



ACÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Cronobacter* spp.

Palavras-Chave: *Cronobacter* spp., alimentos prontos para consumo, óleos essenciais, antimicrobianos.

Autores/as:

GUSTAVO DA COSTA SILVESTRE, FEA, UNICAMP

CARINE DA FONSECA CECHIN, FEA, UNICAMP

Prof.^(a) Dr.^(a) DIRCE YORIKA KABUKI (orientador(a)) FEA, UNICAMP

INTRODUÇÃO

Cronobacter spp. são patógenos oportunistas que pertencem à família *Enterobacteriaceae*, e incluem sete espécies: *Cronobacter sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, *C. condimenti* e *C. universalis* (Iversen *et al.* 2008; Joseph *et al.* 2012). Entre estas, *C. sakazakii* é a espécie mais implicada nos casos de infecções graves em bebês, principalmente após o consumo de fórmulas infantis em pó contaminadas (FAO/WHO, 2008; Forsythe; Dickins; Jolley, 2014). As fórmulas infantis em pó foram um dos primeiros alimentos com isolamento de *Cronobacter* spp. (Farmer, 2015), entretanto esse patógeno já foi isolado de diversos alimentos de origem vegetal (Cechin *et al.*, 2022), e em menor ocorrência em alimentos de origem animal (Li *et al.* 2020, Zeng *et al.*, 2020).

Para o controle de micro-organismos em alimentos as indústrias fazem o uso de conservantes para prevenir a deterioração e para garantir a segurança do produto. Os conservantes sintéticos são a alternativa mais utilizada pelas indústrias, entretanto, nos últimos anos, alternativas naturais a esses compostos estão sendo objetos de pesquisa, devido à preocupação dos consumidores em relação aos possíveis efeitos adversos que os conservantes sintéticos podem causar (Souza *et al.*, 2019). Entre essas alternativas destacam-se o uso de óleos essenciais como um potencial substituto dos conservantes químicos.

Os óleos essenciais (OE) são produtos naturais obtidos de diversas partes de plantas aromáticas como flores, brotos, folhas, caule, frutas, cascas, sementes; e produzidos apenas por meios físicos, como prensagem e destilação, de uma planta inteira ou parte de uma planta de origem conhecida (Vergis *et al.*, 2015; Ribeiro-Santos *et al.*, 2017). Estes óleos apresentam diversos compostos, incluindo compostos fenólicos, que possuem atividade antimicrobiana e possibilitam a diminuição ou mesmo a eliminação de microrganismos, podendo reduzir ou substituir o uso de aditivos sintéticos, tornando-se antimicrobianos alternativos (Calo *et al.*, 2015; Ribeiro-Santos *et al.*, 2017).

Apesar do número crescente de estudos sobre a avaliação da atividade antimicrobiana de OE contra bactérias patogênicas, estudos sobre o efeito dos OE em *Cronobacter* spp. ainda são escassos (Ribeiro *et al.*, 2023). Assim, o estudo da ação antimicrobiana em *Cronobacter* spp. mostra-se relevante uma vez que as pesquisas têm demonstrado a sua presença em alimentos e o possível uso dos OE como alternativa natural para minimizar o risco por *Cronobacter* e contribuir para a saúde dos consumidores. No futuro, a utilização dos OE como alternativa para redução de contaminações de alimentos e das superfícies de equipamentos nas indústrias de alimentos torna-se promissor.

Desta forma, este projeto de iniciação científica tem como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de óleos

essenciais sobre *Cronobacter* spp. isoladas de alimentos prontos para o consumo.

METODOLOGIA

Óleos essenciais

Foram avaliados dez OE, sendo eles, cravo (*Syzygium aromaticum*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), hortelã (*Mentha spicata*), pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi), manjerona (*Origanum majorana* L.), canela (*Cinnamomum cassia*), tomilho branco (*Thymus vulgaris*), limão siciliano (*Citrus limon*), cúrcuma (*Curcuma longa*) e gengibre (*Zingiber officinale*). As soluções de OE foram diluídas em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%.

