toxina ou verocitoxina (VT). Essa toxina pode também ser chamada como shiga like toxina (SLT) (KAPER et al.,1998).

Em suínos a doença do edema (DE) é uma toxi-infecção caracterizada pela ocorrência de sinais de disfunção neurológica, mortes súbitas e desenvolvimento de edemas, que afeta, principalmente leitões entre 4 a 15 dias após o desmame. A hipótese mais aceita para a patogenia, é que cepas patogênicas de *E.coli* aderem-se e proliferam no epitélio do intestino delgado de leitões susceptíveis, onde produzem a toxina VT-2e. Essa toxina é absorvida, e, na corrente sanguínea, causa injúria vascular sistêmica, com surgimento dos sintomas. Esse efeito da toxina parece ser retardado por cerca de 24 a 36 horas, após sua absorção, uma vez que suínos inoculados com a toxina desenvolvem hipertensão aguda cerca de 40 horas após, coincidindo com o surgimento dos sinais de ataxia (SOBESTIANSKY et al.,1999).

A *E.coli* uropatogênica (UPEC) é o mais freqüente agente infeccioso em infecções urinárias (KRAG et al.,2009). As infecções urinárias são a principal causa de descarte e mortalidade de animais adultos. O aparecimento das infecções urinárias depende da interação entre muitas variáveis, como microrganismo, manejo, alimentação, instalações e condição do animal. (BRITO et al., 2004).

Entre os fatores associados à patogenicidade de UPEC em humanos e suínos estão a produção de hemolisinas, aerobactinas, fímbrias não hemaglutinantes (987P), de hemaglutinação dependente da ausência de manose (HAMS) e de hemaglutinação não – dependente da presença ou ausência de manose (HAMR), presença de cápsula, resistência ao soro e produção do fator citotóxico necrotizante (CNF) (SILVEIRA et al., 2001, BRITO et al.,2004).

### 2.2.2 Aves

*Escherichia coli* é um dos mais comuns patógenos em infecções de aves, responsável por perdas econômicas para a indústria avícola. *Escherichia coli* (APEC) abrange um conjunto específico de *E.coli* patogênica que causa doenças extra-intestinais como aerossaculite, pericardite e septicemia (BARNES et al., 2003).

Aerossaculite observa-se o espaçamento dos sacos aéreos, presença de material espumoso e, em casos mais severos, formação de um exsudato caseoso com deposição de material fibrinoso amarelado. Condições de ambiente como ventilação deficiente, presença de pó, amônia e estresses podem favorecer ou agravar a manifestação de aerossaculite. Aves com septicemia podem manifestar mortalidade de forma súbita. As lesões mais características são esplenomegalia, fígado esverdeado e congestão muscular (BACK,2002).

Colibacilose é o termo que se utiliza para denominar infecções locais sistêmicas ou extraintestinais causadas por *Escherichia coli* consideradas patogênicas para aves. As aves podem albergar no trato digestivo muitas amostras não patogênica de *E.coli*, inclusive a *E.coli* O157:H7 que é uma amostra enterohemorrágica para humanos e que sintetiza toxinas potentes do tipo Shiga (ITO et al.,2007).

### 2.2.3 Bovinos

A ocorrência da *E.coli* toxigênica em humanos e bovinos com diarreia é bem documentada e os bovinos têm sido considerados um importante reservatório da Shiga like toxina (STX) envolvidas em doenças humanas (SARIDAKIS et al.,1997).

*E.coli* produtora de Stx-1 e/ou Stx-2 é causadora da colite hemorrágica (HC) e síndrome hemolite uremica (HUS) em humanos. Muitos casos de HC e HUS são causados pela ingestão de alimentos e bebidas contaminadas com fezes de bovino, especialmente hambúrgueres mal cozidos, salame ou outros alimentos como leite não pasteurizado ou queijos feitos com leite sem pasteurização. Infecções menos frequentes ocorrem dos bovinos para o homem ou de pessoa para pessoa (MAINIL, J.1999).

### **2.3 Emprego de antimicrobianos como “Promotores de Crescimento” e a pressão por sua substituição.**

Os agentes antimicrobianos são utilizados tanto no tratamento das infecções bem como aplicado às rações dos animais para preveni-las e melhorar o desempenho alimentar (BARCELOS & SOBESTIANSKY,1998). Tais agentes, em concentrações subclínicas, são chamados de promotores de crescimento, pois atuam no controle profilático pela destruição dos patógenos e inibem microrganismos competidores dos produtores de vitaminas. A adoção abusiva desses “promotores de crescimento” tem alertado pesquisadores e autoridades sanitárias para os potenciais riscos envolvidos nessas práticas. As possibilidades do desenvolvimento de patógenos multi-resistentes são eminentes; está bem definido que a transferência de genes entre bactérias pode transmitir esta resistência, favorecendo o estabelecimento de um quadro sombrio e preocupante. A presença de resíduos de antibióticos nos alimentos constitui-se num problema grave pela exposição da microbiota humana a tais agentes e também pelo desenvolvimento de reações de hipersensibilidade (WALLMANN,2006). Essa preocupação se estende também a outros setores como aqüicultura, especialmente nas regiões onde dejetos da produção suinícola são empregados para alimentação de peixes e camarões (CABELLO, 2006).

### **2.4 Óleos essenciais**

De acordo com a Resolução CNNPA, nº 12, de 1978, condimentos ou temperos são produtos constituídos de uma ou diversas substâncias sápidas, de origem natural, com ou sem valor nutritivo, empregados nos alimentos com o objetivo de modificar ou exaltar o seu sabor (Resolução CNNPA nº12 de 1978). Óleos essenciais, conforme a ISO 9235:1997 (International Standard Organization), são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d’água, bem como os produtos obtidos pelo processamento mecânico dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, normalmente odoríferas e líquidas (ISO 9235, 1997). A grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo estes preponderantes. (SIMÕES et al., 1999).

A atividade antimicrobiana de óleos de plantas e extratos tem tido muitas aplicações, incluindo conservação de alimentos crus e processados, produtos farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais (HAMMER et al., 1999).

A maior parte da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias e ervas aromáticas parece estar associada com compostos fenólicos (DAVIDSON & NAIDU, 2000). O efeito antimicrobiano está relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001).

## **2.5 Alternativas à terapêutica antimicrobiana clássica; o emprego dos óleos essenciais**

A utilização de extratos vegetais e plantas medicinais pelo homem data de milhares de anos, sendo muito difundida no Egito Antigo, na China, na Índia e na Grécia (KAMEL et al., 2000). Os principais efeitos exercidos pelas plantas podem ser explicados pela presença e constituição de seu(s) princípio(s) ativo(s). Na formulação das rações, recomenda-se a utilização de uma combinação de diferentes extratos herbais, reforçados com seus princípios ativos, para atingir resultados técnicos satisfatórios (BRUGALLI, 2003).

### **2.5.1 *Cinnamomum zeylanicum* (Canela)**

O óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) tem no cinamaldeído sua fração principal, acompanhada de ácido cinâmico, eugenol e linalol; apresenta atividade antimicrobiana e antiviral já comprovadas (LORENZI & MATOS, 2002).

Höferl et al. (2009) encontraram fraca atividade do *C. zeylanicum* frente a bactérias gram-negativas. Trajano et al. (2009) relataram que *C. zeylanicum* inibiu bactérias isoladas de alimentos com formação de halos de inibição de até 30mm de diâmetro.

### 2.5.2 *Lippia graveolens* (Orégano mexicano)

*Lippia graveolens*, pertence à família das Verbenaceae, popularmente denominada orégano mexicano, cultivada em alguns países da América central, México e nos estados do Texas e Novo México dos Estados Unidos, está documentado na Farmacopéia Mexicana e nos registros do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA) (CÁCERES et al., 1999). Vernin et al. (2001) investigaram a composição dos óleos essenciais de *Lippia graveolens* através de CG e CG-EM identificando que os dois constituintes majoritários foram carvacrol (71% e 34,6%) e timol (5 e 7%).

Pozzatti et al. (2008) encontraram forte atividade antifúngica frente a diversas espécies de *Candida spp*; com CIMs  $\leq$  800  $\mu\text{g/ml}$  para um óleo essencial de orégano mexicano composto por carvacrol (56,8%) e o-cymene (32,2%). Xu et al. (2008) concluíram que o mecanismo de ação do carvacrol contra *Escherichia coli* do carvacrol e timol é o rompimento da membrana plasmática.

### 2.5.3 *Ocimum basilicum* (Manjericão)

Pertencente à família *Lamiaceae*, é também conhecido como alfavaca, apresenta propriedades medicinais como analgésica, antitérmica, antiséptica, digestiva, expectorante, sedativa ([www.plantamed.com.br](http://www.plantamed.com.br)).

Possui ação contra infecções bacterianas e parasitárias. Seu óleo essencial é composto de timol, metil-chavicol, linalol, eugenol e cineol (LORENZI & MATOS, 2002).

*O. basilicum* contendo 28,1% de eugenol apresentou inibição moderada contra *Staphylococcus aureus*. (SARTORATTO et al., 2004). Bagamboula et al. (2004) relataram que o manjericão foi menos ativo que o tomilho contra *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri*, provavelmente porque o manjericão testado não continha carvacrol ou timol em sua composição. Yonzon et al. (2005) estudaram *O. basilicum* de procedência do Nepal e este apresentou atividade contra *Escherichia coli* e *Candida albicans*.



#### 2.5.4 *Origanum vulgare* (Orégano)

Pertence à família *Lamiaceae*, é originária dos países mediterrâneos, também conhecida como manjerona brava. As propriedades medicinais são expectorantes, antioxidante, diurética, antiséptica, calmante e tônico digestivo. Seu óleo essencial é rico em carvacrol, timol e terpineol (CÁCERES, 1999).

