

ASSOCIAÇÃO DE BENZOATO DE SÓDIO E COMPOSTOS NATURAIS NO CONTROLE DE PATÓGENOS DE ORIGEM ALIMENTAR

Laura Beatriz Marques Martins (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jane Martha Graton Mikcha (Orientador), e-mail: ra122934@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: benzoato de sódio, compostos naturais, antimicrobiano.

Resumo:

Na indústria de alimentos, o cuidado com a contaminação microbiana é imprescindível para garantir que o alimento não perca sua qualidade e nem cause danos ao consumidor. Um dos métodos encontrados pela indústria para o controle antimicrobiano, é o uso de conservantes químicos. Paralelamente, nos últimos anos os compostos naturais têm ganhado visibilidade e se tornado uma opção para a conservação de alimentos, devido ao seu potencial antimicrobiano. Isto posto, o presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana de benzoato de sódio (BS) sozinho e combinado com os compostos naturais: carvacrol e cinamaldeído contra *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para isso foi determinada a concentração bactericida mínima, a concentração inibitória mínima e em seguida foi feito o método *checkerboard* para analisar o efeito de associação do BS com os compostos naturais. O efeito sinérgico e aditivo foi observado na associação do BS com as duas substâncias avaliadas para as bactérias estudadas, sendo uma alternativa para o controle de patógenos de origem alimentar.

Introdução

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) representam grande alerta na saúde pública, nesse sentido a indústria alimentícia caminha de maneira a garantir a qualidade microbiológica dos alimentos a fim de frear a proliferação de microrganismos danosos à saúde humana. Os principais agentes causadores de DTAs são os vírus e as bactérias, sendo mais frequente o segundo grupo, dentre eles, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. No Brasil, nos anos de 2012 a 2021 os Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHAs) foram liderados por *E. coli* (29,6%), seguido de *S. aureus* (12,9%) e *Salmonella* spp (11,2%) (BRASIL, 2022).

Um dos métodos de conservação utilizado na indústria, é o uso de conservantes alimentares químicos, os quais inibem o crescimento microbiano, a exemplo do

benzoato de sódio (BS) – um sal de sódio utilizado em ampla escala em alimentos (BRUNA; THAIS; LÍGIA, 2018).

Paralelamente, há uma crescente valorização do uso de conservantes naturais devido ao seu potencial antimicrobiano em alimentos (CHEN *et al.*, 2016). O uso combinado destas substâncias com compostos químicos sintéticos potencializa o efeito inibitório contra agentes microbianos (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009). Assim, o objetivo de conservação e de segurança microbiológica é alcançado sem comprometer as características sensoriais do alimento, tornando-o seguro e agradável ao paladar do consumidor. Do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a associação de BS e compostos naturais (carvacrol e cinamaldeído) como uma opção na ação antimicrobiana, na tentativa de diminuir o uso excessivo de conservantes químicos.

Materiais e Métodos

Cultivo da Bactéria

Nesta pesquisa serão estudadas *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 estocadas em caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) suplementado com 20% de glicerol a -20 °C.

Agentes antimicrobianos, Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

As substâncias utilizadas no presente estudo foram adquiridas comercialmente. Benzoato de sódio (Nuclear), carvacrol e cinamaldeído (Sigma). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de BS e dos compostos naturais foram determinadas de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), utilizando o método de microdiluição em caldo. As culturas bacterianas foram cultivadas em caldo Mueller Hinton (MHB) e padronizadas de acordo com a escala de Mc Farland 0,5. O BS foi diluído seriadamente em MHB ácido (pH 4,8) nas concentrações de 0,009 a 20 mg/mL e os compostos naturais nas concentrações de 7,8 a 1.000 µg/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. Após a determinação da CIM, alíquotas de 20 µL foram removidas dos poços onde não for possível observar crescimento bacteriano e foram inoculados em Ágar Tripton de Soja (TSA). As placas foram incubadas em estufa de 35 °C por 24 h. A CBM foi determinada como a menor concentração onde não for observado crescimento bacteriano

Avaliação do potencial sinérgico (método Checkerboard)

As interações entre o BS e os compostos naturais foram avaliadas pelo método de *checkerboard*. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços contendo de 100

