



XIMICTI

Campus São Bento do Sul

Mostra Nacional de Inovação
Científica e Tecnológica Interdisciplinar

IV IFCULTURN

ATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA *Escherichia coli* E *Salmonella* TYPHIMURIUM

ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST *ESCHERICHIA COLI* AND *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Autores: Thais Carla Dal BELLO¹, Juliana Olivia NICOLAO², Daniel RADIN³, Julia ZANFERRARI⁴, Franciana Aparecida Volpato BELLAVER⁵, Marcella Zampoli TRONCARELLI⁶, Anildo CUNHA JUNIOR⁷ Alessandra Farias MILLEZI⁸.

Identificação autores: ¹Bolsista Extensão Tecnológica IFC – Campus Concórdia ²Bolsista Pesquisa IFC – Campus Concórdia, ³Bolsista BEG Extensão IFC – Campus Concórdia, ⁴Graduanda em Agronomia IFC – Campus Concórdia, ⁵Mestranda em Produção e Sanidade Animal, ⁶Co-orientadora IFC – Campus Concórdia ⁷Embrapa Suínos e Aves – Concórdia, ⁸Orientadora IFC – Campus Concórdia.

RESUMO

Este trabalho possui a finalidade de avaliar o efeito dos óleos de *Syzygium aromaticum* (cravo), *Laurus nobilis* (louro) e *Cymbopogon winterianus* (citronela) contra as cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. As bactérias foram inoculadas em meio BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C/24h. Posteriormente, foi realizada a inoculação destas bactérias com solução a base de óleo essencial em microplaca de 96 poços que foi incubada em shaker orbital a 37°C/24h em agitação de 80 rpm. Após as 24h foi realizada diluição e plaqueamento para realização das análises de CFU e DO. Cada óleo apresentou um resultado distinto, porém todos foram significativos no controle destas cepas.

Palavras-chave: Óleos essenciais; antimicrobianos naturais; cepas bacterianas.

ABSTRACT

This work has the purpose of evaluating the effect of the oils of *Syzygium aromaticum* (clove), *Laurus nobilis* (laurel) and *Cymbopogon winterianus* (citronella) against the strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. The bacteria were inoculated in BHI medium (Brain Heart Infusion) and incubated in a bacteriological oven at 37°C / 24h. Subsequently, the inoculation of these bacteria with essential oil base solution in a 96-well microplate was incubated in an orbital shaker at 37°C / 24h in 80 rpm shaking. After 24h, dilution and plating were performed to perform the CFU and DO analyzes. Each oil presented a distinct result, but all were significant in the control of these strains.

Keywords: Essential oils; natural antimicrobials; bacterial strains.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A *Escherichia coli* é um dos principais patógenos que está associado às doenças entéricas em suínos, além disso, é um enteropatógeno de grande importância por ter alta resistência aos agentes antimicrobianos (SILVA, C. V. O., *et al*, 2015). Já a *Salmonella*



Typhimurium é relevante na área da avicultura por ser responsável por diversas doenças que acometem as aves e, causa no homem uma doença conhecida como salmonelose (MENDONÇA, E. P., 2016). *E. coli* e *S. Typhimurium* possuem alta capacidade zoonótica, ou seja são capazes de infectar também o homem.

Para o controle do crescimento dos micro-organismos, uma das principais armas são os antimicrobianos (Bjarnsholt et al. 2013), mas as concentrações utilizadas para tal eficácia são muito altas e têm demonstrado serem ineficazes e levando assim ao aparecimento de cepas cada vez mais resistentes, apresentando também efeitos citotóxicos (Ribeiro et al., 2016). Tais fatos demonstram que a descoberta de novos antimicrobianos mais naturais e sustentáveis, são necessários para controlar as doenças

Diante da relevância em controlar as bactérias mencionadas, busca-se a possibilidade de utilizar antimicrobianos naturais que sejam eficazes contra estas células bacterianas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Laurus nobilis* e *Cymbopogon winterianus*, que são conhecidos popularmente como cravo, louro e citronela, respectivamente contra *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*.

METODOLOGIA

As cepas de *E. coli* foram isoladas de suínos com diarreia; *S. Typhimurium* foi cedida pelo Centro de Diagnóstico e Sanidade Animal – CEDISA de Concórdia (proveniente da FIOCRUZ, RJ). Os óleos de *Syzygium aromaticum* e *Cymbopogon winterianus* foram obtidos através da FERQUIMA – Indústria e Comércio de Óleos Essenciais de Vargem Grande – SP, o óleo de *Laurus nobilis* foi extraído por hidrodestilação.

A inoculação inicial destas bactérias foi feita em meio BHI (*Brain Heart Infusion*), incubando-as em estufa bacteriológica (Solab, Brasil) a temperatura de 37°C/24 horas. Posteriormente foi feita a inoculação destas bactérias com solução a base de óleo essencial em microplaca de 96 poços. Foram utilizadas três concentrações distintas para avaliar o efeito do óleo, sendo elas: 0,4%; 0,8% e 1,0% (o óleo foi diluído em álcool etílico PA 2,0% e água salina 0,85% esterilizada acrescida de 0,5% de tween 80 e meio de cultura TSB - Caldo Soja Tripticaseína). A microplaca foi incubada em shaker orbital (Solab, Brasil) em temperatura de 37°C/24 horas em agitação de 80 rpm (Millezi et al., 2016).



Após as 24 horas foi realizada diluição e plaqueamento para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e realizou-se a leitura da Densidade Óptica (DO) em espectrofotômetro Elisa (Biotek, Brasil) para ambos os micro-organismos. Para análise dos resultados aplicou-se o teste de ANOVA pelo método de Bonferroni: Compare Select Pairs of Columns, tendo 95% como nível de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Observa-se que os óleos essenciais de *S. aromaticum* e *L. nobilis* foram efetivos contra as células planctônicas (UFC) de *S. Typhimurium*, porém, observa-se também, que houve crescimento bacteriano ao realizar a análise de Densidade Óptica (DO), já com o tratamento utilizando o óleo de *C. winterianus* houve crescimento em ambas análises (Figura 1).

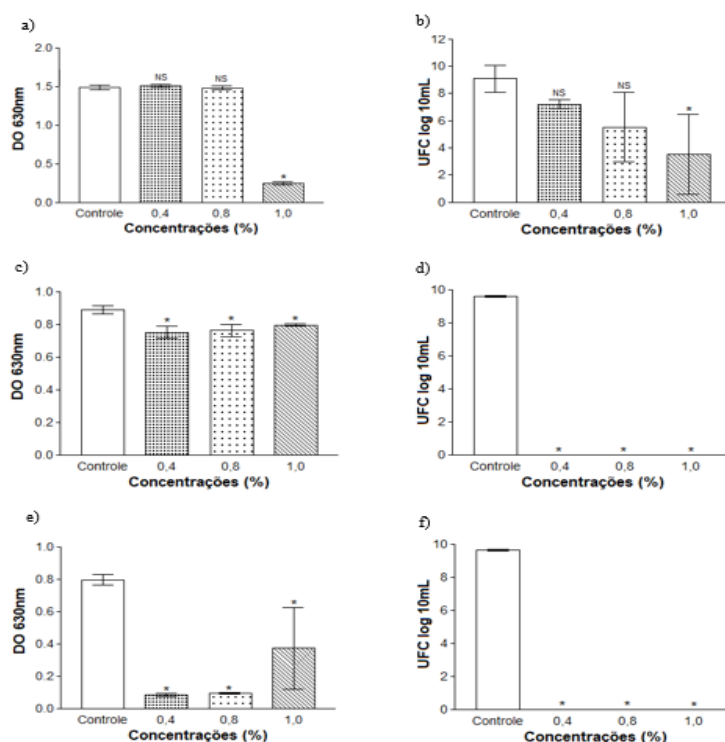


Figura 1. Sensibilidade de *Salmonella Typhimurium* aos tratamentos com óleo essenciais. a) *Cymbopogon winterianus* análise de DO; b) *Cymbopogon winterianus* análise de UFC; c) *Syzygium aromaticum* análise de DO; d) *Syzygium aromaticum* análise de UFC; e) *Laurus nobilis* análise de DO; f) *Laurus nobilis* análise de UFC. * indica $p < 0,05$ para o teste de ANOVA, ^{ns} indica que não houve diferença estatisticamente significativa.

O resultado obtido para os óleos de cravo e louro ao se comparar as análises de UFC



e DO contra *S. Typhimurium* podem ser em decorrência de dois fatores: reações entre óleo e bactéria e devido ao fato de que as bactérias se reproduziram por um determinado tempo, mas o efeito do óleo não foi de imediato. Contudo, ao longo das 24h as bactérias pararam de se reproduzir e por isso não houve formação de colônias bacterianas nas placas (Figura 1, letras D e F).

Já o óleo de citronela foi significativo para ambas as análises, porém, apenas na concentração de 1%, ou seja, é eficaz quando utilizado contra células planctônicas e sesséis na maior concentração (Figura 1, letras A e B).

A figura 2 demonstra os resultados obtidos para *E. coli*:

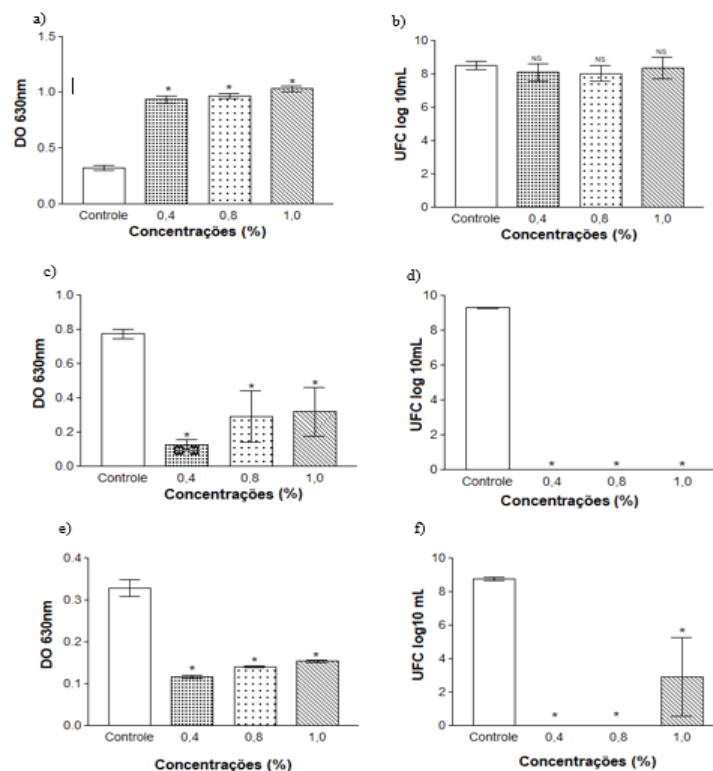


Figura 2. Sensibilidade de *Escherichia coli* aos tratamentos com óleos essenciais. a) *Cymbopogon winterianus* análise de DO; b) *Cymbopogon winterianus* análise de UFC; c) *Syzygium aromaticum* análise de DO; d) *Syzygium aromaticum* análise de UFC; e) *Laurus nobilis* análise de DO; f) *Laurus nobilis* análise de UFC. * indica $p < 0,05$ para o teste de ANOVA, ns indica que não houve diferença estatisticamente significativas.

Observa-se que apenas o óleo de *Syzygium aromaticum* demonstrou um efetivo controle das células planctônicas de *E. coli*, no entanto, também houve crescimento bacteriano na análise de DO. Já o óleo de *Laurus nobilis* apresentou um pequeno crescimento de células na concentração de 1%, porém, foi estatisticamente significativo ($p < 0,05\%$), ou seja, demonstrou



controle frente à cepa. E por fim, no tratamento com o óleo de *Cymbopogon winterianus* houve crescimento nas análises de DO e UFC, não sendo estatisticamente significativo para esta última, ou seja, não demonstrou eficácia no controle ($P > 0,05$).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial de *Syzygium aromaticum* foi o mais eficaz contra ambas as cepas. *Laurus nobilis* também apresentou potencial antimicrobiano frente às cepas na análise de CFU, E, por fim, o óleo de *Cymbopogon winterianus* apresentou o menor potencial, pois, observou-se o crescimento em ambas análises para as duas bactérias. Desta forma, pode-se dizer que os óleos essenciais são alternativas interessantes para utilização como antimicrobianos naturais, contudo, dependendo das condições estudadas ocorrem variações de alguns resultados em comparação à outros. Os próximos estudos poderão objetivar o efeito destes óleos utilizando a variável tempo, frente à formação de biofilmes bacterianos e em soluções mistos contendo antibióticos ou sanitizantes comerciais.

REFERÊNCIAS

- BJARNSHOLT, T., CIOFU, O., MOLIN, S., GIVSKOV, M. AND HØIBY, N. Applying insights from biofilm biology to drug development – can a new approach be developed? **Nat Rev Drug Discov** 12, 791–808, 2013.
- MENDONÇA, E. P. Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frango no Brasil. **Universidade Federal de Uberlândia**, 2016.
- MILLEZI, A. F.; PICCOLI, R. H.; OLIVEIRA, J. M.; AND PEREIRA, M. O. Anti-biofilm and Antibacterial Effect of Essential Oils and Their Major Compounds. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.19, p.624-631, 2016.
- RIBEIRO, S. M., FELICIO, M. R., BOAS, E.V., GONÇALVES, S., COSTA, F. F., SAMY, R. P., SANTOS, N. C., FRANCO, O.L. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacol Ther** 160, 133–144, 2016.
- SILVA, C. V. O., *et al.* *Escherichia coli* na suinocultura. Aspectos clínicos. Uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.9, n.2, 2015