Höferl et al. (2009) encontraram forte atividade do óleo essencial de *O. vulgare* contra *Escherichia coli*. Silva et al. (2010) relataram que o óleo essencial de orégano proveniente do Mediterrâneo com p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno além de carvacrol, apresentou maiores halos de inibição para *Salmonella enteritidis* que os óleos essenciais de orégano de outras regiões. Santurio et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela. O óleo essencial de orégano, de composição química desconhecida, apresentou forte atividade antimicrobiana (CIM média = 529  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e CBM média = 661  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) frente a diversos sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola.

#### 2.5.5 *Rosmarinus officinalis* (Alecrim)

Pertencente à família *Lamiaceae*, é originária de países do mediterrâneo, é também cultivada no Brasil. Entre as propriedades medicinais é conhecida a antiséptica.

Foram identificados 33 compostos químicos no óleo essencial de alecrim; os principais foram  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol, cânfora, verbenona e borneol, constituindo cerca de 80% do total do óleo (SANTOYO et al., 2005).

Poiana et al. (2008) estudaram o óleo essencial de alecrim, assim como outros óleos este possuindo como principais constituintes em sua composição 1,8 cineol, cânfora e borneol, apresentou ação contra *Escherichia coli* e *S. aureus*. Trajano et al. (2009) relataram que os óleos essenciais de *R. officinalis*, *O. basilicum* e *Z. officinalis* apresentaram baixo espectro de ação sobre bactérias contaminantes de alimentos. Pozzatti et al. (2008) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de alecrim constituído por 1-8 cineol (23,61%), cânfora (26,31%),  $\alpha$ -pinene (19,81%), canfene (11,76%), limonene (5,41%). Os autores não evidenciaram atividade antifúngica do óleo essencial de alecrim frente a diversas cepas de *Candida ssp.*

### 2.5.6 *Salvia officinalis* (Sálvia)

A sálvia (*Salvia officinalis*) apresenta óleo essencial rico em terpenóides como tujona, cineol, cânfora, borneol, (LORENZI & MATOS, 2002).

Delamare et al. (2007) estudaram *S.officinalis* tendo como principais componentes  $\alpha$ -tujona (24,8%), 1,8-cineol (14,8%) e cânfora (10,9%), este inibiu o crescimento de *B.cereus*, *B.megatherium*, *B. subtilis*, *A. hydrophila*, *A.sobria*, e *K. oxytoca*, no entanto teve fraca atividade frente a *E.coli* e *S.aureus*.

Viuda-Martos et al. (2008) relataram atividade antibacteriana dos óleos essenciais de tomilho, sálvia, cominho, alecrim, cravo e orégano contra *S.xylosus*, *S. carnosus*, *E. gergoviae*, *E. amnigenus*, *L. sakei*, *L. curvatus*, sendo que para sálvia apresentou os seguintes halos de inibição: *S.xylosus* (28,76mm), *S.carnosus* (27,08 mm), *E. gergoviae* (29,68 mm), *E. amnigenus* (18,77 mm), *L. sakei* (23,05 mm), *L. curvatus* (21,55 mm). Pozzatti et al. (2008) procuraram a atividade antifúngica do óleo essencial de sálvia composto por cis-tujona (40,61%), trans-tujona (15,10%), cânfora (13,9%), 1-8 cineol (7,54%),  $\alpha$ -pinene (4,82%), cânfene (2,51%), borneol (2,21%). Os autores não evidenciaram atividade antifúngica do óleo essencial da sálvia frente a diversas cepas de *Candida spp*.

### 2.5.7 *Thymus vulgaris* (Tomilho)

Pertencente à família *Lamiaceae*, originária dos países mediterrâneos, suas propriedades medicinais são anti-diarréica, antigripal, anti-helmíntica, anti-virótica e antimicrobiana. Suas propriedades antimicrobianas estão relacionadas com o elevado teor de timol e carvacrol, compondo 40 a 50% do óleo essencial do tomilho (SIMÕES et al., 1999). Gutierrez et al. (2009) encontraram que o orégano e tomilho foram os mais efetivos óleos essenciais para inibição de *Listeria spp*. Pozzatti et al. (2008) encontraram na composição do óleo de tomilho composto por 64%  $\gamma$ -terpinene, timol (21 %), *o*-cimene (14%) e  $\alpha$ -pinene (1%). O óleo essencial apresentou atividade antifúngica frente diversas cepas de *Candida spp*. em CIMs variando de 400-3200  $\mu$ g/ml. Hammer et al. (1999) relataram a atividade do tomilho contra *C. albicans*, *S. aureus* e *E.coli* apresentando a concentração inibitória mínima de 0.03% (v/v) para os microorganismos citados.

### 2.5.8 *Zingiber sp.* (Gengibre)

Os rizomas do gengibre são constituídos de 1% a 2,5% de óleo essencial. Os componentes químicos presentes nos rizomas frescos são responsáveis pelo sabor forte, picante e ação antimicrobiana (LORENZI & MATOS, 2002). Hammer et al. (1999) encontraram que o óleo essencial de gengibre inibiu [ MIC 2% (v/v) ] *Staphylococcus aureus*, enquanto que para *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas sobria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, não houve inibição na maior concentração testada que foi de 2% (v/v). Pozzatti et al. (2008) verificaram a atividade antifúngica em um óleo essencial composto por zingiberene (20,81%), sesquifelandrene (10,45%),  $\alpha$ -farnesene (11,36%),  $\alpha$ -curcumene (9,25%), geranial (10,73%), neral (7,53%), canfene (5,65%). Os autores verificaram baixa atividade antifúngica; apenas 10% das cepas de diversas espécies de *Candida* apresentaram CIMs  $\leq$  3200  $\mu$ g/ml (maior concentração testada).

**3 MANUSCRITO**

### 3.1 Manuscrito 1

Manuscrito submetido à World Journal of Microbiology and Biotechnology

Antimicrobial activity of spice and herb essential oils against *Escherichia coli* isolated from swine.

Deise Flores Santurio<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

#### SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the antimicrobial activity of the essential oils of *Origanum vulgare* (oregano), *Thymus vulgaris* (thyme), *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon), *Lippia graveolens* (Mexican oregano), *Zingiber officinale* (ginger), *Salvia officinalis* (sage), *Rosmarinus officinalis* (rosemary) and *Ocimum basilicum* (basil) against 31 *Escherichia coli* strains isolated from swine. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined for each isolate using the broth microdilution technique. Antimicrobial activity was observed with the maximum concentration tested (6400 µg/ml) or less for the essential oils of oregano, Mexican oregano, thyme and cinnamon; the oregano essential oil had the most potent activity against the evaluated microorganisms, whereas cinnamon essential oil had the lowest activity.

This study determined that the oregano essential oil had the highest antimicrobial activity (MIC and MBC) compared to the essential oils of Mexican oregano, thyme and cinnamon. The susceptibility to essential oils was similar among subgroups of isolates and was independent of antimicrobial resistance and the presence of virulence factors.

Keywords: *Escherichia coli*, essential oils, antimicrobial activity, swine, minimum inhibitory concentration.

#### INTRODUCTION

*Escherichia coli* is the most predominantly studied species among facultative anaerobic microorganisms. This species belongs to the *Enterobacteriaceae* family and is defined by non-sporulating Gram-negative bacilli that are able to ferment glucose, resulting in the production of acid and gas. Most strains also ferment lactose to produce acid and gas, though some are anaerogenic (Franco and Landgraf 2003).

In swine, *E. coli* pathogenicity depends on its pathotype: neonatal colibacillosis (ETEC), post-weaning diarrhea (ETEC and EPEC), edema disease (EHEC) and urinary infections and septicemia (UPEC and EIEC) (Choi and Gil 2005; Brito et al. 1999).

Diarrhea in piglets has been a major problem in the swine industry. In newborn piglets and weaners, *E. coli* induces acute and watery diarrhea that can result in terminal bacteremia. This disease is a salient cause of economic losses for swine producers (Debroy and Maddox 2001).

Pathogenic isolates that cause diarrhea in piglets have at least one of the following virulence factors: fimbriae (K88-F4, K99-F5, 987P-F6, F16, F107 or F41) or toxins (LT, STa or STb). *E. coli* isolates obtained from cases of edema have F18 fimbriae and toxin STx2e, whereas those associated with urinary tract infections generally have the F1 and the FP (pap operon) fimbriae, CNF1 and CNF2 virulence factors and hemolysin encoded by the *hlyA* gene (Brito et al. 2004).

Antimicrobial agents are used to treat infections and are often added to animal feed to prevent disease and improve performance (Barcelos and Sobestiansky 1998). Such agents used at subclinical concentrations are called growth promoters because they prophylactically destroy pathogens, inhibit competing microorganisms and provide vitamins. The presence of antibiotics in food for human consumption constitutes serious problems of human exposure to the compounds and potential hypersensitivity reactions in consumers (Wallmann 2006). This concern also extends to other sectors, such as aquaculture, especially in regions where swine manure is used as fish and shrimp feed (Cabello 2006).

The antimicrobial activity of plant oils and extracts has many applications, including the preservation of raw and processed foods, pharmaceuticals, alternative medicine and natural therapies (Hammer et al. 1999). Most of the antimicrobial activity of the essential oils of spices and herbs appears to be associated with phenolic compounds (Davidson and Naidu 2000), and the antimicrobial effect is primarily due to changes in the permeability and integrity of the bacterial cell membrane (Lambert et al. 2001).

The objectives of this study were : a) to assess the in vitro antibacterial activity of essential oils from *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon) and *Zingiber officinale* (ginger), and the herbs *Lippia graveolens* (Mexican oregano), *Ocimum basilicum* (basil), *Origanum vulgare* (oregano), *Rosmarinus officinalis* (rosemary), *Salvia officinalis* (sage), and *Thymus vulgaris* (thyme) spices against *E. coli* isolated from swine, and b) to verify the resistance of *E. coli* isolates to various antimicrobials.

