

## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO ENTRE CARVACROL E TIMOL SOBRE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.**

Eliara Ferreira de Oliveira (PIBIC/CNPq/Uem), Jane Martha Graton Mikcha (Orientador), e-mail: janegraton@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Maringá, PR.

**Área:** Ciências Agrárias.

**Sub-área:** Ciência e Tecnologia de Alimentos.

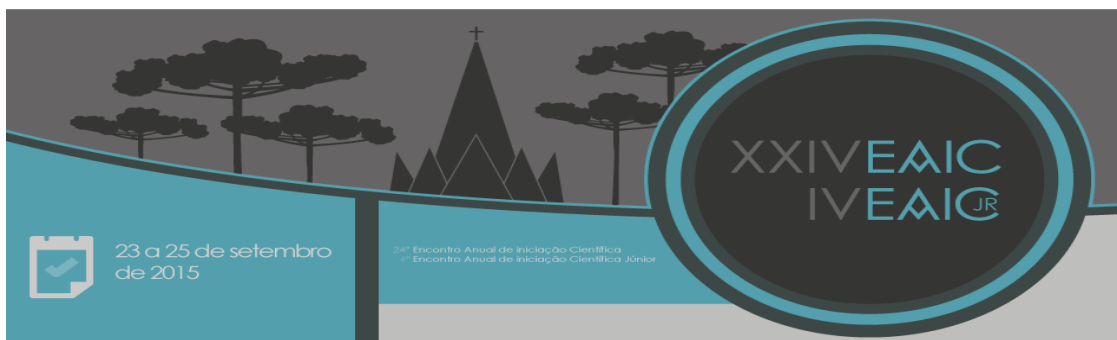
**Palavras-chave:** sinergismo, atividade antibacteriana, óleos essenciais.

### **Resumo:**

Com a valorização de produtos naturais na substituição de componentes sintéticos, houve um crescimento de pesquisas com foco na atividade antibacteriana de óleos essenciais e de seus componentes. Estas substâncias, como carvacrol e timol, tem demonstrado ser uma alternativa na conservação de alimentos devido sua atividade antimicrobiana. Neste contexto, estudos recentes mostram que a associação desses componentes pode ser ainda mais eficaz no combate a patógenos transmitidos por alimentos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade sinérgica entre carvacrol e timol sobre *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) utilizando o método de micro diluição em caldo, ação sinérgica entre carvacrol e timol pelo método *chequerboard* e também foram realizados os ensaios de curva do tempo de morte. Tanto o timol como o carvacrol possuem atividade antimicrobiana e potencial sinérgico nas concentrações testadas sobre *Salmonella Typhimurium*, porém sobre *Staphylococcus aureus* somente o carvacrol apresentou atividade antimicrobiana. Os resultados obtidos mostram que, carvacrol e timol podem ser uma alternativa natural para controle de patógenos de origem alimentar.

### **Introdução**

A valorização de produtos naturais para a substituição de componentes sintéticos vem crescendo substancialmente. Neste contexto, diversos óleos essenciais e seus componentes tem sido investigados quanto ao seu potencial antibacteriano e o uso destas substâncias como uma



alternativa na conservação de alimentos tem sido demonstrado (SOUSA et al., 2012). Carvacrol, componente majoritário dos óleos essenciais de orégano e tomilho, e timol, componente majoritário do óleo essencial de tomilho apresentam atividade antibacteriana sobre *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*. (HYLDGAARD et al., 2012).

*Salmonella* Typhimurium é o principal agente de doenças transmitidas por alimentos em todo mundo. No Brasil, entre 2000 e 2013, foi a maior causa de doenças de origem alimentar. *S. aureus* é responsável por surtos relacionados ao consumo de alimentos frescos e processados em todo o mundo. No Brasil, foi o segundo agente mais associado a surtos de doenças transmitidas por alimentos no período de 2000 a 2013.

