

Área: CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

ACÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL FRENTE A CEPAS DE *Salmonella* Enteritidis

Suelen Priscila Santos*, Caroline Dos Santos Peixoto, Bruna Webber, Maisa Cristina Beninca, Bruno Mendonça, Laura Beatriz Rodrigues

*Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo,
Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS*

**E-mail: suelenp_@hotmail.com*

RESUMO – O Brasil dispõe importante papel na produção e exportação de carne de frango. No entanto, a bactéria *Salmonella* spp. pode estar em todo o sistema de produção avícola, constituindo um problema de saúde pública e prejuízos econômicos. *Salmonella* spp. é um dos principais patógenos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), sendo a *Salmonella* Enteritidis (SE) o principal sorovar em humanos. A procura de novos compostos antimicrobianos a partir de espécies vegetais, como os óleos essenciais, tem se mostrado bastante expressivo nos últimos anos, visando colaborar com a solução do problema de resistência a antimicrobianos. O uso de óleos essenciais tem potencial para o controle de agentes bacterianos patogênicos. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre SE oriundas de surtos de DTA e de origem avícola não relacionadas a surtos. A análise da atividade antibacteriana de óleos essenciais de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), canela (*Cinnamomum cassia*), cravo (*Eugenia caryophyllus*) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), foi verificada frente a 05 isolados de SE. Os efeitos antibacterianos foram testados pela técnica de agar difusão e a ação antimicrobiana foi verificada pela formação do halo de inibição (mm). Diante do estudo, o óleo essencial que melhor demonstrou eficiência foi o de canela, com maior halo de inibição em todas as bactérias confrontadas, seguido dos óleos essenciais de cravo e tomilho. O óleo essencial de gengibre não apresentou halo de inibição. Estudos futuros necessitam serem realizados, para melhor verificar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis; óleo essenciais; Doença Transmitida por Alimentos; Resistência.

1 INTRODUÇÃO

A produção de alimentos no mundo, em especial no Brasil, segue rígidos protocolos sanitários. O Codex Alimentarius é um órgão que estabelece padrões reconhecidos internacionalmente, com códigos de conduta, orientações e outras recomendações relativas a alimentos, produção de alimentos e segurança alimentar em toda cadeia produtiva. Toda produção brasileira é acompanhada por um completo e detalhado programa de autocontrole do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Os produtos avícolas brasileiros são exportados

para 5 continentes, com diversidade no mercado consumidor, sendo que os produtos devem atingir as certificações sanitárias exigidas para este comércio.

A segurança dos alimentos na produção animal caracteriza-se pela preocupação com os perigos que podem estar associados com os produtos de origem animal que fazem parte da dieta humana, sendo assim qualquer possível risco de origem física, química ou biológica que possa causar algum dano ao ser humano é inaceitável (GODOY et al., 2016).

Salmonella Enteritidis (SE) é um dos sorovares de maior atribuição a surtos de salmonelose. A SE é o principal sorovar isolado em humanos e alimentos e um dos principais isolados em animais, rações e amostras ambientais (WHO, 2012). Constitui uma grande responsabilidade em saúde pública e representa um custo significativo em muitos países. Milhões de casos em seres humanos são mundialmente relatados todos os anos, e a doença resulta em casos de infecções alimentares consideradas leves, médias e de alto grau de severidade, em alguns casos podem acarretar a morte (WHO, 2016).

A procura de novos compostos antimicrobianos a partir de espécies vegetais, como o uso de óleos essenciais, tem se mostrado bastante expressivo nos últimos anos, visando solucionar os problemas da resistência antimicrobiana. Os OEs podem ser usados como aditivos nos alimentos, contudo são necessários maiores estudos para avaliar a ação dos óleos frente as condições intrínsecas de cada alimento, já que a eficácia antimicrobiana pode sofrer ação da composição dos alimentos. Cabe destacar, também, que os OEs não devem alterar as características sensoriais do produto, sendo o uso de microencapsulação uma hipótese a ser avaliada. A ação antimicrobiana dos OEs está ligada à sua hidrofobicidade, que permite a associação aos lipídios da membrana celular e das mitocôndrias, tornando os óleos permeáveis e causando perdas do conteúdo das células (BURT, 2004; BAJPAI et al., 2008). Com esse efeito sobre a membrana celular da bactéria, os OEs muitas vezes são utilizados em sinergismo com outros compostos bactericidas.

A busca de melhorias para a segurança dos alimentos vem impulsionando a pesquisa para o desenvolvimento de métodos alternativos no controle microbiano, abrindo novas perspectivas para o uso de óleos essenciais. Aliado a este fato, tem-se a necessidade de reduzir o uso indiscriminado de antimicrobianos sintéticos, tanto na medicina humana como na área veterinária.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS DE *Salmonella* Enteritidis

Foram utilizadas, neste estudo, a cepa padrão SE ATCC 13076 e 04 amostras de SE provenientes da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (FAMV / UPF). Duas são oriundas de surtos, sendo uma isolada de fezes (coprocultura), denominada em nosso laboratório como SE 24 e a outra isolada de salada de maionese com batatas, identificada como SE 69, ambas gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo César Tondo da UFRGS. As outras duas amostras de SE são de origem avícola. Dessas, uma cepa é proveniente de cortes de aves destinados ao consumidor e não envolvidos em surtos, denominada de SE 84, e a outra oriunda de swabs de arrasto de aviários de frangos de corte, denominada de SE 106 (WEBBER, 2015; OLIVEIRA, 2016).