## MATERIALS AND METHODS

### *Microorganisms*

We studied 31 *E. coli* strains isolated from swine from the Laboratory of Animal Microbiology and Immunology of the Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). The following virulence factors of the pathotypes were previously characterized using multiplex PCR according to Nakazato et al. 2004: STa, STb, STx, LT, F107, F4, F41 and F5.

### *Antimicrobial susceptibility testing*

Antimicrobial susceptibility testing was performed using the agar diffusion method (CLSI M31-A3, 2008). It was evaluated the following commercially antimicrobials, obtained from DME (Araçatuba São Paulo, Brazil): ampicillin (10 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (25 µg), ceftriaxone (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), streptomycin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), ceftiofur (30 µg), amoxicillin (10 µg), amoxicillin/clavulanic acid (30 µg), imipenem (10 µg) and doxycycline (30 µg).

### *Essential oils*

Commercially obtained sealed amber vials containing 5 ml of the essential oils of cinnamon, Mexican oregano, basil, oregano, rosemary, sage, thyme or ginger were used (Essential 7.com; Roswell, New Mexico, USA).

### *Determination of minimal inhibitory concentrations*

A total of 1 g of each essential oil were diluted with methanol to a concentration of 640 mg/ml (solution I) and further diluted 1:100 in Mueller-Hinton broth to a concentration of 6400 µg/ml (solution II). The procedure to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) was based on the CLSI approved standard method (M7-A6, 2006). Thus, 100 µl of Mueller-Hinton broth was distributed to all wells of a microtiter plate. To perform the serial dilution, 100 µl of solution II was added to the first well and mixed. Then, 100 µl from the first well was transferred to the second, and the sequence was repeated to obtain final concentrations of 3200, 1600, 800, 400, 200 and 100 µg/ml.

*E. coli* colonies grown on Mueller-Hinton agar were diluted in 0.085% saline to the equivalent of the 0.5 MacFarland standard ( $1 \times 10^8$  CFU/ml). Then, 10 µl ( $1 \times 10^5$  CFU/ml) of

this suspension was inoculated in each well containing the essential oils. The microplates were incubated for 24 hours at 35°C under aerobic conditions. The MIC was defined as the lowest concentration of essential oil resulting in the complete inhibition of bacterial growth. These tests were performed in triplicate.

#### *Determination of minimum bactericidal concentrations*

The minimum bactericidal concentration (MBC) was defined as the lowest concentration of essential oil that killed the inoculating microorganisms. The MBC was determined by the absence of visible bacterial growth in wells after 24 hours of incubation. From these wells, a 10 µl aliquot was inoculated on Mueller-Hinton agar. After 24 hours of incubation at 35°C, the lowest concentration of essential oils that resulted in no bacterial growth was recorded. These tests were performed in triplicate.

#### *Statistical analysis*

The nonparametric Mann-Whitney test was used to determine whether groups had similar susceptibility patterns to a particular essential oil.

## RESULTS

The isolates in this study showed variations in their sensitivity to different essential oils. The geometric means for the MICs and MBCs against *E. coli* isolated from the feces and viscera of swine were the following: *O. vulgare* (MIC = 1463.1 µg/ml; MBC = 1564.6 µg/ml), *L. graveolens* (MIC = 2392.8 µg/ml; MBC = 2675.9 µg/ml), *T. vulgaris* (MIC = 2736.4 µg/ml; MBC = 2736.4 µg/ml) and *C. zeylanicum* (MIC = 5004.5 µg/ml; MBC = 5723.0 µg/ml) (Table 1).

Subgroups of isolates with similar number of virulence factors (Table 2) showed similar sensitivity ( $P>0.05$ ) to corresponding concentrations of each essential oil. There was no significant difference ( $P>0.05$ ) between resistotype subgroups A and B (Table 3).

The geometric mean of the MICs indicated that oregano essential oil was the most active ( $P<0.0001$ ). The essential oils of Mexican oregano and thyme were equally active (Table 1), whereas cinnamon essential oil was less active ( $P<0.001$ ) than oregano, Mexican oregano and thyme essential oils.



## DISCUSSION

The use of antimicrobial drugs for the control and prevention of bacterial diseases in swine is widespread. However, this practice results in the presence of antibiotic residue in food for human consumption and may contribute to the selection of bacteria that are resistant to these active ingredients (Dunlop et al. 1998).

The use of plants as medications evolved with humans, and, currently, plants are used as a source of raw materials for modern pharmacology. The inclusion of plant extracts in animal feed necessitates a low toxicity of compounds. Because of this requirement, interest has been renewed in the essential oils of plants traditionally used as condiments or spices (Brugali 2003).

Burt et al. (2003) observed that the essential oils of oregano and thyme had significant bacteriostatic and bactericidal activity against *E. coli* O157: H7, an important human pathogen with entero-hemorrhagic activity. Likewise, several studies have shown that essential oils of oregano, thyme and clove had strong activity against *E. coli* isolates (Smithpalmer et al. 1998; Hammer et al. 1999; Dorman and Deans 2000).

The broth microdilution technique used was based on the M7-A6 document of the CLSI (2006) to determine the MICs and MBCs of essential oils for the isolates. In contrast, other studies, such as Burt et al. (2003) and Dorman and Deans (2000), used the agar diffusion technique to evaluate the antimicrobial activity of essential oils from oregano and thyme, among others, and provided results for the diameter of inhibition (mm), which is not the recommended technique for this type of evaluation.

In the study by Henn et al. (2010), the MIC of oregano essential oil for *E. coli* isolated from swine was determined using the broth microdilution protocol according to AOAC (1995) to be 0.5 mg/ml; however, in that study, the authors used only one *E. coli* isolate, limiting the scope of the results.

Manjena and Muyema (1999) reported that rosemary (*R. officinalis*) has antimicrobial activity against *Acinetobacter* spp., *Shigella* spp., *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella Typhi*; while Delamare et al. (2007) observed activity of sage essential oil against *Staphylococcus* spp. However, in our study, ginger, basil, rosemary and sage essential oils showed antimicrobial activity only at concentrations greater than the maximum concentration evaluated (6400 µg/ml), indicating no activity against *E. coli* isolates under the tested conditions.

This study has highlighted the specificity of the activity of some essential oils on isolates of *E. coli*. Our results indicate that to replace growth promoters in swine feed, a combination of essential oils should be used .

## CONCLUSIONS

This study determined that the essential oils of oregano, Mexican oregano, thyme and cinnamon have bactericidal activity against *E. coli* isolated from swine; oregano essential oil had the highest antimicrobial activity (MIC and MBC) compared to the essential oils of Mexican oregano, thyme and cinnamon. The susceptibility to essential oils was similar among subgroups of isolates and was independent of antimicrobial resistance and the presence of virulence factors.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPQ (National Council for Scientific and Technological Development of Brazil ) for financial support.

## REFERENCES

- Barcellos D, Sobestiansk J (1998) Uso de antimicrobianos em suinocultura. 1ed. Goiânia: 103p.
- Brito BG, Leite DS, Linhares RE, Vidotto MC (1999) Virulence – associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* factors strains isolated from pigs. *Vet Microbiol* 65: 123-132.
- Brito BG, Vidotto MC, Berbel MM, Tagliari KC (2004) Fatores de virulência presentes em amostras de *E.coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. *Ciência Rural* 34: 645-652.
- Brugalli I (2003) Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Aves e Suínos Campinas, SP. Anais... 1:167-182.
- Burt SA, Reinders RD (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 36:162-167.
- Cabello FC (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture:a growing problem for human and animal health for the environment. *Environ Microbiol* 8:1137-1444.
- Choi BK, Gil-Turnes C (2005) Probióticos em avicultura. *Ciência Rural* 35: 741-747.

Clinical And Laboratory Standards Institute (2006) Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição. CLSI document M7-A6 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne,PA

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

Davidson PM, Naidu AS (2000) Phyto-phenol. In: Naidu, AS.(Ed.), Natural Food Antimicrobial Systems. CRC Press, Boca Raton, FL, 265–294

Debroy C, Maddox CW (2001) Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. Anim Health Res Rev 2:129–140.

Delamare APL, Pistorello IT, Artico L, Serafini L, Echeverrigaray S (2007) Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. Food Chem 100: 603-608.

Dorman HJD, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 88:308-316.

Dunlop RH, Mc Ewen SA, Meek AH, Black WD, Clarke RC, Friendship RM (1998) Associations among antimicrobial drug treatments and antimicrobial resistance of fecal *E. coli* swine on 34 farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. Prev. Vet. Med. 34:283-305.

Franco BDGM, Landgraf M (2003) Microbiologia dos Alimentos, São Paulo: Ed Atheneu, 182p.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol 86:985 – 990.

Henn JD, Bertol TM, Moura NF (2010) Oregano essential oil as food additive for piglets: antimicrobial and antioxidant potential. Rev Bras Zoot 39: 1761-1767.

Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas G-JE (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol 91: 453-462.

Mangena T, Muyima, NYO (1999) Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosemarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. Lett Appl Microbiol 28: 291-296.

Nakazato G, Gyles C, Ziebell K, Keller R, Trabulsi LR, Gomes TAT, Irino K, Silveira WD, Castro AFP (2004) Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Vet Microbiol* 101: 269-277.

Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L (1998) Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol* 26: 118-122

Walmann J (2006) Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. *Int J Med Microbiol* 41:81-86.

**Table 1** - Comparison of the antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare*, *Lippia graveolens*, *Thymus vulgaris* and *Cinnamomum zeylanicum*.

<sup>d</sup> EOs	<sup>a</sup> MIC (µg/ml)			<sup>b</sup> MBC (µg/ml)				
	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	<sup>c</sup> GM	Range	MBC <sub>50</sub>	MBC <sub>90</sub>	<sup>c</sup> GM
<sup>e</sup> <i>Ov</i>	800-1600	1600	1600	1463.1 <sup>C</sup>	800-3200	1600	1600	1564.6 <sup>C</sup>
<sup>f</sup> <i>Lg</i>	1600-3200	3200	3200	2392.8 <sup>B</sup>	1600-3200	3200	3200	2675.9 <sup>B</sup>
<sup>g</sup> <i>Tv</i>	1600-6400	3200	3200	2736.4 <sup>B</sup>	1600-6400	3200	3200	2736.4 <sup>B</sup>
<sup>h</sup> <i>Cz</i>	3200-6400	6400	6400	5004.5 <sup>A</sup>	1600-6400	6400	6400	5723.0 <sup>A</sup>

<sup>a</sup>MIC = minimum inhibitory concentration; <sup>b</sup>MBC = minimum bactericidal concentration; MIC<sub>50</sub> = minimum inhibitory concentration capable of inhibiting 50% of isolates; MIC<sub>90</sub> = minimum inhibitory concentration capable of inhibiting 90% of isolates; MBC<sub>50</sub> = minimum bactericidal concentration for 50% of isolates; MBC<sub>90</sub> = minimum bactericidal concentration for 90% of isolates; <sup>c</sup>GM = geometric mean, the same letters in the same column indicate similar antimicrobial activity; \* <sup>d</sup>EOs = essential oils; <sup>e</sup>*Ov* = *Origanum vulgare*; <sup>f</sup>*Lg* = *Lippia graveolens*; <sup>g</sup>*Tv* = *Thymus vulgaris*; and <sup>h</sup>*Cz* = *Cinnamomum zeylanicum*. The Mann-Whitney test (P<0.05) was used to compare MICs and MBCs.

**Table 2** - Relationship between the number of *E. coli* virulence factors and the susceptibility to essential oils.

<sup>a</sup> Id	<sup>b</sup> NVF	<i>Origanum vulgare</i> (µg/ml)		<i>Lippia graveolens</i> (µg/ml)		<i>Thymus vulgaris</i> (µg/ml)		<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (µg/ml)	
		<sup>c</sup> MIC	<sup>d</sup> MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	1 (LT)	1600	3200	1600	1600	6400	6400	6400	6400
3	1 (F5)	1600	1600	1600	1600	6400	6400	6400	6400
10	1 (F5)	1600	1600	3200	3200	1600	1600	6400	6400
12	1 (LT)	1600	1600	3200	3200	3200	3200	6400	6400
18	1 (STb)	800	800	1600	1600	1600	1600	3200	6400
24	1 (F4)	1600	1600	3200	3200	3200	3200	3200	6400
25	1 (STb)	1600	1600	1600	1600	3200	3200	3200	3200
27	1 (F5)	1600	1600	3200	3200	3200	3200	6400	6400
24	2 (STa, F5)	1600	3200	3200	3200	6400	6400	6400	6400
5	2 (LT, STb)	1600	3200	1600	3200	3200	3200	6400	6400
6	2 (LT, STb)	1600	1600	3200	3200	3200	3200	6400	6400
7	2 (LT, STb)	1600	1600	3200	3200	3200	3200	6400	6400
8	2 (STa, F5)	1600	1600	3200	3200	3200	3200	6400	6400
13	2 (STa, STx)	1600	1600	1600	3200	1600	1600	6400	6400
15	2 (F4, F107)	1600	1600	3200	3200	1600	1600	6400	6400
19	2 (STa, F107)	1600	1600	1600	1600	3200	3200	3200	3200
20	2 (STb, F41)	1600	1600	1600	1600	1600	1600	3200	6400
22	2 (STb, F4)	800	800	1600	1600	1600	1600	3200	3200
23	2 (LT, F5)	1600	1600	1600	3200	3200	3200	3200	6400
26	2 (LT, STb)	1600	1600	3200	3200	1600	1600	6400	6400
31	2 (LT, STb)	1600	1600	3200	3200	3200	3200	3200	6400
2	3 (F4, F107, LT)	1600	1600	3200	3200	6400	6400	6400	6400
9	3 (F107, LT, STb)	800	800	1600	3200	3200	3200	6400	6400
11	3 (F4, F107, LT)	1600	1600	3200	3200	3200	3200	3200	6400
16	3 (F4, F107, LT)	1600	1600	1600	3200	1600	1600	6400	6400
17	3 (F4, LT, STb)	1600	1600	3200	3200	3200	3200	6400	6400
14	4 (STa, STb, F107, F4)	1600	1600	3200	3200	1600	1600	6400	6400
21	4 (STb, STx, LT, F4)	1600	1600	1600	1600	1600	1600	3200	3200
28	5 (STa, STb, F107, F41, STx)	1600	1600	3200	3200	3200	3200	6400	6400
29	5 (STa, STb, LT, F107, F4)	1600	1600	3200	3200	3200	3200	6400	6400
30	6 (STa, STb, LT, F107, F4, F41)	800	800	3200	3200	1600	1600	3200	3200

The essential oils of ginger, basil, rosemary and sage had antimicrobial activity only at concentrations greater than the maximum concentration tested (6400 µg/ml) ; <sup>a</sup>Id = isolate identifier; <sup>c</sup>MIC = minimum inhibitory concentration; <sup>d</sup>MBC = minimum bactericidal concentration; and <sup>b</sup>NVF = number of virulence factors.

**Table 3** - Relationship between the *E. coli* antibiotic resistance profiles (resistotypes) and the susceptibility to essential oils.

<sup>a</sup> Id	Resistotype	<sup>b</sup> NAR	<i>Origanum vulgare</i> (µg/ml)		<i>Lippia graveolens</i> (µg/ml)		<i>Thymus vulgaris</i> (µg/ml)		<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (µg/ml)	
			<sup>c</sup> MIC	<sup>d</sup> MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
21	NR	0	1600	1600	1600	1600	3200	3200	1600	1600
29	AMO	1	1600	1600	3200	3200	6400	6400	3200	3200
16	DOX-EST	2	1600	1600	3200	3200	6400	6400	1600	1600
4	DOX-EST	2	1600	3200	1600	3200	6400	6400	6400	6400
3	AMP-AMO	2	1600	1600	1600	1600	6400	6400	6400	6400
26	DOX-EST	2	1600	1600	3200	3200	6400	6400	1600	1600
17	SUT-DOX-NAL-EST	4	1600	1600	3200	3200	6400	6400	3200	3200
12	SUT-DOX-NAL-EST	4	1600	1600	3200	3200	6400	6400	3200	3200
1	AMP-DOX-EST-AMO	4	1600	3200	1600	1600	6400	6400	6400	6400
23	AMP-DOX-EST-AMO	4	1600	1600	1600	3200	3200	6400	3200	3200
27	SUT-DOX-EST-AMO	4	1600	1600	3200	3200	6400	6400	3200	3200
15	SUT-DOX-NAL-CIP-EST	5	1600	1600	3200	3200	6400	6400	1600	1600
2	SUT-DOX-NAL-CIP-EST	5	1600	1600	1600	3200	6400	6400	6400	6400
5	SUT-DOX-NAL-CIP-EST	5	1600	3200	1600	3200	6400	6400	3200	3200
13	AMP-DOX-AMC-EST-AMO	5	1600	1600	3200	3200	6400	6400	1600	1600
8	SUT-DOX-NAL-EST-AMO	5	1600	1600	3200	3200	6400	6400	3200	3200
9	SUT-DOX-NAL-CIP-EST	5	800	800	3200	3200	6400	6400	3200	3200
31	AMP-SUT-DOX-EST-AMO	5	1600	1600	3200	3200	3200	6400	3200	3200
11	SUT-DOX-NAL-CIP-EST	5	1600	1600	3200	3200	3200	6400	3200	3200
22	SUT-DOX-NAL-CIP-EST	5	800	800	1600	1600	3200	3200	1600	1600
7	DOX-NAL-AMC-EST-AMO	5	1600	1600	3200	3200	6400	6400	3200	3200
18	SUT-DOX-NAL-EST-GEN	5	800	800	1600	1600	3200	6400	1600	1600
10	AMP-SUT-DOX-NAL-EST-AMO	6	1600	1600	3200	3200	6400	6400	1600	1600
6	AMP-SUT-DOX-NAL-EST-AMO	6	1600	1600	3200	3200	6400	6400	3200	3200
25	AMP-DOX-NAL-AMC-CIP-AMO	6	1600	1600	1600	1600	3200	3200	3200	3200
20	AMP-SUT-DOX-NAL-EST-AMO	6	1600	1600	1600	1600	3200	6400	1600	1600
30	AMP-SUT-DOX-NAL-EST-AMO	6	800	800	3200	3200	3200	3200	1600	1600
28	AMP-SUT-DOX-AMC-EST-AMO	6	1600	1600	3200	3200	6400	6400	3200	3200
19	AMP-SUT-DOX-AMC-EST-AMO	6	1600	1600	1600	1600	3200	3200	3200	3200
14	AMP-SUT-DOX-NAL-EST-AMO-GEN	7	1600	1600	3200	3200	6400	6400	1600	1600
24	AMP-SUT-DOX-NAL-AMC-CIP-EST-AMO	8	1600	1600	1600	3200	3200	6400	3200	3200

The essential oils of ginger, basil, rosemary and sage had antimicrobial activity only at concentrations greater than the maximum tested concentration (6400 µg/ml); Id = isolate identifier; <sup>b</sup>NAR = number of antimicrobial resistances; <sup>c</sup>MIC = minimum inhibitory concentration; <sup>d</sup>MBC = minimum bactericidal concentration; AMP = ampicillin; SUT = sulfamethoxazole/trimethoprim; CIP = ciprofloxacin; GEN = gentamicin; EST = streptomycin; NAL = nalidixic acid; AMO = amoxicillin; AMC = amoxicillin/clavulanic acid; DOX = doxycycline; and NR = nonresistant.