Assim, a investigação do efeito sinérgico entre carvacrol e timol faz-se uma alternativa interessante. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade sinérgica entre carvacrol e timol sobre *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

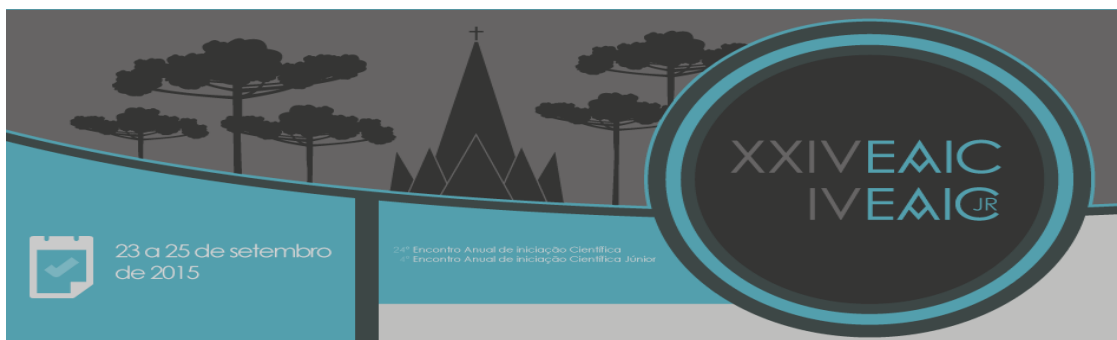
## **Materiais e métodos**

**Isolados bacterianos:** Foram testados os isolados *Salmonella* enterica sorotipo Typhimurium ATCC 14028 e *Staphylococcus. Aureus* ATCC 25923.

**Determinação da CIM e CBM de carvacrol e timol sobre *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus*:** A CIM do carvacrol e do timol foram determinadas utilizando método de micro diluição em caldo segundo o documento M100-S22/2012 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Para determinação da CBM foram retirados 10µL dos poços sem crescimento microbiano e semeados em Ágar Hektoen para *S. Typhimurium* e Ágar Baird Parker para *S. aureus*.

**Avaliação do potencial sinérgico entre carvacrol e timol sobre *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus*:** O ensaio de sinergismo foi realizado pelo método de micro diluição em caldo e determinado pelo cálculo da Concentração Inibitória Fracionada (CIF). Para isso, carvacrol e timol foram combinados num esquema de *checkerboard*.

**Ensaio da curva do tempo de morte:** No ensaio de curva do tempo de morte as bactérias foram tratadas com carvacrol e timol em diferentes concentrações. Nos intervalos de tempo predeterminados as bactérias foram semeadas em Ágar Mueller-Hinton e as placas foram incubadas a 35°C por 12 a 24h.



## Resultados e Discussão

A CIM e CBM do timol e carvacrol para *S. Typhimurium* e *S. aureus*, bem como o resultado do ensaio de *chequerboard* estão apresentados na tabela 1. Os resultados deste estudo apóiam aos de outros autores que investigaram sobre a eficácia de timol e carvacrol em *S. Typhimurium* e *S. aureus*. Zheng et al. (2013) observaram CIM médias de 167  $\mu\text{g/mL}$  para carvacrol contra bactérias deteriorantes, indicando um forte efeito antimicrobiano em comparação com o timol que obteve CIM média de 648  $\mu\text{g/mL}$ . No ensaio de *chequerboard* observamos que em combinação, timol e carvacrol atuaram de forma sinérgica para inibir o crescimento de *S. Typhimurium*, apresentando CIF 0,141.