As amostras foram reativadas para verificar se estão puras, e realizada confirmação bioquímica e sorológica através da metodologia descrita pelo Bacteriological Analytical Manual (BAM, 2016).

2.2 SELEÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais foram adquiridos de fornecedores comerciais (Oshadii®) e selecionados por terem diferentes graus de ação antimicrobiana frente a bactérias patogênicas, como gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) (MAJOLO et al., 2014); canela (*Cinnamomum cassia*), cravo (*Eugenia caryophyllus*) (MITH et al., 2014) e tomilho (*Thymus vulgaris L.*) (CARVALHO et al., 2015). Todos os óleos foram previamente caracterizados por cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa (CG/MS).

2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os efeitos antibacterianos foram testados pela técnica de agar difusão, realizados conforme Balouiri et al. (2016). Foi preparada uma suspensão bacteriana em solução salina estéril (NaCl 0,85%) equivalente à escala 0,5 de MacFarland (1×10^6 UFC/mL). Um swab estéril foi embebido na suspensão bacteriana e semeado em cinco direções em placa com Agar Mueller Hinton (Kasvi®). Após 5 minutos, o agar foi puncionado asepticamente com um perfurador estéril, obtendo furos com um diâmetro de 6 a 8 mm. Um volume de 100 µL do óleo essencial foi inoculado no poço. As placas de agar foram incubadas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. A leitura foi realizada através da medida do diâmetro do halo de inibição, mensurada em milímetros (mm), tendo cloranfenicol, como controle positivo e óleo mineral estéril como negativo e *S. Enteritidis* (ATCC 13076) como organismos controle (SILVA, 2014). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*), canela (*Cinnamomum cassia*), cravo (*Eugenia caryophyllus*) e tomilho (*Thymus vulgaris L.*) contra as cinco *Salmonella Enteritidis* estão descritas na Tabela 1. Os resultados revelam que os óleos essenciais demonstram atividade antimicrobiana em variadas magnitudes, em relação aos halos formados. O óleo essencial difundiu-se no agar, inibindo o crescimento das estirpes.

Tabela 1. Valores médios de halos de Inibição (mm) formados pela ação dos OES canela (*Cinnamomum cassia*), cravo (*Eugenia caryophyllus*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*).

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS*					
Óleos Essenciais	SE ATCC 13076	SE 24	SE 69	SE 84	SE 106
Canela	30 mm	25 mm	26 mm	26 mm	30 mm
Cravo	13 mm	15 mm	13 mm	15 mm	15 mm
Tomilho	15 mm	25 mm	-	13 mm	16 mm
Gengibre	-	-	-	-	-
Antibiótico	25 mm	26 mm	24 mm	26 mm	25 mm

A cepa SE ATTCC 13076 apresentou maior halo de inibição frente ao óleo de canela seguido do óleo de tomilho e cravo, comportamento semelhante com a SE 106. Quando avaliado a SE 24 o óleo essencial que apresentou melhor ação antimicrobiana em relação ao tamanho do halo foram os óleos de canela e tomilho e o com menor halo foi o óleo de cravo. Para a SE 69 permanece sendo o óleo de canela o mais eficiente, referente ao tamanho do halo para controle deste microrganismo, seguido do óleo de cravo. Os óleos de tomilho e gengibre não demonstraram nenhuma ação de controle. A bactéria SE 84 foi a que melhor apresentou halo de inibição para o óleo essencial de canela, seguido do óleo de cravo e tomilho.

O óleo essencial que demonstrou comportamento mais favorável em relação ao tamanho de halo foi o óleo essencial de canela, formando halo maior que o controle positivo (antibiótico). O óleo de Gengibre não demonstrou efeito algum frente a nenhum dos isolados.

Em estudo de Naveed, et al. (2013) o óleo essencial de canela apresentou melhor atividade contra todas as cepas bacterianas frente ao ensaio de concentração inibitória mínima, especialmente com concentração de 2,9 mg / ml contra *S. Typhi* e *P. fluorescens*. Outros estudos demonstraram que o óleo essencial de *C. cassia* foi eficaz na inibição do crescimento de vários isolados de bactérias, incluindo Gram-positivo e Gram-negativo, entre essas a *Salmonella*, e fungos, incluindo leveduras, principalmente devido ao seu componente, o cinamaldeído (OOI et al., 2006).

Santos (2011) avaliou a atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais e verificou que o óleo de cravo apresentou atividade frente *Salmonella Cholerasuis* com halo de 8.7 ± 0.33 . No presente trabalho os resultados demonstraram que o halo formado pelo óleo de cravo frente a *Salmonella Enteritidis* foi superior em todas as SE testadas. Entretanto, é necessário considerar as variações de suscetibilidade entre os sorovares (SANTUARIO, 2007). Para confirmação desses resultados pode-se dar continuidade ao estudo para avaliar a concentração inibitória mínima.

