

ATIVIDADE INIBITÓRIA E BACTERICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA BACTÉRIAS CAUSADORAS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTAS)

Giovanna Maisa Macanhan (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Lidaiane Mariáh Silva dos Santos Franciscato, Cristiane Mengue Feniman Moritz (Orientadora), e-mail: crisfeniman@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Tecnologia /Umuarama, PR.

Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Subárea: Microbiologia de Alimentos

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, manjeriço, orégano.

Resumo: Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OEs) de orégano (*Origanum vulgare*), manjeriço (*Ocimum basilicum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) contra *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. *Typhimurium*, *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar. *Typhi* e *Shigella flexneri*, além de determinar o efeito bactericida nos tempos de 2, 4, 6, 10 e 24 horas. A atividade antibacteriana dos OEs foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) pelo método da microdiluição em caldo, nas concentrações de 25,6, 12,8, 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 e 0,05 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ dos OEs. Neste estudo, o OE de manjeriço não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas. O OE de orégano apresentou a melhor ação antimicrobiana (CIM entre 3,2 e 6,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para todas as bactérias testadas. Com apenas quatro horas de contato o OE de tomilho teve ação bactericida contra *E. coli* e *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar. *Typhimurium* na CBM entre 3,2 e 6,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Introdução

A contaminação microbiológica é uma das principais causas de deterioração dos alimentos, com conseqüente interferência na segurança do alimento e na sua qualidade nutricional e sensorial (GRANATA et al., 2018).

Os OEs de plantas possuem notável eficácia antimicrobiana e, portanto, têm grande potencial como uma alternativa aos conservantes sintéticos (PRAKASH et al., 2018). Embora a indústria de alimentos utilize principalmente OEs como aromatizantes, eles representam uma fonte interessante de antimicrobianos naturais. Apesar do potencial demonstrado dos OEs e dos seus constituintes em testes *in vitro*, a utilização desses como conservante em alimentos tem sido limitada em virtude das altas concentrações necessárias para alcançar eficiente atividade antimicrobiana no alimento (HYLDGAARD et al., 2012). Portanto, é necessário

determinar a menor concentração antimicrobiana e sensorialmente aceitável, objetivando a aplicação em alimentos sem qualquer alteração na aceitação quanto ao olfato e paladar (TURGIS et al., 2012).

As plantas da família Lamiaceae como orégano, tomilho e manjerição têm despertado interesse devido ao seu potencial como antimicrobiano, sendo que muitas das espécies dessa família, que foram introduzidas no Brasil, são plantas medicinais e produtoras de OEs, além de serem também utilizadas como condimentos (BRONDANI et al., 2018).

O objetivo deste estudo foi identificar a atividade inibitória e bactericida dos OEs de orégano, manjerição e tomilho contra bactérias causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs).

Materiais e métodos

Utilizou-se o método da microdiluição em caldo, testando os OEs de orégano (*Origanum vulgare*), manjerição (*Ocimum basilicum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), determinando a CIM e a CBM desses OEs. Testaram as concentrações 25,6, 12,8, 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 e 0,05 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium, *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhi e *Shigella flexner*.

Para a preparação da maior concentração, cada óleo essencial foi diluído em partes iguais de propilenoglicol e posteriormente em Caldo Mueller Hinton (MH) com 0,5% de Tween 80, obtendo-se uma concentração dupla. A partir dessa concentração foi realizada a diluição seriada na microplaca para obtenção de 50 μL de cada concentração (colunas) nos poços da microplaca. As concentrações serão 2x as concentrações a foram testadas.

As bactérias foram ativadas e incubadas a 37°C por 24 horas, para depois ser padronizadas utilizado o espectrofotômetro com comprimento de onda de 625nm. Então o inóculo foi preparado com duas diluições seriadas, a primeira diluição na proporção de 1:10 em solução salina e depois outra diluição 1:10 em Caldo MH.

Na microplaca foram adicionados 50 μL do inóculo em cada poço e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Para verificação da CIM foram adicionados 50 μL do indicador resazurina 0,01% em cada poço da microplaca e a mesma incubada novamente a 37°C por 2 horas para a realização da leitura. O desenvolvimento de coloração rosa indicou-se o crescimento bacteriano e a permanência da coloração azul indicou-se a inibição bacteriana.

