

ASSOCIAÇÃO ENTRE COMPOSTOS NATURAIS E SORBATO DE POTÁSSIO NO CONTROLE DE BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS

Leonardo Henrique Ribeiro (PIBIC/CNPq), Jane Martha Graton Mikcha (Orientador),
e-mail: leonardo.hlribeiro@me.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde/Maringá, PR.

Ciência e tecnologia de alimentos, Microbiologia de Alimentos.

Palavras-chave: sinergismo, sorbato de potássio, óleos essenciais.

Resumo:

O uso excessivo de conservantes químicos tem sido motivo de preocupação devido a suas reações adversas. Uma alternativa seria a substituição desses conservantes por compostos naturais, no entanto, em algumas situações, o seu uso pode mudar as propriedades organolépticas dos alimentos. Diante disso, avaliamos o efeito da associação entre sorbato de potássio (SP) e os compostos naturais (carvacrol, eugenol e cinamaldeído) *in vitro*. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do SP e do carvacrol, eugenol e cinamaldeído contra *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O efeito da associação do SP com os compostos naturais foi realizado pelo método do *Checkerboard*. O efeito sinérgico foi observado na associação do SP com as três substâncias avaliadas para as bactérias Gram negativas, sendo uma alternativa para o controle de patógenos de origem alimentar.

Introdução

No Brasil, entre os anos de 2000 e 2017, houveram 12.660 surtos de doenças transmitidas por alimentos, deixando 239.164 pessoas doentes e causando 186 óbitos. Dos agentes identificados, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* somam 81,4% e representam os três patógenos que mais estiveram envolvidos (BRASIL, 2018).

Os conservantes químicos estão entre as estratégias mais comuns empregadas pela indústria de alimentos para o controle de microrganismos. O SP é um sal potássico do ácido sórbico muito útil para a conservação de diversos alimentos. Porém, ele também pode apresentar ação prejudicial à saúde humana quando consumido em quantidades elevadas (KAMANKESH et al., 2013).

O uso de óleos essenciais de plantas e seus constituintes apresentam-se como uma alternativa, pois possuem um amplo efeito antimicrobiano sem apresentar toxicidade para o ser humano (MOLINOS et al., 2009). Em contrapartida, a aplicação desses compostos como conservantes alimentícios é limitada pelo seu sabor e odor quando presentes em altas concentrações (ZHOU, 2007). A fim de evitar que estas alterações ocorram, uma alternativa é utilizar de uma interação positiva onde há a

combinação entre dois ou mais compostos e os mesmos exerçam um efeito inibitório contra agentes microbianos (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

Sendo assim, objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de SP e dos compostos naturais: carvacrol, eugenol e cinamaldeído contra *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Foi avaliado, também, o efeito antibacteriano da associação entre o composto químico sintético e os compostos naturais contra as mesmas bactérias.

Materiais e métodos

Cultivo das bactérias e Agentes antimicrobianos

Salmonella Typhimurium ATCC 14028, *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923 foram estocadas em caldo Infusão Cérebro e Coração suplementado com 20% de glicerol a -20 °C. O SP (Vetec, Jaraguá do Sul, Brazil), o carvacrol, eugenol e cinamaldeído (pureza $\geq 98\%$; Sigma-Aldrich) foram adquiridos comercialmente.

Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

A CIM e a CBM do SP e dos compostos naturais foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo. A cultura bacteriana foi cultivada em caldo Mueller Hinton (MHB), por 6 h a 35 °C, a suspensão bacteriana foi padronizada de acordo com a escala de Mc Farland 0,5 e diluída para obter 5×10^6 UFC/ml. Foram inoculados 10 μ L das culturas padronizadas em microplacas com 96 poços, contendo 100 μ L dos compostos naturais e sintético diluídos em caldo MHB. O SP foi testado nas concentrações de 0,312 a 320 mg/mL e os compostos naturais nas concentrações de 19 a 5.000 μ g/mL. Após incubação a 35 °C por 24 h, a CIM foi determinada visualmente identificando-se a concentração mais baixa na qual não foi observado o crescimento bacteriano. Alíquotas de 20 μ L foram removidas dos poços onde não for possível observar crescimento bacteriano e inoculadas em Ágar Tripton de Soja. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. A CBM foi determinada como a menor concentração onde não foi observado crescimento bacteriano.

Avaliação do potencial sinérgico (método checkerboard)

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços contendo de 100 μ L de MHB onde o SP com concentração inicial de 320 mg/mL, foi diluído seriadamente no eixo X e os compostos naturais, com concentração inicial de 5.000 μ g/mL, diluídos no eixo Y. As suspensões bacterianas padronizadas foram inoculadas em todos os poços e a microplaca foi incubada a 35 °C por 24 h. O Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) foi calculado a partir de $ICIF = CIF(SP) + CIF(\text{composto natural})$ onde, $CIF(SP) = [CIM(SP) \text{ na combinação}] / [CIM(SP) \text{ sozinho}]$ e $CIF(\text{composto natural}) = [CIM(\text{composto natural}) \text{ na combinação}] / [CIM(\text{composto natural}) \text{ sozinho}]$. Os resultados foram interpretados como efeito sinérgico ($ICIF < 0.5$); aditivo $0.5 \leq ICIF \leq 1$; indiferente ($1 < ICIF \leq 4$) ou antagônico ($ICIF > 4$).