Estudos anteriores relatam a eficácia do tomilho na inibição de uma gama de bactérias patogênicas (KOHYAMA et al., 2015). Do mesmo modo o uso do óleo essencial de gengibre tem demonstrado eficiência na atividade antimicrobiana frente a diversos patógenos alimentares, incluindo atividade contra diferentes sorovares de *Salmonella* (AHMED, 2012). Dado esse, que difere do atual estudo onde o gengibre não formou halo de inibição para nenhuma cepa. Acredita-se que esse fator está relacionado a concentração utilizado do óleo ou a necessidade do estudo da concentração mínima inibitória.

Contudo, diversos estudos estão sendo realizados para comprovar a atividade dos óleos essenciais como alternativa para a indústria de alimentos, especialmente pela capacidade antimicrobiana e sua ação frente a inúmeros microrganismos patogênicos e deteriorantes. Para se aproveitar ao máximo o efeito benéfico dos óleos, é necessário preservar de forma eficiente seus compostos voláteis e facilitar seu manuseio. Sendo assim, busca-se desenvolver tecnologias que preserve a composição química dos óleos essenciais e ainda amenize os efeitos deletérios (FIGUEIREDO, 2017). Uma alternativa é a microencapsulação dos óleos e seu posterior uso em substituição aos antimicrobianos utilizados nas formulações alimentícias, para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis ou utilizar a atividade antioxidante na preservação dos alimentos.

4 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum cassia*), cravo (*Eugenia caryophyllus*) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) demonstraram atividade antimicrobiana em função da formação do halo de inibição contra *Salmonella* Enteritidis, constituindo uma alternativa promissora de uso para o controle de SE.

5 REFERÊNCIAS

AHMED, S.A.; JABBAR, I.I.; ABDUL, H.E. Study the antibacterial activity of Zingiber officinale roots against some of pathogenic bacteria. *Al-Mustansiriya Journal Science*. v.23, n.3, , p.63-70. 2012.

BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; KANG, S. C. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of Nandina domestica Thunb to control food-borne pathogenic and spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, v.125, p.117-122, 2008.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; KORAICHIIBNSOUDA, S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. v.6, p.71–79. 2016.

BAM - Bacteriological Analytical Manual. *Salmonella*. 2016.

BURT, S.A. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.* v.94, p.223-253, 2004.

CARVALHO, R.J. *et al.* Comparative inhibitory effects of Thymus vulgaris L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiology*, v.52, n.59-65. 2015.

FIGUEIREDO, A. N. Atividade Anti-Salmonella e Antioxidante De Uma Blenda De Óleos Essenciais Para Uso Em Dietas De Frangos De Corte. [Tese de Doutorado] – UNICAMP. 2017.

GODOY P.; BARROS, E.; PAULA, G.; BORDIN, C.; COTRIN, G.; ESMI, C. Produção de proteína animal e a segurança alimentar. **E-book no 4**. Campinas, São Paulo: Mundo Agro Editora LTDA, 2016.

KOHIYAMA, C.Y., RIBEIRO, M.M.Y., MOSSINI, S.A.G., BANDO, E., BOMFIM, N.S., NERILO, S.B., ROCHA, G.H.O., GRESPLAN, R., MIKCHA, J.M.G., MACHINSKI, M.. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of Thymus vulgaris L. by Aspergillus flavus Link. *Food Chem.* V.173, p.1006-1010. 2015.

MAJOLO, C. *et al.* Antimicrobial activity of essential oil from Curcuma longa and Zingiber officinale rhizomes against enteric *Salmonella* isolated from chicken. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v.16, n.3, p.505-512. 2014.

NAVEED, et al. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against Salmonella and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complement Altern Med*. Oct 14;13:265, 2013.

OLIVEIRA, A. P. Dinâmica de formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis de surtos de doenças transmitidas por alimentos. [Dissertação] Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS, 2016.

OOI, L.S.M.; YAOLAN, L.I.; S.L. KAM.; H. WANG.; E.Y.L. WONG.; V.E.C. OOI. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb Cinnamomum cassia Blume. *Am J Chin Med.*, v.34, n.3, p.511–522. 2006.

SANTOS, J. C. FILHO, C. D. C; BARROS, T. F., GUIMARÃES, A. G. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole.

Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1557-1564, out./dez. 2011.

SANTURIO et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a SILVA, C.F. Padrão de Resistência a antimicrobianos e genes de virulência em *Salmonella* enteritidis formadoras de biofilme. [Dissertação], Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/ RS, 2014.

sorovares de *Salmonella* enterica de origem avícola. *Ciência Rural*, v.37, n.3, mai-jun, 2007.

WEBBER, Bruna. Dinâmica de formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis sob diferentes temperaturas e o efeito de tratamentos de remoção. [Dissertação] Universidade de Passo Fundo, RS 2015.

WHO - World Health Organization. **Salmonella**. 2016.

WHO - World Health Organization. Top 15 lists from a Country, **parameters**. 2012.