



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BACTERICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE A CEPAS DE ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DE CARNE MOÍDA

DANIELA RODRIGUERO WOZEAK¹; ALINE SITOWSKI²; KAMILA FURTADO DA CUNHA²; MATHEUS HENRIQUE VARGAS², PRISCILA KRÜGER VOIGT²; GLADIS AVER RIBEIRO³

¹Universidade Federal de Pelotas – danielarwozeak@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – aline_sit@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – kamilafurtado1@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – matheushvargas@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – privoigt@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – gladisaver@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Carne bovina é definida como “produto cárneo obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos, seguido de imediato resfriamento ou congelamento” (BRASIL, 2003), é muito agradável ao paladar e utilizado em diversas preparações culinárias. São produtos muito sensíveis, podendo ser contaminados no momento do abate ou etapas posteriores. Após o processo de moagem, a carne possui maior área superficial exposta, e mesmo mantida sob refrigeração, micro-organismos deteriorantes ou mesmo patogênicos podem se desenvolver (JAY, 2005).

Doenças transmitidas por alimentos são causadas por patógenos que invadem o organismo através de alimentos contaminados (FORSYTHE, 2002). As infecções alimentares ocorrem após a ingestão de alimentos contaminados com “números significativos de espécies não hospedeiro-específicos” (JAY, 2005).

Na indústria e comércio o controle microbiológico se dá empregando boas práticas de fabricação e manipulação, dando grande atenção aos processos de assepsia das mãos dos manipuladores e degermação dos equipamentos. Segundo BORGES et. al. (2013) a ocorrência e resistência das bactérias a alguns agentes sanitizantes que são utilizados comumente vem aumentando. e com isso, a busca por produtos ditos naturais vem aumentando, pois estes são bem vistos pela sociedade e, em alguns casos, demonstram boa ação bactericida.

Neste contexto os óleos essenciais se destacam, eles são caracterizados por serem um complexo de constituintes químicos naturais e voláteis, com um forte odor e são provenientes do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Os óleos essenciais e seus componentes são amplamente utilizados em diversos produtos como perfumes, produtos sanitários, odontológicos, aditivos de alimentos e remédios naturais (BAKKALI et. al., 2008). Estudos sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem comprovado suas ações sanitizante, desinfetantes e conservante (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2013).

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo verificar a atividade bactericida/bacteriostática dos óleos essenciais de Eucalipto Citriodora, Tangerina Cravo, Manjerona e Basilicão, frente a cepas *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Isoladas de carne moída comercializada na cidade de Pelotas – RS.



2. METODOLOGIA

As análises foram feitas no Laboratório de Bacteriologia, situado no Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia, Campus Capão do Leão, na Universidade Federal de Pelotas.

Para obtenção dos isolados de alimentos foi utilizado o método descrito por NEUSELY (1997). Para análise de *Salmonella* spp, primeiramente foi feito o pré-enriquecimento da amostra com Caldo Lactosado seguido pelo enriquecimento em Caldo Tetrionato e Caldo Vassiliads. Após foi feito plaqueamento em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato e Ágar Enteric Hektoen e em seguida foram feitos os testes bioquímicos e teste sorológico, para confirmação de gênero. Para análise de coliformes termotolerantes, foi utilizado o método do Número Mais Provável (NMP) e a partir das colônias suspeitas foram feitos testes bioquímicos (IMViC) onde as colônias consideradas positivas foram submetidas a testes sorológicos com o objetivo de confirmação de *Escherichia coli* entero-hemorrágica.

Os testes de difusão em disco com óleos essenciais foram feitos segundo a metodologia de KIRBY e BAUER (1966) com modificações, onde foram adicionados 10 µL dos óleos essenciais de *Citrus reticulata* v. *tangerine* (Tangerina Cravo), *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto Citriodora) e *Ocinum basilicum* (Basilicão), sobre discos de papel filtro estéreis, com cerca de 5 mm de diâmetro, colocados sobre Ágar Müller-Hinton já semeados com inóculo de acordo com a Escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC. mL⁻¹). Para controle negativo, foram utilizados discos estéreis de papel filtro contendo 10 µL de água destilada estéril, e para controle positivo foram utilizados discos do antibiótico Tetraciclina e então as placas foram incubadas a 36°C por 24h. Após esse período, foi observada a presença de halo ao redor dos discos embebidos com os óleos essenciais.

A verificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais foi realizada segundo o NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015), onde é preparado o inóculo bacteriano de acordo com a Escala 0,5 de MacFarland, onde 50 µL foi adicionado em uma placa de microdiluição com 96 poços, que já continha 50 µL Caldo Müller Hinton com 1% de Tween 80. Em seguida foi adicionado diferentes concentrações do óleo essencial (de 25% a 0,19%), e a placa foi incubada a 36°C por 24h. Após o período de incubação adicionou-se Cloreto de Fenil Tetrazólio 0,5% para observar a presença ou não de atividade microbiana através da mudança de coloração do meio, caso meio adquira coloração vermelha, indica crescimento bacteriano naquela concentração. Para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), foram utilizados os resultados da CIM, onde foi coletado 5 µL dos poços que apresentaram inibição do crescimento e inoculado em placa contendo Ágar Müller Hinton, incubado a 36°C por 24h, onde após esse período foi verificado se houve crescimento bacteriano. As concentrações que apresentaram crescimento na placa foram consideradas bacteriostáticas e, as concentrações que não apresentaram crescimento foram consideradas bactericidas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das 20 amostras de carne moída foi possível obter 7 isolados bacterianos, sendo seis deles *Escherichia coli* (dois pertencentes ao grupo sorológico O157:H7, dois ao grupo sorológico Polivalente B e dois ao grupo sorológico Polivalente C) e um positivo para *Salmonella* spp. A presença de coliformes termotolerantes em alimentos indica contaminação de origem fecal



uma vez que a *E. coli* não faz parte da microbiota normal de produtos frescos, indicando portanto, que há condições higiênicas inadequadas (GUIMARÃES et al, 2003).

Conforme a legislação brasileira RDC nº12 de 2001, a presença de *Salmonella* spp. torna o alimento impróprio para consumo, pois a grande maioria dos sorotipos são patogênicos para o homem (TORTORA et al, 2005)

Os testes de difusão em disco com os óleos essenciais indicaram atividade biológica de dois dos óleos utilizados, *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto Citriodora) e *Ocinum basilicum* (Basilicão), porém o óleo de *Citrus reticulata* v. *tangerine* (Tangerina Cravo) não apresentou atividade biológica sobre nenhum dos isolados bacterianos testados.

Os resultados da MIC e CBM estão demonstrados nas tabelas abaixo.

Tabela 1: MIC e CBM do óleo essencial *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto Citriodora) frente aos isolados bacterianos

	25%	12,5%	6,25%	3,125%	1,562%	0,78%	0,39%	0,19%
<i>E. coli</i> 1	+	+	+	N	N	N	N	N
<i>E. coli</i> 2	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i> 3	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 4	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> 5	+	+	-	-	N	N	N	N
<i>E. coli</i> 6	+	-	-	-	-	N	N	N
<i>Salmonella</i> spp. 1	+	+	-	-	-	-	-	-

N: Ausência de Atividade Biológica; +: Atividade bactericida; -: Atividade bacteriostática.

Tabela 2: MIC e CBM do óleo essencial *Ocinum basilicum* (Basilicão) frente aos isolados bacterianos

	25%	12,5%	6,25%	3,125%	1,562%	0,78%	0,39%	0,19%
<i>E. coli</i> 1	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 2	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i> 3	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 4	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 5	-	-	-	-	-	N	N	N
<i>E. coli</i> 6	+	+	+	+	-	N	N	N
<i>Salmonella</i> spp. 1	+	+	+	+	-	-	-	N

N: Ausência de Atividade Biológica; +: Atividade bactericida; -: Atividade bacteriostática.

4. CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos nos testes, podemos concluir que os óleos essenciais *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto Citriodora) e *Ocinum basilicum* (Basilicão) apresentaram atividade biológica frente aos isolados de enterobactérias estudadas, nas condições testadas. Produtos naturais devem continuar sendo investigados, a fim de diminuir a utilização de produtos químicos sintéticos em produtos degermantes, antissépticos e até mesmo na indústria farmacêutica. Vale ressaltar que mais testes devem ser feitos, para que a eficácia desses óleos seja comprovada.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKKALI, F. et al. Biological Effects of Essential Oils: A Review. **Food Chemistry Toxicology**, Philadelphia, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BAUER, A.W.M.M.; KIRBY, J.C.; TURCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.3, p. 493-496, 1966.

BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA M.J.; SIMÕES, M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RDC nº12 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm> Acesso em: 20 set. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=4317>> Acesso em: 08 out. 2017.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Tradução Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt. Porto Alegre. Artmed, 2002.

GUIMARÃES, A. M. *et al.* Frequência de Enteroparasitas em Amostras de Alface (*Lactuca sativa*) Comercializadas em Lavras, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.5, p. 621-623, Lavras, 2003.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Tradução Eduardo Cesar Tondo et al. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard M7-A10, 2015.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Essential Oils of Thyme and Rosemary in the Control of *Listeria Monocytogenes* in Raw Beef. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, p. 1181-1188, 2013.

TORTORA G. J., FUNKE B. R., CASE C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre. Artmed, 2005.