A verificação do CBM e a curva de morte microbiana foi determinada pelo estriamento de cada poço em placas de Petri contendo Ágar MH, antes da adição da resazurina na microplaca. As placas foram incubadas em condições de aerobiose, e replicados em intervalos de 2, 4, 6, 10 e 24 horas a 37°C. O não desenvolvimento de colônia bacteriana nos repiques de cada poço indicou-se a atividade bactericida. Foram preparados os controles negativos e controles positivos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Resultados e Discussão

Para o OE de orégano, todas as bactérias apresentaram o mesmo valor de CIM (entre 3,2 e 6,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Já para o OE de tomilho, as bactérias *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae* e *Pseudomonas aeruginosa* foram mais resistentes a esse tipo de óleo essencial, com CIM de 12,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, nesse presente estudo o OE de orégano foi mais eficiente como antimicrobiano.

O tempo necessário para que ocorresse o efeito bactericida (tempo de morte) do OE de orégano foi entre 6 e 10 horas, com exceção de *Staphylococcus aureus* que necessitou de 24 horas de contato com os OEs para ter o efeito bactericida na concentração de CBM final. No entanto, o OE de orégano exibiu ação bactericida em um menor tempo (em 4 horas) contra a cepa de *Escherichia coli*, sendo a menos resistente contra esse óleo. As espécies *Shigella dysenteriae* e *Shigella flexneri* foram mortas após 6 horas de contato com o OE de orégano, enquanto que para *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* ocorreu morte bacteriana total após 10 e 24 horas de contato com o OE de orégano. A cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhi foi a mais resistente ao OE de orégano, mesmo após 24 horas de contato com o OE, a sua CBM foi maior (entre 6,4 e 12,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em relação às demais espécies estudadas (entre 3,2 e 6,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

O OE de tomilho na CBM mostrou ação bactericida após 2 horas de contato com as espécies de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium, sendo essas bactérias as menos resistentes contra esse OE. As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella flexneri* tiveram morte celular total após 6 horas de contato com o OE de tomilho e as células de *Bacillus cereus* e *Shigella dysenteriae* foram mortas com após o tempo de 10 horas de contato. Para *Staphylococcus aureus* houve a necessidade de 24 horas de contato ser determinada a CBM entre 3,2 e 6,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A cepa *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhi foi a mais resistente ao OE de tomilho, mesmo com 24 horas de contato, foi a que apresentou maior concentração bactericida mínima, entre 6,4 e 12,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O OE de manjerição não apresentou resultados de concentrações inibitórias e nem bactericidas mínimas para as bactérias testadas no presente estudo, sendo então consideradas a CIM e a CBM > 25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Conclusões

O OE de orégano apresentou a melhor ação antimicrobiana (CIM entre 3,2 e 6,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para todas as bactérias testadas, enquanto que o OE de tomilho inibiu as bactérias *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae* e *Pseudomonas aeruginosa* na CIM entre 6,4 e 12,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Com apenas quatro horas de contato o OE de orégano teve ação bactericida contra *Escherichia coli* e o OE de tomilho teve ação bactericida contra *E. coli* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium, ambos com CBM entre 3,2 e 6,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Apenas para *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhi a CBM de ambos os OEs foi entre 6,4 e 12,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para as demais bactérias testadas a CBM dos dois OEs foi entre 3,2 e 6,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pela bolsa concedida.

Referências

BRONDANI, L. P.; NETO, A. S.; FREITAG, A.; LUND, G. Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 1, p. 94-100, 2018.

GRANATA, G.; STRACQUADANIO, S.; LEONARDI, M.; NAPOLI, E.; CONSOLI, G. M. L.; CAFISO, V.; STEFANI, S.; GERACI, C. Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. **Food Chemistry**, n. 269, p. 286-298, 2018.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v.3, n.12, p. 1–24, 2012.

PRAKASH, B.; KAJUR, A.; YADAY, A.; KUMAR, A.; SINGH, P. P.; DUBEY, N. K. Nanoencapsulation: an efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, n. 89, p. 1-11, 2018.

TURGIS, M.; VU, K. D.; DUPONT, C.; LACROIX, M. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 696-702, 2012.