

# AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DE DIFERENTES ANTIMICROBIANOS NATURAIS CONTRA MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS DE ALIMENTOS

Caroline Heckler (UFRGS) – caroline.heckler@ufrgs.br

Patrícia da Silva Malheiros (UFRGS) – patricia.malheiros@ufrgs.br

## INTRODUÇÃO

- A crescente demanda dos consumidores por alimentos inócuos, preparados sem a adição de conservantes químicos e com longa vida útil impulsiona a indústria alimentícia e as instituições de pesquisas para a busca de novas tecnologias de conservação.
- Bacteriocinas bem como antimicrobianos presentes em óleos essenciais de plantas são conhecidos por demonstrarem capacidade para inibir ou controlar a multiplicação de micro-organismos em alimentos (Cotter et al., 2005; Szczepanski e Lipski, 2015).
- Entretanto, o efeito sinérgico entre diferentes nisina e compostos fenólicos tem sido pouco explorado.

## OBJETIVO

- Determinar o efeito sinérgico de nisina, timol e carvacrol contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis.

## METODOLOGIA

- Primeiramente foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do método de microdiluição em caldo usando placas de Elisa de 96 poços (CLSI 2002) para os óleos timol, carvacrol e eugenol bem como para a nisina.
- Em seguida, foi determinada a Concentração Bactericida Mínima inoculando-se 20  $\mu$ L (Miles e Misra, 1938) de cada diluição em placas contendo ágar BHI, as quais foram incubadas a 37 °C.
- A partir dos resultados obtidos com o CIM de cada um dos compostos, o efeito sinérgico foi determinado para *Salmonella* Enteritidis SE86 e *Staphylococcus aureus*. Para *S. Enteritidis* SE86 fez-se planejamento fatorial 2<sup>2</sup> (timol e carvacrol), com três repetições no porto central. Para *S. aureus* fez-se planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (timol, carvacrol e nisina), com três repetições no ponto central. Foram testadas diversas concentrações dos antimicrobianos visando a inativação dos micro-organismos teste.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

- O carvacrol e timol apresentaram excelente potencial antimicrobiano inibindo diversos tipos de bactérias patogênicas de alimentos. Para o carvacrol, a CIM variou de 1,32 a 2,15 mg/mL enquanto que a CBM variou de 1,32 a 3,31 mg/mL. Para o timol a CIM variou de 1,65 a 3,31 mg/mL e a CBM variou de 2,65 a 5,30 mg/mL
- A tabela 1 mostra que a combinação de carvacrol e timol visando a inibição de *S. Enteritidis* SE86 não resultou em efeito sinérgico, pois concentrações reduzidas de cada composto (ensaios E,F,G) mantiveram a mesma população do patógeno em relação ao antimicrobiano não combinado (ensaios A,B). Para ter-se um aumento na inibição do patógeno foi necessário combinar uma concentração mais elevada de cada óleo (ensaio D), sendo que a inativação completa foi atingida combinando 200  $\mu$ g/mL de carvacrol com 200  $\mu$ g/mL timol.
- A tabela 2 mostra que a combinação de carvacrol, timol e nisina, visando à inibição de *S. aureus*, também não resultou em efeito sinérgico. O melhor resultado obtido foi utilizando a seguinte combinação: 150  $\mu$ g/mL de timol, 200  $\mu$ g/mL de carvacrol e 30  $\mu$ g/mL de nisina.

Tabela 1: Efeito sinérgico de carvacrol e timol realizados a partir de um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> visando à inibição de *Salmonella* Enteritidis SE86.

Ensaio	T	C	Contagem*	T	C	Contagem*	T	C	Contagem*
A	0	0	9,50 ± 0,07	0	0	9,25 ± 0,06	0	0	9,79 ± 0,07
B	50	0	9,40 ± 0,28	100	0	8,43 ± 0,24	200	0	5,51 ± 0,13
C	0	50	9,49 ± 0,23	0	100	8,69 ± 0,18	0	200	4,65 ± 0,92
D	50	50	7,83 ± 0,18	100	100	4,63 ± 0,16	200	200	0,00 ± 0,00
E	25	25	9,43 ± 0,04	50	50	8,60 ± 0,20	100	100	5,38 ± 0,14
F	25	25	9,05 ± 0,17	50	50	8,60 ± 0,01	100	100	5,47 ± 0,18
G	25	25	9,42 ± 0,18	50	50	8,47 ± 0,01	100	100	5,41 ± 0,01

\*log UFC/mL ± DV (desvio padrão) da contagem bacteriana realizada em duplicata em placas de ágar BHI

T: timol ( $\mu$ g/mL)  
C: carvacrol ( $\mu$ g/mL)

Tabela 2: Efeito sinérgico de carvacrol, timol e nisina realizados a partir de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> visando à inibição de *Staphylococcus aureus*.

Ensaio	T	C	N	Contagem*	T	C	N	Contagem*	T	C	N	Contagem*
A	0	0	0	9,13 ± 0,10	0	0	0	8,94 ± 0,05	0	0	0	9,37 ± 0,01
B	0	0	7,5	9,12 ± 0,08	0	0	15	9,09 ± 0,44	0	0	30	8,89 ± 0,16
C	37,5	0	0	9,31 ± 0,12	75	0	0	9,55 ± 0,61	150	0	0	9,03 ± 0,21
D	37,5	0	7,5	9,32 ± 0,03	75	0	15	9,48 ± 0,24	150	0	30	8,04 ± 0,19
E	0	50	0	9,43 ± 0,16	0	100	0	9,00 ± 0,00	0	200	0	8,70 ± 0,00
F	0	50	7,5	9,07 ± 0,46	0	100	15	8,72 ± 0,40	0	200	30	5,85 ± 0,21
G	37,5	50	0	9,50 ± 0,21	75	100	0	9,08 ± 0,00	150	200	0	5,96 ± 0,55
H	37,5	50	7,5	8,81 ± 0,17	75	100	15	5,64 ± 0,45	150	200	30	4,39 ± 0,01
I	18,75	25	3,75	8,84 ± 0,20	37,5	50	7,5	8,89 ± 0,27	75	100	15	8,34 ± 0,06
J	18,75	25	3,75	9,42 ± 0,26	37,5	50	7,5	8,05 ± 0,17	75	100	15	8,16 ± 0,23
K	18,75	25	3,75	9,29 ± 0,15	37,5	50	7,5	8,60 ± 0,49	75	100	15	8,01 ± 0,01

T: timol ( $\mu$ g/mL)  
C: carvacrol ( $\mu$ g/mL)  
N: nisina ( $\mu$ g/mL)  
\*log UFC/mL ± DV (desvio padrão) da contagem bacteriana realizada em duplicata

## CONCLUSÃO

- Timol e carvacrol não apresentaram efeito sinérgico na inibição de *Salmonella* Enteritidis SE86 assim como timol, carvacrol e nisina não apresentaram efeito sinérgico na inibição de *Staphylococcus aureus*. Portanto, a utilização dos compostos de forma isolada ou em combinação não alteraram a atividade antimicrobiana contra os patógenos avaliados.

## REFERÊNCIAS

- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. Document M27-A2, Pensilvânia. 51p.
- COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature*, London, v.3, p.777-788, 2005.
- MILES, A.A.L. e MISRA, S.S. The estimation of the bacterial power of the blood. *Journal of Hygiene*, v.38, p.732-749, 1938.
- SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control*, v.36, p.224-229, 2015.

Apoio: