

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE À *Escherichia coli* O157:H7

ADRIELE DE AZAMBUJA FAGUNDES¹; PÂMELA INCHAUSPE CORRÊA
ALVES², DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA², ISABELA SCHNEID KRONING²,
WLADIMIR PADILHA DA SILVA² E GRACIELA VOLZ LOPES³

¹Universidade Federal de Pelotas – adrieleazambuja97@gmail.com¹

²Universidade Federal de Pelotas – pam.inchauspe@hotmail.com², debora.rsilveira@hotmail.com,
isabelaschneid@gmail.com², wladimir.padilha2011@gmail.com²

³Universidade Federal de Pelotas – gracielavlopes@yahoo.com.br³

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli produtora de toxina de shiga (STEC), também conhecida como *E. coli* verotoxigênica (VTEC) ou enterohemorrágica (EHEC), causa doença entérica em humanos, variando de diarreia aquosa à diarreia com sangue, com uma fração de pacientes desenvolvendo síndrome hemolítica urêmica (SHU) (ZHANG et al., 2021). O sorotipo de STEC predominantemente associado a infecções em humanos e surtos é o sorotipo O157:H7, o qual também é associado aos casos potencialmente fatais da doença (ERCUMEN et al., 2017; ZEINHOM et al., 2018). A carne bovina tem sido frequentemente implicada em surtos de *E. coli* O157:H7 e os ruminantes são considerados reservatórios primários desse sorotipo (ZHANG et al., 2021).

Os óleos essenciais (OEs) são metabólitos secundários obtidos de plantas aromáticas, podendo ser extraídos de diferentes partes das plantas como cascas, flores, frutos, folhas, raízes e caules (PATEIRO et al., 2021). Estes apresentam em sua composição uma mistura complexa de compostos voláteis que possuem ação fitoterápica, antiviral, antisséptica, antifúngica e antibacteriana (LANG & BUCHBAUER, 2012; OLIVEIRA et al., 2009).

Existem muitos OEs com propriedades antimicrobianas, mas nem todos têm a mesma atividade. Os óleos de orégano, canela, cravo e coentro estão entre os mais estudados e entre os mais eficazes (PATEIRO et al., 2021). As tendências atuais para produtos sem conservantes sintéticos levam à busca de novas fontes de compostos antimicrobianos e à necessidade de avaliar sua atividade frente à diferentes patógenos de origem alimentar.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de tomilho (*Thimus vulgaris*, L.), cúrcuma (*Curcuma longa*), alecrim (*Salvia rosmarinus*) e sálvia (*Salvia officinalis*) frente à *E. coli* O157:H7.

2. METODOLOGIA

2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de tomilho (*Thimus vulgaris*, L.), cúrcuma (*Curcuma longa*), alecrim (*Salvia rosmarinus*) e sálvia (*Salvia officinalis*) foram obtidos comercialmente da empresa Ferquima® Indústria e Comércio de Óleos Essenciais.

2.2. Microrganismo

Um isolado de *Escherichia coli* O157:H7 previamente identificado em fezes de bovinos durante a oclusão do reto no momento do abate, em abatedouro-frigorífico de Pelotas-RS, foi selecionado para o teste. O isolado pertence a coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas.

2.3 Disco-difusão em ágar

O potencial antimicrobiano dos OEs foi avaliado através da técnica de disco-difusão em ágar (CLSI, 2018). Para a realização do teste, o inóculo bacteriano foi preparado na concentração celular de $\sim 1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, equivalente a 0,5 na escala de McFarland. Uma alíquota da suspensão celular foi inoculada na superfície do ágar Mueller-Hinton (MH, Kasvi®) com o auxílio de *swab* esterilizado. Posteriormente, um disco de papel filtro esterilizado com 6 mm de diâmetro foi adicionado à superfície do ágar, no qual foram aplicados 10 µL do OE. Foi preparada uma placa para cada óleo testado. Como controle negativo foi utilizado 10 µL de água destilada esterilizada. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após a incubação, a existência de halos de inibição ao redor dos discos foi verificada. Esses halos foram medidos e expressos em milímetros (mm).

2.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM foi determinada através do teste de microdiluição em caldo em placas de poliestireno, de acordo com o protocolo proposto pelo Manual do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Foi utilizado o caldo Mueller-Hinton (MH, Acumedia®) acrescido de 1% do emulsificante Tween 80 (Sigma®). Foram preparadas diluições decimais do OE no caldo variando de 288 mg.mL⁻¹ a 1,69 mg.mL⁻¹. O isolado bacteriano foi preparado na concentração celular de $\sim 1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, equivalente a 0,5 na escala de McFarland. Como controle negativo foi utilizado apenas o caldo MH e para o controle positivo o caldo MH acrescido do inóculo. Foi feito ainda um controle de esterilidade do OE. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 18-24 h. Após o período de incubação adicionou-se 10 µL do corante revelador resazurina (Êxodo®) em todas as cavidades da placa e, posteriormente, incubadas a 37 °C por 2 h. A formação da coloração rosa indicou possível atividade bacteriana, possibilitado determinar a CIM. Para determinação da CBM, uma alçada de cada cavidade da placa que demonstrou inibição do crescimento bacteriano foi semeada em placa contendo ágar *Brain Heart Infusion* (BHI, Kasvi®). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação foi verificado em quais concentrações o OE teve ação bactericida, indicado pela ausência de crescimento bacteriano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Disco-difusão em ágar

No teste de disco-difusão em ágar foi possível observar que o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*, L.) apresentou halo de inibição de 24,67 mm. O OE de sálvia (*Salvia officinalis*) apresentou halo de inibição de 8,33 mm, enquanto que

não foram observados halos para os OEs de cúrcuma (*Curcuma longa*) e alecrim (*Salvia rosmarinus*) (Tabela 1). O resultado demonstra que o OE de tomilho (*Thymus vulgaris*, L.) possui atividade antimicrobiana frente a bactéria *Escherichia coli* O157:H7.

A ação inibitória pode ser classificada como: 1) forte atividade bacteriana, quando a zona de inibição for igual ou superior a 20 mm; 2) atividade moderada, quando a zona de inibição for entre 12-20 mm; 3) nenhuma atividade inibitória, quando a zona de inibição for menor que 12 mm (ROTA et al., 2008). No estudo de Rota et al. (2008) o halo de inibição do OE de tomilho (*Thymus vulgaris*) frente a *E. coli* O157:H7 foi de 19,6 mm, sendo considerada moderada. No presente estudo, a atividade antibacteriana do óleo essencial de tomilho foi considerada forte, enquanto que os outros óleos testados que não tiveram atividade antibacteriana.

Tabela 1: Teste de disco-difusão em ágar de óleos essenciais frente à *Escherichia coli* O157:H7.

Óleo Essencial	Halo de inibição (mm)
Alecrim (<i>Salvia rosmarinus</i>)	0
Cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>)	0
Sálvia (<i>Salvia officinalis</i>)	8,33
Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i> , L.)	24,67

Fonte: O autor, 2023.

3.2 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Como o OE de tomilho apresentou maior halo de inibição, a CIM e a CBM desse OE foram determinadas. Dentre as concentrações testadas para o OE de tomilho, a menor concentração do OE capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli* O157:H7 foi de 27,8 mg.mL⁻¹ (3,125%), sendo essa a CIM e a CBM do OE de tomilho. Rota et al. (2008) verificaram que o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) apresentou ação antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7 (CECT 4267), apresentando CIM e CBM de 0,5 mg.mL⁻¹. O OE de tomilho (*Thymus vulgaris*) demonstrou CIM de 2,09 mg.mL⁻¹ e CBM de 2,26 mg.mL⁻¹ frente a *E. coli* isoladas de bovinos (SANTURIO et al., 2011).

Tabela 2: Microdiluição em caldo do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) frente à *Escherichia coli* O157:H7.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)		Multiplicação de <i>E. coli</i> O157:H7
mg.mL ⁻¹	%	
288,0	25,0	ausente
123,4	12,5	ausente
57,6	6,25	ausente
27,8	3,125	ausente
13,7	1,562	presente
6,8	0,781	presente
3,3	0,390	presente
1,7	0,195	presente

Fonte: O autor, 2023.

4. CONCLUSÕES

O OE de tomilho (*Thymus vulgaris*, L.) demonstrou atividade antimicrobiana frente a bactéria *Escherichia coli* O157:H7, enquanto os OEs de alecrim, cúrcuma e sálvia não demonstraram ação. Estes resultados confirmam o potencial uso do óleo essencial de tomilho na indústria alimentícia para a conservação de alimentos contra patógenos de origem alimentar, porém mais estudos são necessários para avaliar o sinergismo ou antagonismo do óleo com a matriz alimentar, bem como, o custo-benefício do seu uso.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLSI. M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), v. 35, n. 1, 2015a.
- LANG, Gudrun; BUCHBAUER, Gerhard. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 1, p. 13-39, 2012.
- PATEIRO, M. et al. Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. **International journal of food microbiology**, v. 337, p. 108966, 2021.
- ROTA, M.C.; et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v. 19, p. 681-687, 2008.
- SANTURIO, J.; et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.
- ZHANG, Peipei.; et al. Genomic analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 from cattle and pork-production related environments. **npj Science of Food**, v. 5, n. 1, p. 15, 2021.
- ZEINHOM, M. M. A. et al. A portable smart-phone device for rapid and sensitive detection of *E. coli* O157:H7 in Yoghurt and Egg. **Biosensors & bioelectronics**, v. 99, p. 479–485, 2018.