## 3.2 Manuscrito 2

### Manuscrito aceito pela Revista Ciência Rural

**Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de**

***Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos**

**Antimicrobial activity of spice essential oils against *Escherichia coli* strains isolated  
from poultry and cattle**

Deise Flores Santurio<sup>1</sup>

#### RESUMO

A discutida questão da substituição do uso de antibacterianos em rações (promotores de crescimento) requer urgentes alternativas. Face às necessidades de inibidores microbianos nesses alimentos, os óleos essenciais (OES) se constituem em alternativa, sob avaliação. Neste estudo avaliou-se a atividade antimicrobiana dos OES de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (orégano mexicano), *Zingiber officinale* (gingibre), *Salvia officinalis* (sálvia), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de aves (n=43) e de bovinos (n=36). A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas para cada isolado através da técnica de microdiluição em caldo, a partir da máxima concentração de 6400µg/mL de cada OE testado. Observou-se atividade antimicrobiana para os OES de orégano, orégano mexicano, tomilho, canela. Para todas as amostras testadas, independente de sua origem, os OES mais e menos efetivos quanto à atividade antimicrobiana foram o orégano e a canela, respectivamente. Nossos resultados confirmaram o potencial antibacteriano de alguns OES, os quais merecem novas investigações abordando sua adição na alimentação de aves e bovinos.

**Palavras - chave:** *Escherichia coli*, óleos essenciais, atividade antimicrobiana.

---

<sup>1</sup>Centro de Ciências Rurais, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, n.1000, Prédio 42, Cidade Universitária, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil. E-mail:deisesanturio@ibest.com.br, \*Autora para correspondência.



## ABSTRACT

The issue discussed about substitution of antibacterial use in animal feed (growth promoters) requires emerging alternatives. Front the needs of microbial inhibitors in animal feed, the essentials oils (EOS) constitute potential alternatives under evaluation. In this study we evaluated the antimicrobial activities of EOs from *Oreganum vulgare* (oregano), *Thymus vulgaris* (thyme), *Lippia graveolens* (Mexican oregano), *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon), *Zingiber officinale* (ginger), *Salvia officinalis* (sage), *Rosmarinus officinalis* (rosemary) and *Ocimum basilicum* (basil) against *Escherichia coli* strains isolated from poultry (n=43) and cattle faeces (n=36). The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined for each isolate by using the broth microdilution technique, from the maximum concentration of 6400µg/mL of each OE tested. Antimicrobial activity was observed on the essential oils of oregano, mexican oregano, thymus and cinnamon. For all strains tested, regardless of their origin, the antimicrobial activity of OES from oregano and cinnamon were the most and lesser effective, respectively. Our results confirm the antimicrobial potential of some EOs, which deserve further research addressing its addition in feed for poultry and cattle.

**Key words:** *Escherichia coli*, essential oils, antimicrobial activity.

## INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é a espécie predominante entre as bactérias intestinais anaeróbicas facultativas e não esporuladas, pertencendo à família *Enterobacteriaceae*, sendo um bacilo Gram-negativo fermentador da glicose e lactose com produção de ácido e gás, dentre alguns atributos úteis na sua identificação (ITO et al., 2007).

Alimentos de origem animal submetidos a algum processo, como é o caso da carne moída, têm sido identificados como importante veículo de transmissão de *E. coli* do sorotipo

O157:H7 e outras STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga), isoladas de toxinfecções alimentares no homem (GRIFFIN & TAUXE, 1991). Os bovinos têm sido considerados um importante reservatório de *E. coli* produtoras da toxina Shiga (SARIDAKIS et al., 1997).

Entre os patógenos bacterianos causadores de infecção em aves, *Escherichia coli* destaca-se como um dos principais agentes responsáveis por perdas econômicas na indústria avícola. A *E. coli* patogênicas para aves (APEC) representam um conjunto de isolados capazes de determinar doenças extra-intestinais como aerossaculite, pericardite e septicemia (ITO et al., 2007), geralmente denominadas como colibacilose.

A colibacilose pode ser controlada por medidas profiláticas e uso de antibacterianos (McMULLIN, 2004). No entanto, a adição de antibacterianos em doses subclínicas (promotores de crescimento) tem gerado preocupações como a emergência de bactérias resistentes bem como a indesejada presença de seus resíduos em derivados cárneos, leite e ovos (WHO, 2003). Neste contexto, alternativas substitutivas aos antibacterianos são urgentemente requeridas tais como o uso de óleos essenciais e/ou extratos herbais (BRUGALLI, 2003).

Os Óleos Essenciais (OES), derivados de plantas utilizadas como condimentos, representam complexas misturas de substâncias naturais, tradicionalmente utilizadas para acentuar gosto ou aroma de alguns alimentos. Constituem-se de substâncias, cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, em diferentes concentrações, onde, um composto farmacologicamente ativo é majoritário (SIMÕES & SPITZER, 2000) A maior parte da atividade antimicrobiana de OES parece estar associada aos compostos fenólicos (SIMÕES & SPITZER, 2000). O efeito antimicrobiano está relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001).

Este estudo teve como objetivos: a) avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais de condimentos *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Lippia graveolens* (orégano mexicano), *Ocimum basilicum* (manjeriçã), *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (sálvia), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Zingiber officinale* (gengibre) sobre amostras de *E. coli*. isoladas de aves e bovinos; b) comparar a atividade dos OES sobre isolados com perfis de susceptibilidade e de resistência a antibacterianos diversos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismos

Foram estudadas 79 amostras de *Escherichia coli* sendo 43 isoladas de fezes de aves e 36 de fezes de bovinos, provenientes do Laboratório de Pesquisas Micológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Todas as amostras foram isoladas de animais sadios.

### Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelo método de difusão em ágar (CLSI M31-A3; 2008) utilizando-se: ampicilina (10µg), sulfametoxazol+trimetoprim (25µg), ceftriaxona (30µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), estreptomicina (10µg), ácido nalidíxico (30µg), ceftiofur (30µg), amoxicilina (10µg), amoxicilina+ácido clavulânico (30µg), imipenem (10µg), doxiciclina (30µg), obtidos comercialmente (DME; Araçatuba, São Paulo, Brasil).

### Óleos essenciais

Foram utilizados os óleos essenciais de canela, orégano mexicano, manjeriçã, orégano, alecrim, sálvia, tomilho e gengibre obtidos comercialmente, em frasco âmbar, lacrados com volumes de 5ml (Essential 7.com; Roewell, New Mexico, USA).

### Determinação das concentrações inibitórias mínimas

Após pesagem de 1g, cada óleo essencial foi diluído com metanol até atingir a concentração de  $640\text{mg ml}^{-1}$  (solução I). A seguir, foi diluído na proporção de 1:100 em Caldo Muller-Hinton, obtendo-se a concentração de  $6400\mu\text{g ml}^{-1}$  (solução II). Com base no documento M31-A3 do CLSI (2008) volumes de  $100\mu\text{l}$  de caldo Muller-Hinton eram distribuídos nos poços de uma placa de microtitulação; em seguida,  $100\mu\text{l}$  da solução II eram acrescentados ao primeiro poço e, após homogeneização, transferia-se para o segundo e assim sucessivamente, obtendo-se concentrações finais de 3200, 1600, 800, 400, 200,  $100\mu\text{g ml}^{-1}$ . As colônias de *E. coli* desenvolvidas no ágar Muller-Hinton, suspensas em solução salina 0,085% obtendo-se uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland ( $1 \times 10^8 \text{UFC ml}^{-1}$ ). Desta suspensão inoculava-se  $10\mu\text{l}$  ( $1 \times 10^5 \text{UFC ml}^{-1}$ ) em cada poço já contendo os óleos essenciais. As microplacas eram incubadas durante 24h/35°C, em condições de aerobiose. A CIM consistiu na menor concentração do óleo essencial capaz de causar inibição total do crescimento bacteriano. Estes ensaios foram realizados em triplicata.

### Determinação das concentrações bactericidas mínimas

Definida como a menor concentração dos óleos essenciais capaz de causar a morte do inóculo, foram determinadas a partir dos poços onde, após 24h de incubação não havia crescimento bacteriano visível. Destes transferia-se uma alíquota de  $10\mu\text{l}$  para a superfície do ágar Muller-Hinton. Após 24h de incubação a 35°C, registrava-se a menor concentração dos óleos essenciais aonde não se evidenciava crescimento bacteriano. Estes ensaios foram também realizados em triplicatas.

### Análise estatística

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi empregado para comparar duas amostras independentes, visando observar se os diferentes grupos em estudo apresentavam perfis de suscetibilidade semelhantes ou não, frente a determinado óleo essencial.

## RESULTADOS

Os isolados incluídos neste estudo evidenciaram variações na suscetibilidade frente aos diferentes óleos essenciais (OES). As médias geométricas para as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs), frente a *E. coli* isoladas de bovinos foram: *Origanum vulgare* [CIM=831,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$  e CBM=915,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], *Lippia graveolens* [CIM=1131,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$  e CBM=1345,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], *Thymus vulgaris* [CIM=2095,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$  e CBM=2262,7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], *Cinnamomun zeylanicum* [CIM=4354,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$  e CBM=5486,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] e frente a *E. coli* isolados de aves foram *Origanum vulgare* [CIM=750,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$  e CBM=895,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], *Lippia graveolens* [CIM=1508,7 $\mu\text{g ml}^{-1}$  e CBM=2173,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], *Thymus vulgaris* [CIM=1941,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$  e CBM=2005,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ] *Cinnamomun zeylanicum* [CIM=3098,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$  e CBM=4075,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]. No presente estudo, os OES de gengibre, manjeriço, alecrim e sálvia não evidenciaram atividade antibacteriana frente aos microrganismos avaliados. A média geométrica das CIMs indicou que o OE de orégano foi o mais ativo para os isolados de aves do que de bovinos ( $P < 0,0001$ ). Os OE de orégano mexicano e tomilho foram igualmente ativos para os isolados de aves, enquanto para os isolados de bovinos o OE de orégano mexicano foi mais ativo que o OE de tomilho ( $P < 0,0001$ ). O OE de canela foi menos ativo ( $P < 0,0001$ ) que os OES de orégano, orégano mexicano e tomilho para os respectivos isolados (Tabela 1).