Culturas de *Cronobacter* spp.

Foram utilizadas 8 culturas de *C. sakazakii* e 2 de *C. malonaticus* isoladas de alimentos prontos para o consumo como granola, semente de chia, semente de linhaça, farinha de chia e farinha de linhaça. As culturas são de diferentes perfis genotípicos (diferentes alelos do gene *fusA*) e de resistência a antibióticos.

Verificação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais.

Uma avaliação inicial da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de disco-difusão segundo Berthold-Pluta *et al.* (2019), com pequenas modificações. As culturas de *Cronobacter* foram cultivadas em Tryptic Soy Agar (TSA) durante 20 horas. Para preparação do inóculo, colônias foram suspensas em solução salina 0,85% a fim de obter uma turbidez comparada a escala 0,5 de *McFarland* (10^8 UFC/mL), foram diluídas até uma concentração de aproximadamente 10^5 UFC/mL e espalhadas em placas de TSA por meio de um swab estéril. Discos de papel filtro estéreis de 6 mm foram acrescentados nas placas, e alíquotas de 10 µL de cada óleo essencial em seu estado puro adicionados nos discos imediatamente. As placas foram deixadas em temperatura ambiente durante 30 minutos para a completa difusão dos óleos, e em seguida incubadas a 35°C durante 24 horas. Após o período de incubação, foi verificado o diâmetro dos

halos de inibição em milímetros para uma triagem inicial dos óleos essenciais frente as cepas estudadas. Os OE que apresentaram zona de inibição > 21 mm (incluindo o diâmetro do disco) foram considerados com alta atividade antimicrobiana, de 14 – 21 mm com média atividade antimicrobiana, e <14 mm com baixa atividade antimicrobiana. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Determinação da concentração inibitória mínima.

A CIM foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo *Mueller-Hinton* segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) e Gonçalves *et al.* (2017). Os inóculos foram preparados seguindo a turbidez 0,5 de uma solução padrão da escala de *McFarland* e diluído até uma concentração final de aproximadamente 10^5 UFC/mL. Soluções contendo diversas concentrações dos óleos essenciais (50 – 0,09766 mg/mL) e (3,125 – 0,0061), diluídas de forma seriada, foram adicionadas em placas de microdiluição contendo caldo *Mueller-Hinton* como meio de crescimento. Em seguida, o inóculo foi adicionado em cada poço da placa de microdiluição, e incubado a 35 °C durante 18 ± 2 horas. A CIM foi determinada como a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do microrganismo nos poços de microdiluição detectado visualmente, e para confirmação, foram adicionados 50 µL de uma solução de cloreto de trifetil tetrazólio (0,1%) em cada poço e incubado novamente por 3 h. Poços com coloração vermelha indicam atividade respiratória (crescimento), e assim a confirmação da CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano (sem coloração vermelha).

Determinação da concentração mínima bactericida.

A CMB foi determinada segundo Fei *et al.* (2018). Após a determinação da CIM, as alíquotas das culturas após o tratamento que não apresentaram crescimento foram inoculadas em placas de *Tryptic Soy Agar* (TSA) e incubadas a 35°C por 24h. A CMB foi definida como a menor concentração na qual não houve crescimento em ágar TSA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais.

A partir dos dados experimentais obtidos nesta etapa de triagem (Tabela 1) nota-se alta atividade antimicrobiana de OE provenientes do tomilho, canela e manjerona, média atividade inibitória do OE de cravo, com exceção da cepa C152, e baixa atividade inibitória para o OE de hortelã. A atividade inibitória do OE de alecrim foi dependente da cepa, variando de 0 a 17,95 mm, como mostra a Tabela 1. Ademais, observa-se a ausência de halos de inibição a partir da aplicação de óleos essenciais de gengibre, limão, cúrcuma e pimenta rosa, indicando insuficiente atividade

antimicrobiana sobre as cepas estudadas e desta forma, os mesmos não foram incluídos nas análises posteriores.

