

## ASSOCIAÇÃO DE SORBATO DE POTÁSSIO COM COMPOSTOS NATURAIS NO CONTROLE DE *Escherichia coli*

Maelly Thaís da Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Andreia Farias Pereira Batista,  
Maíra Dante Formagio, Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá, Jane Martha  
Graton Mikcha (Orientadora), e-mail: jmgmikcha@uem.br.

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

**Ciência e tecnologia de alimentos (50700006)/Microbiologia de  
alimentos (50701037)**

**Palavras-chave:** alimento; antimicrobiano; composto natural.

### Resumo:

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) representam um grave problema de saúde pública. Por isso, os conservantes são utilizados a fim de controlar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis nos alimentos. Há uma busca por compostos naturais que sejam uma alternativa de uso. Por isso, neste trabalho foi avaliada a atividade antimicrobiana do sorbato de potássio (SP) sozinho e combinado com os compostos naturais: carvacrol, cinamaldeído, eugenol e timol contra *Escherichia coli* ATCC 25922. Para isso, foi determinada a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima, em seguida foi feito o método de *checkerboard* para analisar o efeito da associação do SP com os compostos naturais, e por fim foi realizado o ensaio de curva de morte. A combinação de SP+cinamaldeído teve resultado indiferente. Nas demais combinações houve sinergismo, ou seja, todas foram mais eficazes do que o SP isolado. Conclui-se que as combinações de SP+carvacrol, SP+eugenol e SP+timol foram sinérgicas contra *Escherichia coli*.

### Introdução

A ingestão de alimentos contaminados é a causa de mais de 200 tipos de doenças. Estima-se que uma a cada 10 pessoas adocece após consumir um alimento contaminado, e que 420 mil pessoas morrem a cada ano por esse mesmo motivo no mundo (OPAS, 2020).

Os microrganismos são um dos causadores do problema de contaminação alimentar, sendo a *Escherichia coli* uma das mais comuns (SILVA, 2015). Embora a maioria das cepas de *E. coli* sejam inofensivas, há cepas que podem causar gastroenterites quando há ingestão de alimento ou água contaminados (ABU-GHAZALEH, 2013). Como solução fungicida e bactericida, são utilizados conservantes sintéticos alimentares a exemplo do

SP. No entanto, existe uma crescente procura por alternativas naturais para esses conservantes (SILVA, 2015).

Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade do sorbato de potássio sozinho e combinado com os compostos naturais: carvacrol, timol, eugenol e cinamaldeído contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

## Materiais e métodos

A bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922, foi armazenada em caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) suplementado com 20% de glicerol a -20 °C no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Todas as substâncias foram adquiridas comercialmente. As substâncias utilizadas foram: SP (Vetec, Jaraguá do Sul, Brazil), carvacrol, timol, eugenol e cinamaldeído (pureza  $\geq 98\%$ ; Sigma-Aldrich), todas adquiridas comercialmente.

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do SP e dos compostos naturais, os ensaios foram realizados de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), utilizando o método de microdiluição em caldo. A cultura bacteriana foi cultivada em caldo Mueller Hinton (MHB), por 6 horas a 35 °C, após a incubação, a suspensão bacteriana foi padronizada de acordo com a escala de Mc Farland 0,5 e diluída para obter  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Após a padronização, foram inoculados 10  $\mu$ L de suspensão bacteriana em poços de microplacas com 96 poços, contendo 100  $\mu$ L dos compostos naturais e sintético diluído em caldo MHB. O SP foi diluído seriadamente em MHB nas concentrações de 0,312 a 320 mg/mL e os compostos naturais nas concentrações de 7,8 a 1.000  $\mu$ g/mL. A microplaca contendo 96 poços foi incubada a 35 °C por 24 horas. Após a incubação, foi possível determinar visualmente a CIM, identificando a concentração mais baixa em que não foi observado crescimento bacteriano.

Logo após, foi determinada a CBM. Alíquotas de 20  $\mu$ L foram removidas dos poços onde não foi possível observar crescimento bacteriano, e foram inoculados em Ágar Tripton de Soja (TSA). As placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas. A CBM foi determinada como a menor concentração onde não foi observado crescimento bacteriano nas placas.

Com as concentrações de CIM e CBM determinadas, foi possível avaliar o potencial sinérgico das substâncias, utilizando do método *Checkerboard* descrito por Doern (2014). O ensaio foi realizado em uma microplaca de 96 poços contendo 100  $\mu$ L de MHB onde SP, com concentração inicial de 320 mg/mL, foi diluído seriadamente no eixo X e os compostos naturais, com concentração inicial de 1.000  $\mu$ g/mL, foram diluídos no eixo Y. A suspensão bacteriana padronizada foi inoculada em todos os poços e a microplaca foi incubada em estufa a 35 °C por 24 horas. Após a incubação, foi calculado o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) utilizando a seguinte fórmula:  $ICIF = CIF(SP) + CIF(\text{Composto natural})$ . Os resultados foram interpretados como: efeito sinérgico ( $ICIF < 0.5$ ); aditivo ( $0.5 \leq ICIF < 1$ );

indiferente ( $1 < ICIF < 4$ ) ou antagonico ( $ICIF > 4$ ) de acordo com Pillai, Moellering e Eliopoulos (2005).

O ensaio de curva de morte foi realizado de acordo com Isenberg (2004) com algumas modificações, para as combinações de SP e os compostos naturais que obtiveram resultado sinérgico no método de *checkerboard*. As culturas *overnight* de *E. coli* foram padronizadas pela escala de Mc Farland 1 e diluídas 1:5 para obtenção  $6 \times 10^7$  UFC/mL e transferidas para tubos contendo 10 mL de MHB suplementado com os antimicrobianos sozinhos e em combinação. As concentrações de antimicrobianos foram determinadas a partir dos resultados encontrados no método de *checkerboard*. Como controle, foi utilizado MHB inoculado com a bactéria sem os antimicrobianos. Aliquotas de 100  $\mu$ L foram removidas em intervalos de 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas, diluídas em série e semeadas em Ágar Mueller Hinton (MHA). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. As colônias foram contadas e os resultados estão expressos em gráfico de cinética de crescimento ( $\text{Log}_{10}$  UFC/mL) em função do tempo (horas).

## Resultados e Discussão

Os resultados da CIM e CBM para o SP foram 2,5 mg/mL, e 10 mg/mL respectivamente, o que corrobora com os resultados encontrados por Silva et al (2015) do composto em *E. coli*, sendo CIM e CBM  $>1$  mg/mL. Já para os compostos naturais, CIM e CBM foram iguais, sendo 312  $\mu$ g/mL para os compostos carvacrol e cinamaldeído e, 625  $\mu$ g/mL para eugenol e timol. Similarmente, Pei et al (2009) encontraram valores de CIM para os compostos carvacrol, cinamaldeído, timol e eugenol de 400, 400, 400, 1600  $\mu$ g/mL, respectivamente contra *E. coli*. Os valores de CBM para eugenol, cinamaldeído, timol e carvacrol foram 1600, 1600, 800 e 800  $\mu$ g/mL, respectivamente. Com esses resultados foi realizado o ensaio de *checkerboard* para avaliar o sinergismo das combinações de SP e os compostos naturais. Na combinação de SP+cinamaldeído o ICIF foi 2, o que significa que o resultado é indiferente. Nas demais combinações (SP+carvacrol, SP+eugenol, SP+timol) o ICIF foi de 0,19, o que indica sinergismo. O ensaio de curva de morte foi feito apenas com as combinações sinérgicas. No ensaio de SP+carvacrol, a mistura conseguiu eliminar todas as bactérias no tempo de 24 horas, já para SP, apenas no tempo de 72 horas, não foram recuperadas células viáveis. O carvacrol sozinho não teve ação bactericida. No ensaio de SP+eugenol, a mistura não recuperou células viáveis em 12 horas de tratamento, enquanto para o SP sozinho esse resultado foi obtido após 24 horas, e o eugenol sozinho não teve ação bactericida. No ensaio de SP+timol, a mistura e o SP sozinho conseguiram eliminar as bactérias viáveis no tempo de 6 e 24 horas, respectivamente, e o timol não teve ação bactericida. Similarmente, Abu-Ghazaleh (2013) relataram que as combinações com SP (SP+ácido cítrico, SP+NaCl, SP+extrato de tomilho) potencializaram o efeito do composto sozinho contra *Escherichia coli*.

## Conclusões

Os resultados mostram que os produtos naturais com exceção ao cinamaldeído, potencializam o efeito do sorbato de potássio contra *E. coli*. Essa pode ser uma alternativa promissora para o controle de patógenos de origem alimentar incentivando futuros estudos.

## Agradecimentos

Agradeço a orientadora Jane Martha Graton Mikcha, ao laboratório de microbiologia de alimentos da Universidade Estadual de Maringá e ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

## Referências

ABU-GHAZALEH, B. M. Effects of ascorbic acid, citric acid, lactic acid, NaCl, potassium sorbate and *Thymus vulgaris* extract on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n.1, p. 7-12, 2013.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Tenth Edition. **CLSI document M07-A10**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. **PANAFTOSA pede aos países que estabeleçam medidas para garantir a segurança alimentar em toda a cadeia produtiva**. 2020. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/news/5-6-2020-panaftosa-calls-countries-establish-measures-guarantee-food-safety-throughout>>. Acesso em: 19 ago. 2021.

PEI R. S. *et al.* Evaluation of Combined Antibacterial Effects of Eugenol, Cinnamaldehyde, Thymol, and Carvacrol against *E. coli* with an Improved Method. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 7, p. M379-83, 2009.

SILVA, A. A. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (Tomilho), *Syzygium aromaticum* (Cravo-da-Índia) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) e dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **B. CEPPA**, Curitiba, v.33, n.1, p. 111-117, jan./jun. 2015.