Com base na resistência aos antimicrobianos as amostras isoladas de aves foram distribuídas em 16 sub-grupos e as de bovinos em 11 sub-grupos (Tabela 2). A seguir,

avaliou-se a suscetibilidade de cada subgrupo frente aos OES onde não foram detectadas diferenças significativas nas suscetibilidades destes subgrupos.

## DISCUSSÃO

Desde 2006, a União Européia, importante cliente do mercado brasileiro de carne, banuiu o uso de promotores de crescimento (HUGHES et al., 2008); no Brasil há crescente pressão pelas mesmas restrições. Por isto, alternativas substitutivas aos antimicrobianos tradicionalmente utilizados, estão sob investigação (BRUGALLI, 2003).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de plantas aromáticas são reconhecidas desde a Antiguidade (SIMÕES & SPITZER, 2000). Neste estudo, avaliamos a atividade antibacteriana de OES, obtidos de plantas condimentares sobre *E. coli* patogênica para aves e bovinos. Os OES de orégano, orégano mexicano, tomilho e canela evidenciaram atividade antimicrobiana frente a *E. coli* com variado perfil de susceptibilidade a antibacterianos.

A destacada atividade antimicrobiana do *O. vulgare* frente a *E. coli* de várias origens confirmou estudos anteriores. SMITH-PALMER et al. (1998) e HÖFERL et al. (2009) relataram importante atividade antimicrobiana do OE de orégano frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo *E. coli*. BURT et al. (2003) observaram que os óleos essenciais de orégano e tomilho possuem significativa atividade bacteriostática e bactericida frente *E. coli* O157:H7, isoladas de fezes de bovinos. Os compostos fenólicos carvacrol e timol enquanto frações majoritárias garantem tais atividades. Esta atividade também têm sido relatada frente a fungos leveduriformes sensíveis e resistentes aos antimicóticos (POZZATTI et al., 2010).

A *Lippia graveolens*, (orégano mexicano ou lípia), é uma planta condimentar originária do México. A composição de seu OE exhibe significativos teores de carvacrol (0,47-

24,84%) e timol (0,22-60,6%) (SÁNCHEZ et al., 2010). Vários estudos já evidenciaram atividade antimicrobiana (CIM=2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) sobre *E. coli* ATCC 11229 (SÁNCHEZ et al., 2010); todavia, no presente estudo detectamos melhor potencial antimicrobiano (MG das CIMs=1508,7 $\mu\text{g ml}^{-1}$  (*E. coli* de aves) e MG das CIMs=1131,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$  (*E. coli* de bovinos) que o relatado por SANCHEZ et al. (2010).

Com base na composição média quantitativa das frações majoritárias carvacrol e timol nos OES de orégano (carvacrol 66 %; timol 1,0%) (HÖFERL et al., 2009) lipia (carvacrol 38%; timol 3.0%) (SANCHES et al., 2010) e tomilho (carvacrol <4.1% e timol 43.4%) (HÖFERL et al., 2009), nossos resultados evidenciaram que a menor concentração de carvacrol teve impacto decrescente na atividade antimicrobiana, o que torna-se claro nos resultados obtidos com o OE de tomilho.

No presente estudo o OE de canela mostrou-se menos ativo que o de orégano, lipia e tomilho; SANTURIO et al. (2007) avaliando amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves e POZZATTI et al. (2010) estudando amostras de *Candida* spp. também constataram este perfil de atividade para o OE de canela. JAYAWARDENA & SMITH (2010) avaliaram a composição do OES de *Cinnamomum zeylanicum* extraído de folhas no qual predominava o eugenol (98%); já, quando extraído da casca, era rico em cinamaldeído (>80%). HÖFERL et al. (2009) relataram fraca atividade do OE de folhas da canela (eugenol = 74%) frente *E. coli*; em contrapartida, BASKARAN et al. (2009) ressaltaram a fração cinamaldeído como mais ativa do que carvacrol, eugenol e timol. Assim, a atividade do OE de canela é dependente da parte do vegetal do qual é extraído o que pode justificar as discrepâncias acima apontadas.

Frente aos OES de alecrim, sálvia, manjerição e gengibre nossos resultados não evidenciaram atividade antimicrobiana. Todavia, VIUDA-MARTOS et al. (2008) e DELAMARE et al. (2007) relataram atividade antimicrobiana dos OES de sálvia e alecrim frente a *Staphylococcus* spp, *Enterobacter gergoviae*, *E. amnigenus*, *Lactobacillus sakei*, e

*L. curvatus*. A disparidade entre nossos resultados e os relatados por estes autores pode ser atribuída a composição dos OES ou às técnicas empregadas. Neste estudo utilizamos a técnica de microdiluição em caldo com base no documento M31- A3 do CLSI (2008) para determinação das CIMs e CBMs. A inexistência de uma técnica internacionalmente padronizada para avaliação de OES e extratos vegetais permite que diferentes protocolos sejam utilizados, o que compromete as comparações de resultados VIUDA-MARTOS et al. (2008) e SMITH-PALMER et al. (1998).

No presente estudo a atividade dos OES sobre os subgrupos de *E. coli* com diferentes perfis de resistência foi independente do maior ou menor padrão de resistência aos antibacterianos o que está de acordo com outros autores, SI et al. (2008) relataram a atividade do OE de orégano sobre *E. coli* ESBL (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase) resistentes a múltiplos antibacterianos; MAHBOUBI & BIDGOLI (2009) relataram que o OE de *Zataria multiflora* (condimento iraniano semelhante ao tomilho) composto por timol (38%), carvacrol (15,3%) e *p*-cimene (10,2%) apresentou atividade antimicrobiana similar frente a isolados de *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e sensíveis (MSSA). Frente a *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol, POZZATTI et al. (2010) relataram atividade antifúngica dos OES independentemente do perfil de resistência dos microrganismos.

O grande número de isolados e a variada procedência garantiu a heterogeneidade das amostras de *E. coli* para melhor avaliar a atividade antimicrobiana destes OES. A constatação de que a atividade dos OES de orégano, orégano mexicano, tomilho e canela, é independente da susceptibilidade aos antibacterianos testados, reforça a condição desses OES como candidatos a substituir antibacterianos, usados na alimentação de aves e bovinos.

## CONCLUSÃO

Este estudo permitiu concluir que: a) os óleos essenciais de orégano, orégano mexicano, tomilho e canela apresentaram atividade bactericida frente a *E. coli* isolados de



aves e bovinos; b) o óleo essencial de orégano apresentou atividade antimicrobiana (CIMs e CBMs) superiores aos óleos essenciais de orégano mexicano, tomilho e canela; c) a susceptibilidade aos óleos essenciais foi semelhante entre subgrupos de isolados, independente da resistência aos antimicrobianos testados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

BASKARAN, A.S. et al. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.4, p.1423-1429, 2009. Disponível em: <<http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030209704539.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2011. doi: 10.3168/jds.2008-1384.

BRUGALLI, I. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2003, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2003. V.1, p.167-182.

BURT S.A., REINDERS R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology** v.36, p.162-167, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-65X.2003.01285.x/pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2011. doi: 10.1046/j.1472-765X.2003.01285.x.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved Standard – 3.ed.** Wayne,PA, 2008. (CLSI document M31-A3 Clinical and Laboratory Standards Institute).

- DELAMARE, A.P.L. et al. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v.100, p.603-608, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.078>>. Acesso em: 28 jan. 2011. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.09.078.
- GRIFFIN, P.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic Review** v.13, p.60-98, 1991. Disponível em: <<http://epirev.oxfordjournals.org/content/13/1/60.long>>. Acesso em: 28 jan. 2011.
- HÖFERL, M. et al. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, p.459-464, 2009. Disponível em <<http://media.web.britannica.com/ebsco/pdf/020/44602020.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2011.
- HUGHES, L. et al. Risk factors for the use of prescription antibiotics on UK broiler farms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, p.947-952, 2008. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/61/4/947.long>>. Acesso em: 27 jan. 2011. doi:10.1093/jac/dkn017.
- ITO, N.M.K. et al. **Diagnóstico diferencial das enfermidades bacterianas, fúngicas e parasitárias que acometem os frangos de corte**. Cascavel, PR: Coluna do Saber, 2007. 160p.
- JAYAWARDENA; B.; SMITH, R.M. Superheated water extraction of essential oils from *Cinnamomum zeylanicum* (L.). **Phytochemical Analysis**, v.21, p.470-472, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.1221/abstract>>. Acesso em: 28 jan. 2011. doi: 10.1002/pca.1221.

LAMBERT, R.J.W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.453-462, 2001. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x/abstract>>. Acesso em: 28 jan. 2011. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x.

McMULLIN, P. Produção avícola após redução do uso de antibióticos. Riscos, potencial de contaminação cruzada e detecção de resíduos. North Yorkshire, U.K., 2004. In: CONFERÊNCIA APINCO, 2., 2004, Campinas SP. **Anais...** Campinas: FACTA, 2004. V.2. 291p. p.219.

MAHBOUBI, M.; BIDGOLI, F.G. Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. **Phytomedicine**, v.17, p.548-550, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.11.004>>. Acesso em 28 jan. 2011. doi: 10.1016/j.phymed.2009.11.004.

POZZATTI, P. et al. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**, v.53, p.12-15, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0507.2008.01643.x/abstract>>. Acesso em: 20 jan. 2011. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01643.x.

SÁNCHEZ, A.A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p.585-590, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2010.02837.x/abstract>>. Acesso em: 20 jan. 2011. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02837.x

SANTURIO, J. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e

canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.803-808, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v37n3/a31v37n3.pdf>>.

Acesso em: 28 de jan. 2011.