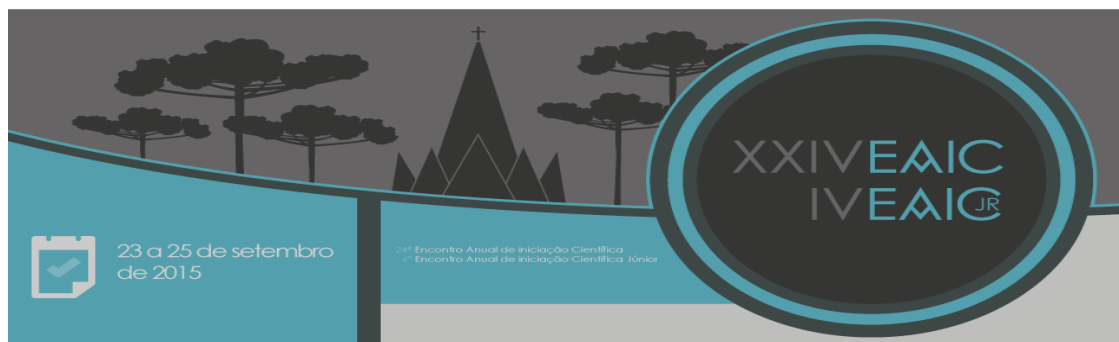
O ensaio de curva do tempo de morte foi realizado com carvacrol e timol para *S. Typhimurium* ATCC 14028 e somente com carvacrol para *S. aureus* ATCC 25923. A determinação da curva tempo de morte de *S. aureus* tratado com  $0.75 \times \text{CIM}$  de carvacrol (234  $\mu\text{g/mL}$ ) mostrou que esta concentração sub-inibitória, não foi capaz de diminuir a contagem bacteriana. No inóculo bacteriano tratado com a CIM (312  $\mu\text{g/mL}$ ) verificou-se que houve diminuição da contagem bacteriana a partir de 3h e com  $2 \times \text{CIM}$  (624  $\mu\text{g/mL}$ ) não foram recuperadas células viáveis a partir de 6h.

O resultado do ensaio de curva de morte para *S. Typhimurium* tratada com  $0.75 \times \text{CIM}$  (117  $\mu\text{g/mL}$ ) de carvacrol, mostrou que esta concentração sub-inibitória, não foi capaz de diminuir a contagem bacteriana. No tratamento com a CIM (156  $\mu\text{g/mL}$ ) não foram recuperadas células viáveis após 6 horas. As contagens de *S. Typhimurium* foram reduzidas aproximadamente 2 log UFC/mL, com  $0.75 \times \text{CIM}$  (234  $\mu\text{g/mL}$ ) de timol, comparado com o controle e na CIM (312  $\mu\text{g/mL}$ ) não foram recuperadas células viáveis a partir de 6h.

**Tabela 1:** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), Índice da Concentração Inibitória Fracional (CIF) de Timol e Carvacrol com *S. Typhimurium* e *S. aureus*.

Microrganismo	CIM/CBM ( $\mu\text{g/ml}$ )				<i>Chequerboard</i>	
	Timol		Carvacrol		CIF	INTERPRETAÇÃO
<i>S. Typhimurium</i>	312	625	156	156	0,141	Sinérgico
<i>S. aureus</i>	>5000	>5000	312	312	*	*

\*, não realizado



## Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho indicam atividade antibacteriana dos compostos timol e carvacrol sozinhos e em combinação contra *S. Typhimurium*, e também atividade antibacteriana de carvacrol para *S. aureus*.

## Agradecimentos

Pelo financiamento realizado pelo CNPq, Bolsa PIBIC/CNPq-UEM.

## Referências

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22, Wayne, PA, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Front Microbiol.**, v. 3, p. 1-24, 2012.

SOUSA, J. P.; AZERÊDO, G. A.; TORRES, R. A.; VASCONCELOS, M. A. S.; CONCEIÇÃO, M. L.; SOUZA, E. L. Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. **Int J Food Microbiol.**, v. 154, p. 145–51, 2012.

ZHENG, L.; BAE, YOUNG-MIN.; JUNG, KYU-SEOK.; HEU, S.; LEE, SUN-YOUNG. Antimicrobial activity of natural antimicrobial substances against spoilage bacteria isolated from fresh produce. **Food Control.**, v. 32, p. 665-72, 2013.