μL de MHB em pH 4,8, onde BS apresentava concentração inicial de 40 mg/mL, foi diluído seriadamente no eixo X e os compostos naturais, com concentração inicial de 5000 $\mu\text{g/mL}$, foram diluídos no eixo Y da mesma maneira. A suspensão bacteriana padronizada foi inoculada em todos os poços e a microplaca foi incubada em estufa de 35 °C por 24 h. Após a incubação, o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) foi calculado a partir da seguinte fórmula: $\text{ICIF} = \text{CIF}(\text{BS}) + \text{CIF}(\text{composto natural})$ onde, $\text{CIF}(\text{BS}) = \text{CIM}(\text{BS})$ na combinação / $\text{CIM}(\text{BS})$ sozinho $\text{CIF}(\text{composto natural}) = \text{CIM}(\text{composto natural})$ na combinação / $\text{CIM}(\text{composto natural})$ sozinho Os resultados foram interpretados como efeito sinérgico ($\text{ICIF} < 0.5$); aditivo $0.5 \leq \text{ICIF} \leq 1$; indiferente ($>1 > 4$).

Resultados e Discussão

Foi determinada a CIM e CBM das substâncias naturais, BS contra as bactérias *S. Typhimurium*, *E. coli* e *S. aureus*. A CIM e a CBM dos compostos naturais foi 312 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1), o que evidencia que há atividade antimicrobiana moderada das substâncias naturais contra as bactérias pesquisadas. O BS apresentou CIM e CBM de 0,625 mg/mL contra *E. coli* e *S. Typhimurium* e 2,5 mg/mL contra *S. aureus*.

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos compostos naturais e químico contra as bactérias de interesse

Microrganismo	Composto	CIM	CBM
<i>E. coli</i>	Cinamaldeído	312 $\mu\text{g/mL}$	312 $\mu\text{g/mL}$
	Carvacrol	312 $\mu\text{g/mL}$	312 $\mu\text{g/mL}$
	Benzoato de sódio	0,625 mg/mL	0,625 mg/mL
<i>S. Typhimurium</i>	Cinamaldeído	312 $\mu\text{g/mL}$	312 $\mu\text{g/mL}$
	Carvacrol	312 $\mu\text{g/mL}$	312 $\mu\text{g/mL}$
	Benzoato de sódio	0,625 mg/mL	0,625 mg/mL
<i>S. aureus</i>	Cinamaldeído	312 $\mu\text{g/mL}$	312 $\mu\text{g/mL}$
	Carvacrol	312 $\mu\text{g/mL}$	312 $\mu\text{g/mL}$
	Benzoato de sódio	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL

Os ensaios para a avaliação do potencial sinérgico (Tabela 2) demonstraram que o BS atuou sinergicamente com carvacrol e cinamaldeído contra *S. aureus* e de forma aditiva contra *E. coli* e *S. Typhimurium*.

Tabela 2 – Potencial sinérgico entre benzoato de sódio e substâncias naturais

	Carvacrol + BS	ICIF	Cinamaldeído +BS	ICIF
<i>E. coli</i>	Aditivo	0,5	Aditivo	0,5

S.	Aditivo	0,9	Aditivo	0,7
Typhimurium				
S. aureus	Sinergismo	0,2	Sinergismo	0,1

Conclusões

Foi possível observar que o BS atuou sinergicamente quando associado ao carvacrol e cinamaldeído contra *S. aureus*, além do potencial aditivo contra *E. coli*, *S. Typhimurium*. 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 a orientadora Profa. Dra. 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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil**. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial. Ministério da Saúde: Brasília, 2022.

BRUNA, G. O. Linke; THAIS, A. C. Casagrande; LÍGIA, A. C. Cardoso. Food additives and their health effects: a review on preservative sodium benzoate. **African Journal of Biotechnology**, [S.L.], v. 17, n. 10, p. 306-310, 2018. Academic Journals.

CHEN, X.; ZHANG, X.; MENG, R.; ZHAO, Z.; LIU, Z.; ZHAO, X.; SHI, C.; GUO, N. Efficacy of a combination of nisin and p-Anisaldehyde against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, 66, 100-106, 2016

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.

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