SARIDAKIS, H.O. et al. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. **Veterinary Microbiology** v.54, p.145-153, 1997. Disponível em <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01278-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01278-3)>. Acesso em: 28 jan. 2011. doi:10.1016/S0378-1135(96)01278-3.

SI, H. et al. Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.53, p.190-194, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-695X.2008.00414.x/abstract>>. Acesso em: 25 jan. 2011. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00414.x.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000. Cap.18.

SMITH-PALMER, A. et al. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.118-122, 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.1998.00303.x/abstract>>. Acesso em: 28 jan. 2011. doi: 10.1046/j.1472-765X.1998.00303.x.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology** v.43, p.526-531, 2008. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x/abstract>>. Acesso em: 28 jan. 2011. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Joint FAO/OIE/WHO EXPERT WORKSHOP ON Non-HUMAN ANTIMICROBIAL USAGE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE: SCIENTIFIC ASSESSMENT,” Presented in Geneva, Switzerland, Dec. 2003. Disponível em: < [www.who.int/foodsafety/micro/meetings/nov2003/en/](http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/nov2003/en/)>. Online. Acesso em: 24 nov. 2010.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Lippia graveolens*, *Thymus vulgaris* e *Cinnamomum zeylanicum* frente à *E. coli* isoladas de aves e bovinos.

	-----CIM-----					-----CBM-----			
	OES	Faixa	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	MG	Faixa	CBM <sub>50</sub>	CBM <sub>90</sub>	MG
<i>E. coli</i> de aves	<i>Ov</i>	400-1600	800	1600	750,1 <sup>C</sup>	400-1600	800	1600	895,5 <sup>C</sup>
	<i>Lg</i>	800-3200	1600	3200	1508,7 <sup>B</sup>	1600-3200	1600	3200	2173,4 <sup>B</sup>
	<i>Tv</i>	1600-3200	1600	3200	1941,5 <sup>B</sup>	1600-3200	1600	3200	2005,1 <sup>B</sup>
	<i>Cz</i>	1600-6400	3200	3200	3098,5 <sup>A</sup>	3200-6400	3200	6400	4075,3 <sup>A</sup>
<i>E. coli</i> de bovinos	<i>Ov</i>	400-1600	800	1600	831,4 <sup>D</sup>	400-1600	800	1600	915,4 <sup>D</sup>
	<i>Lg</i>	800-1600	1600	3200	1131,4 <sup>C</sup>	800-1600	1600	3200	1345,4 <sup>C</sup>
	<i>Tv</i>	1600-3200	1600	3200	2095,1 <sup>B</sup>	1600-3200	1600	3200	2262,7 <sup>B</sup>
	<i>Cz</i>	3200-6400	3200	6400	4354,5 <sup>A</sup>	3200-6400	6400	3200	5486,4 <sup>A</sup>

CIM =Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima; CIM<sub>50</sub> = Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 50% dos isolados; CIM<sub>90</sub> = Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 90% dos isolados; CBM<sub>50</sub> = Concentração Bactericida Mínima para 50% dos isolados; CBM<sub>90</sub> = Concentração Bactericida Mínima para 90% dos isolados; MG = Média Geométrica, onde letras iguais na mesma coluna indicam atividade antimicrobiana similar; OES = Óleos Essenciais, *Ov* = *Origanum vulgare*; *Lg* = *Lippia graveolens*; *Tv* = *Thymus vulgaris*; *Cz* = *Cinnamomum zeylanicum*. Nas comparações entre as CIMs e CBMs utilizou-se o teste de Mann - Whitney (P<0,05)

Tabela 2 - Relações entre o perfil de resistência de *E. coli* a antimicrobianos e a susceptibilidade a óleos essenciais.

	Subgrupo (n)	Perfil de resistência	-----Variações das CIMs ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )-----			
			<i>Ov</i>	<i>Lg</i>	<i>Tv</i>	<i>Cz</i>
<i>E. coli</i> de aves	1 (16)	não resistente	400-800	800-3200	1600-3200	3200
	2 (3)	DOX	400-800	1600-3200	1600-3200	3200
	3 (4)	AMO	400-1600	1600-3200	1600	1600-6400
	4 (1)	EST	400	1600	1600	3200
	5 (3)	DOX-EST	400-1600	1600-3200	1600-3200	1600-3200
	6 (5)	EST-AMO	400-1600	1600-3200	1600-3200	3200
	7 (1)	SUT-EST	1600	1600	1600	3200
	8 (1)	AMP-AMO	800	3200	1600	3200
	9 (1)	DOX-AMOX	1600	3200	3200	3200
	10 (2)	AMP-EST-AMO	800	800-3200	1600	3200
	11 (1)	AMC-EST- AMO	800	1600	1600	3200
	12 (1)	DOX -EST-AMO	400	1600	3200	3200
	13 (1)	DOX-AMC-AMO	400	1600	3200	3200
	14 (1)	AMC-EST-GEN	1600	1600	1600	3200
	15 (1)	CTF-NAL-EST-AMO	1600	3200	3200	3200
	16 (1)	SUT-DOX-EST-GEN	800	1600	1600	3200
<i>E. coli</i> de bovinos	1 (9)	não resistente	400-1600	800-1600	1600-6400	3200-6400
	2 (14)	AMO	400-1600	800-1600	1600-6400	3200-6400
	3 (1)	DOX	800	1600	3200	3200
	4 (4)	EST	800	800-1600	1600-3200	3200-6400
	5 (1)	EST-AMO	800	800	1600	3200
	6 (1)	NAL-EST	1600	800	3200	3200
	7 (1)	AMC-AMO	800	1600	1600	6400
	8 (2)	NAL-AMO	400-800	1600	1600	3200-6400
	9 (3)	AMC-EST-AMO	1600	800	1600	3200
	10 (5)	SUT-DOX-AMC-EST-AMO	800	800	1600	3200
	11 (5)	AMP-DOX-AMC-EST-AMO	1600	1600	3200	3200

AMP = ampicilina ; SUT = sulfametoxazol+trimetoprim; GEN = gentamicina; EST= estreptomicina; NAL = ácido nalidixico ; AMO = amoxicilina; AMC = amoxicilina + ácido clavulânico; CTF = ceftiofur; DOX = doxiciclina; CIMs = Concentrações Inibitórias Mínimas; (n) número de isolados; *Ov* = *Oreganum vulgare*; *Lg* = *Lippia graveolens*; *Tv* = *Thymus vulgaris*

## 4 DISCUSSÃO

Os agentes antimicrobianos são utilizados tanto no tratamento das infecções bem como aplicado às rações dos animais para preveni-las e melhorar o desempenho alimentar (BARCELOS & SOBESTIANSKY,1998).

Desde 2006, a União Européia , importante cliente do mercado brasileiro de carne, banuiu o uso de promotores de crescimento (HUGHES et al.,2008); no Brasil há crescente pressão pelas mesmas restrições.

A utilização de plantas como medicamentos acompanhou a evolução humana e hoje representa uma fonte de matérias primas à moderna farmacologia. A inclusão de extratos vegetais às rações animais requer baixa toxicidade e, assim, os óleos essenciais de vegetais, tradicionalmente utilizados como condimentos ou temperos, enquadram-se a este fim com renovado interesse (BRUGALLI, 2003). Neste estudo, avaliamos a atividade antibacteriana de OES, obtidos de plantas condimentares sobre *E.coli* patogênica para suínos,aves e bovinos.

O óleo essencial de orégano foi o mais ativo, para todos os isolados. Os óleos essenciais de orégano mexicano e tomilho foram igualmente ativos para os isolados de aves e suínos. Enquanto que para os isolados de bovinos, o óleo essencial de orégano mexicano foi mais ativo que o óleo essencial de tomilho.

O óleo essencial de canela foi menos ativo que os óleos essenciais de orégano, orégano mexicano e tomilho para os isolados de suínos, bovinos e aves.

A destacada atividade antimicrobiana do *O.vulgare* frente a *E.coli* de várias origens confirmou estudos anteriores. Smith-Palmer et al. (1998) e Höferl et al. (2009) relataram importante atividade antimicrobiana do OE de orégano frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo *E.coli*. Burt et al. (2003) observaram que os óleos essenciais de orégano e tomilho possuem significativa atividade bacteriostática e bactericida frente *E.coli* O157:H7, isoladas de fezes de bovinos. Os compostos fenólicos carvacrol e timol enquanto frações majoritárias garantem tais atividades. Esta atividade também têm sido relatada frente a fungos leveduriformes sensíveis e resistentes aos antimicóticos (POZZATTI et al.,2010).

A *Lippia graveolens*, (orégano mexicano ou lipia), é uma planta condimentar originária do México. A composição de seu OE exhibe significativos teores de carvacrol (0,47-24,84%) e timol (0,22 – 60,6%) (SÁNCHEZ et al. 2010). Vários estudos já evidenciaram atividade antimicrobiana (CIM = 2000 µg/ml) sobre *E. coli* ATCC 11229 (SÁNCHEZ et al.,



2010). Pozzatti et al. (2008) encontraram forte atividade antifúngica frente a diversas espécies de *Candida spp*; utilizando óleo essencial de orégano mexicano.

Com base na composição média quantitativa das frações majoritárias carvacrol e timol nos OES de orégano (carvacrol 66 %; timol 1,0% ) (HÖFERL et al., 2009) lipia (carvacrol 38%; timol 3.0%) (SÁNCHEZ et al., 2010) e tomilho (carvacrol < 4.1% e timol 43.4%) (HÖFERL et al., 2009), nossos resultados evidenciaram que a menor concentração de carvacrol teve impacto decrescente na atividade antimicrobiana, o que torna-se claro nos resultados obtidos com o OE de tomilho.