Ensaio de curva de morte

O ensaio de curva de morte foi realizado para as combinações de SP e compostos naturais que obtiveram resultado sinérgico no método de *checkerboard*.

As culturas *overnight* foram padronizadas pela escala McFarland 1, diluídas para obtenção de 6×10^7 UFC/mL e transferidas para tubos contendo MHB suplementado com os antimicrobianos sozinhos e em combinação. As concentrações dos antimicrobianos foram determinadas a partir dos resultados encontrados no método de *checkerboard*. Alíquotas de 100 µL foram removidas em intervalos de 0, 3, 6, 12 e 24h, diluídas em série e semeadas em Ágar Mueller Hinton (MHA). As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 h.

Resultados e Discussão

Carvacrol e cinamaldeído apresentaram CIM e CBM de 312 µg/ml para todas as bactérias, enquanto a CIM e a CBM do eugenol foi 312 µg/ml para *S. Typhimurium* e 1250 µg/ml para *E. coli* e *S. aureus* (Tabela 1). Nota-se que as CIM e CBM do SP foram menores para as bactérias Gram negativas e, também, que as CIM e CBM das substâncias naturais para as bactérias estudadas, foram em média 100 vezes menores que as de SP (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do sobato de potássio e substâncias naturais.*

	SP	Carvacrol	Cinamaldeído	Eugenol
S. Typhimurium	20 mg/ml	312 µg/ml	312 µg/ml	312 µg/ml
E. coli	10 mg/ml	312 µg/ml	312 µg/ml	1250 µg/ml
S. aureus	160 mg/ml	312 µg/ml	312 µg/ml	1250 µg/ml

* Os valores de CIM e CBM foram idênticos

Os ensaios para a avaliação do potencial sinérgico (Tabela 2) demonstraram os melhores resultados para as bactérias Gram negativas, onde o SP atuou sinérgicamente com cinamaldeído contra *E. coli* e contra *S. Typhimurium* ao ser associado ao carvacrol e ao eugenol.

Tabela 2 – Avaliação potencial sinérgico entre o sobato de potássio e as substâncias naturais.

	Carvacrol	Cinamaldeído	Eugenol
S. Typhimurium	Sinérgico	Aditivo	Sinérgico
E. coli	Aditivo	Sinérgico	Indiferente
S. aureus	Indiferente	Aditivo	Indiferente

Com base nos resultados do *checkerboard*, foram realizados os ensaios de curva de morte utilizando as CIM obtidas nas associações que apresentaram resultado sinérgico. Para *E. coli*, foram utilizadas as concentrações de 0,625 mg/mL de SP e 39 µg/mL de cinamaldeído. Já para *S. Typhimurium*, foram testadas as concentrações de 2,5 mg/mL de SP e 39 µg/mL de eugenol, e de 1,25 mg/mL de SP e 39 µg/mL de carvacrol. Porém, no período de 24h, não houve a morte das bactérias avaliadas.

Conclusões

Foi possível observar a atividade sinérgica do SP quando associado ao carvacrol e ao eugenol contra *S. Typhimurium*. Contra *E. coli*, o efeito sinérgico foi observado na associação de SP com o cinamaldeído. Com isso, os compostos naturais se configuram como uma possível alternativa as combate de alguns microrganismos, visto a grande procura do mercado consumidor por alimentos com menor índice de conservantes químicos.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, amigos, e à minha orientadora Prof^a Dr^a Jane, que me deu todo suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço, também à CAPES e à UEM pela oferta da bolsa durante o decorrer deste projeto.

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. Acesso em: 29 de Jul. 2019.

KAMANKESH, M., MOHAMMADI, A., TEHRANI, Z. M., FERDOWSI, R., & HOSSEINI, H. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of benzoate and sorbate in yogurt drinks and method optimization by central composite design. **Talanta**, 109, 46-51, 2013.

MOLINOS, A. C; ABRIOUEL, H; LÓPEZ, R. L; OMAR, N. B; VALDIVIA, E; GÁLVEZ, A. Enhanced bactericidal activity of enterocin AS-48 in combination with essential oils, natural bioactive compounds and chemical preservatives against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salad. **Food Chemistry and Toxicology**, 47, 2216-2223, 2009.

WAGNER, A., ULRICH-MERZENICH. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, 16, 19-110, 2009.

ZHOU, F; JI, B; ZHANG H; JIANG, H; YANG, Z; LI, J; YAN, W. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella Typhimurium*. **Journal of Food Safety**, 27, 124-133, 2007.