No presente estudo o OE de canela mostrou-se menos ativo que o de orégano, lipia e tomilho; Santurio et al. 2007 avaliando amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves e Pozzatti et al. 2010 estudando amostras de *Candida spp*. também constataram este perfil de atividade para o OE de canela. Jayawardena & Smith, 2010 avaliaram a composição do OES de *Cinnamomum zeylanicum* extraído de folhas no qual predominava o eugenol (98%); já, quando extraído da casca, era rico em cinamaldeído (>80%). Höferl et al. 2009 relataram fraca atividade do OE de folhas da canela (eugenol = 74%) frente *E. coli* ; em contrapartida, Baskaran et al. 2009 ressaltaram a fração cinamaldeído como mais ativa do que carvacrol, eugenol e timol. Assim, a atividade do OE de canela é dependente da parte do vegetal do qual é extraído o que pode justificar as discrepâncias acima apontadas.

Viuda-Martos et al. (2008) relataram atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de sálvia e alecrim dentre outros, frente a *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter amnigenus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*. Manjena & Muyima (1999) encontraram que o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) teve sua atividade antimicrobiana contra *Acinetobacter spp*, *Shigella spp*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *B. subtilis*, *Erwinia carotovora*, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis* e *S. typhi*, enquanto Delamare et al. (2007) observaram atividade do óleo essencial de sálvia frente a isolados de *Staphylococcus spp*. Mas, no presente estudo, os EOs de gengibre, manjeriço, alecrim, sálvia apresentaram atividade antimicrobiana superior à máxima concentração testada (6400 µg/ml), indicando que não apresentaram atividade contra os isolados de *E.coli* sobre as condições avaliadas. A disparidade entre nossos resultados e os relatados por estes autores pode ser atribuída a composição dos OES ou às técnicas empregadas. Neste estudo utilizamos a técnica de microdiluição em caldo com base no documento M31-A3 do CLSI (2008) para determinação das CIMs e CBMs. A inexistência de uma técnica internacionalmente padronizada para

avaliação de OES e extratos vegetais permite que diferentes protocolos sejam utilizados, o que vem comprometer as comparações de resultados.

No presente estudo a atividade dos OES sobre os subgrupos de *E. coli* com diferentes perfis de resistência foi independente do maior ou menor padrão de resistência aos antibacterianos o que está de acordo com outros autores, Si et al. 2008 relataram a atividade do OE de orégano sobre *E. coli* ESBL (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase) resistentes a múltiplos antibacterianos; Mahboubi & Bidgoli, 2009 relataram que o OE de *Zataria multiflora* (condimento iraniano semelhante ao tomilho) composto por timol (38%), carvacrol (15,3%) e *p*-cimene (10,2%) apresentou atividade antimicrobiana similar frente a isolados de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) e sensíveis (MSSA). Frente a *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol, Pozzatti et al. 2010 relataram atividade antifúngica dos OES independentemente do perfil de resistência dos microrganismos.

O grande número de isolados e a variada procedência garantiu a heterogeneidade das amostras de *E. coli* para melhor avaliar a atividade antimicrobiana destes OES. A constatação de que a atividade dos OES de orégano, orégano mexicano, tomilho e canela, é independente da susceptibilidade aos antibacterianos testados, mostra que esses OES podem vir a substituir antibacterianos, usados na alimentação de aves e bovinos.

## 5 CONCLUSÃO

- 1) Os óleos essenciais de orégano, orégano mexicano, tomilho e canela apresentaram atividade antimicrobiana frente aos isolados de *Escherichia coli*, nas concentrações testadas.
- 2) Verificou-se que os óleos essenciais de sálvia, manjeriço, alecrim e gengibre não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos isolados de *Escherichia coli*, nas concentrações testadas.
- 3) O óleo essencial de canela apresentou atividade antimicrobiana (CIMs) e (CBMs) inferiores aos óleos essenciais de orégano, orégano mexicano e tomilho.
- 4) O óleo essencial de orégano apresentou atividade antimicrobiana (CIMs) e (CBMs) superiores aos óleos essenciais de orégano mexicano, tomilho e canela.
- 5) A susceptibilidade aos óleos essenciais foi similar entre subgrupos de isolados, independente da resistência aos antimicrobianos testados.
- 6) A susceptibilidade aos óleos essenciais foi similar entre subgrupos de isolados de suínos, independente do número de fatores de virulência identificados.

## REFERÊNCIAS

BACK, A. Manual de doenças de Aves. Cascavel-PR,2002.246p.

BAGAMBOULA, C.F. et al. Inibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linallol and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri* **Food Microbiology**, v.21, p. 33-42, 2004.

BARCELLOS, D.; SOBESTIANSKY, J. **Uso de antimicrobianos em suinocultura**. 1ed. Goiânia: Sobestiansky.1998,103p.

BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.; GROSS, W.B. Colibacillosis. In: **Diseases of Poultry**. 11th ed. (Saif YM ed.). p. 631-652,2003 Iowa State Press. Iowa.

BASKARAN, A.S. et al. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.4, p.1423-1429, 2009.

BURT,S.A.;REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.162-167, 2003.

BRITO, B.G. et al. Virulence – associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* factors strais isolated from pigs. **Veterinary Microbiology**, v.65, p. 123-132,1999.

BRITO, B.G. et al. Fatores de virulência presentes em amostras de *E.coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p. 645-652,2004.

BRUGALLI, I. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Aves e Suínos Campinas, SP. **Anais...** v.1, p.167-182, 2003.

CABELLO,F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture:a growing problem for human and animal health for the environment. **Enviroment Microbiology**, v.8 n.7, p.1137-1444, 2006.

CÁCERES,A. **Plantas de uso medicinal en Guatemala**. Guatemala: Editorial Universitaria, 1999. 402 p.

CHOI,B.K.; GIL-TURNES,C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, av.35 n.3 p. 741-747,2005.

DAVIDSON, P.M.; NAIDU, A.S. Phyto-phenol. In: Naidu, AS.(Ed.), **Natural Food Antimicrobial Systems**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 265–294, 2000.

DEBROY, C.; MADDUX C.W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. **Animal Health Research Review**, v. 2 p.129–140, 2001.

DELAMARE, A.P.L et al. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia tribola* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v.100 p. 603-608, 2007.

FRANCO,B.D.G.M.; LANDGRAF,M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed Atheneu, 2003 .182p.

FRANCIS,D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. **Journal of Swine Health and Production**, v.10 p.171-175, 2002.

GUTIERREZ, J. et al; Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v.26 p. 142-150, 2009.

GYLES,C.L.; FAIRBROTHER,J.M. In:Gyles, C.L et al. *Escherichia coli* In: **Pathogenesis of bacterial infections in animal**. Ames,Iowa: Iowa State University Press, p.193-214, 2004.

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

HÖFERL et al. Correlation of Antimicrobial Activies of Various Essential Oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v.21 p. 459-463, 2009.

HIRSH,D.C.; ZEE,Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Ed. Guanabara, 2003, 446 p.  
HUGHES, L. et al. Risk factors for the use of prescription antibiotics on UK broiler farms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, p.947-952, 2008.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. Aromatic natural raw materials – Vocabulary. **ISO 9235:1997**. Genebra, 1997.

ITO,N.M.K.; MIYAJI,C.I.; MIYAJI,S.O, **Diagnóstico diferencial das enfermidades bacterianas, fúngicas e parasitárias que acometem os frangos de corte**. Cascavel,PR Editora Coluna do Saber, 2007,160p.

JAYAWARDENA; B.; SMITH, R.M. Superheated water extraction of essential oils from *Cinnamomum zeylanicum* (L.). **Phytochemical Analysis**, v.21, p.470-472, 2010.

KAMEL, C. A novel look at a classic approach of plant extracts. **Feed Mix**, p.19-24, 2000.

KAPER,J.B Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, p.103-108,1998.

KRAG,L. et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* strains associated with porcine pyelonephritis. **Veterinary Microbiology**, v.134 p.318-326,2009.

LAMBERT, R.J.W. et al. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91 p.453-462, 2001.

LORENZI, H.; MATOS,F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**.Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MAHBOUBI, M.; BIDGOLI, F.G. Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. **Phytomedicine**, v.17, p.548-550, 2010.

MAINIL,J. Shiga/Verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals **Veterinary Research**, v. 30 p. 235-257 ,1999.

MANGENA,T.; MUYIMA,N.Y.O. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosemarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. **Letters In Applied Microbiology**, v. 28, p.291-296,1999.

NAGY, B.; FEKETE, P. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. **Veterinary Research**, v. 30 p. 259–284, 1999.

POIANA et al. Antimicrobial Effect of Some Essential Oils. **Journal of Essential Oil Research**, v.20 p. 373-379, 2008.

POZZATTI, P. et al. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 950-956, 2008.

POZZATTI, P. et al. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**, v.53, p.12-15, 2010.

SÁNCHEZ, A.A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p.585-590, 2010.

SANTOYO, S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 4, p. 790-795, 2005.

SANTURIO, J.M. et al; Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37, p. 803-808, 2007.

SARIDAKIS,H.O et al; Virulence properties of *Escherichia coli* strains belong to enteropathogenic (EPEC) serogroups islated from calves with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v.54, p.145-153, 1997.

SARTORATTO et al. Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Aromatic Plants Used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35 p. 275-280, 2004.

SILVA, J.P.L et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis* **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.30 p. 136-141, 2010.

SILVEIRA,W.D. et al. Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.43, n.6, p.303-310, 2001.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 1999.

SOBESTIANSKY,J. et al. **Clínica e Patologia Suína**. Goiânia, 1999.

SMITH-PALMER, A. et al. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p. 118-122, 1998.

TRAJANO et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.29, p. 542-545, 2009.

VERNIN, G. et al. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from El Salvador. **Flavour and Fragrance Journal**, v.16, n. 3, p. 219-226, 2001.

VIUDA-MARTOS, M. et al Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p. 526-531, 2008.

WALMANN,J. Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. **International Journal of Medical Microbiology**, v.41, p.81-86, 2006.

XU, J. et al. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli* . **Letters in Applied Microbiology**, v.47, p.174-179, 2008.

YONZON et al. Antimicrobial Activies of Essential Oils of Nepal. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, p.107-111, 2005.