Dentre os OE com os melhores resultados, no tomilho, está presente o timol (50%), na canela, o cinamaldeído (80%), e na manjerona, o terpineno-4-ol (22%) e sabineno (16%) (Ferquima). Os resultados obtidos corroboram com estudos que já demonstraram que compostos como trans-cinamaldeído, citral, carvacrol, timol e eugenol possuem efeito antimicrobiano contra cepas de *Cronobacter* spp., e essas substâncias são constituintes individuais de muitos OE (Amalaradjou;Hoagland; Venkitanarayanan, 2009; Shi *et al.*, 2016).

Tabela 1a. Diâmetro médio dos halos de inibição dos óleos essenciais frente a cepas de *Cronobacter* spp.

Óleo Essencial	Diâmetro médio dos halos (mm)				
	C06	C10	C39	C62	C101
OEC	26,80 (±1,47)	24,19 (±0,70)	26,56 (±0,68)	27,43 (±1,88)	26,86 (±2,96)
OEG	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OEL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OEM	24,99 (±4,29)	23,48 (±3,43)	21,83 (±5,36)	26,79 (±4,60)	22,85 (±4,14)
OEH	10,77 (±0,25)	11,40 (±0,14)	12,06 (±1,01)	11,38 (±1,20)	13,27 (±1,56)
OEPR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OEA	14,83 (±0,39)	15,96 (±2,53)	13,86 (±1,12)	10,20 (±1,18)	12,38 (±0,66)
OECR	17,29 (±0,35)	18,12 (±2,81)	14,40 (±0,27)	15,67 (±0,26)	15,86 (±0,78)
OET	>50,40	>52,10	>62,40	>38,80	>48,35
OECC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 1b. Diâmetro médio dos halos de inibição dos óleos essenciais frente a cepas de *Cronobacter* spp.

Óleo Essencial	Diâmetro médio dos halos (mm)				
	C125	C131	C144	C146	C152
OEC	26,05 (±2,18)	26,30 (±1,58)	25,54 (±1,36)	25,73 (±2,56)	26,31 (±1,01)
OEG	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OEL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OEM	26,69 (±7,89)	34,59 (±7,51)	24,59 (±3,09)	26,72 (±5,78)	22,87 (±5,63)
OEH	11,84 (±0,52)	10,62 (±0,21)	11,48 (±0,85)	12,17 (±1,70)	12,78 (±1,21)
OEPR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OEA	0,00	0,00	17,95 (±1,47)	14,62 (±1,05)	14,62 (±1,96)
OECR	15,67 (±0,26)	14,22 (±0,67)	20,37 (±0,78)	16,79 (±1,53)	22,04 (±2,76)
OET	>50,13	>40,12	>44,85	>46,56	>47,12
OECC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

OEC, OE canela; OEG, OE gengibre; OEL, OE limão; OEM, OE manjerona; OEH, OE hortelã; OEPR, OE pimenta-rosa; OEA, OE alecrim; OECR, OE cravo; OET, OE tomilho; OECC cúrcuma.

Determinação da concentração inibitória mínima.

Nota-se que o OE de tomilho e canela apresentaram o melhor desempenho inibitório em comparação aos demais OE (Tabela 2), onde 8 e 7 cepas apresentaram CIM

≤0,0488 mg/mL, respectivamente, sendo essa a menor concentração avaliada.



Tabela 1 - Concentrações Inibitórias Mínimas (mg/mL) dos OE em cepas *Cronobacter* spp.

Óleo	CIM (mg/mL)										
	Essencial	C06	C10	C39	C62	C101	C125	C131	C144	C146	C152
OEC		0,39063	0,0976	0,09766	0,09766	0,09766	0,19531	0,19531	0,04883	0,04883	0,19531
OEM		0,39063	0,19531	0,19531	0,39063	0,09766	0,19531	0,19531	0,39063	0,09766	0,19531
OEH		0,19531	0,19531	0,39063	0,78125	0,09766	0,39063	0,39063	0,39063	0,19531	0,19531
OECR		0,39063	0,39063	0,39063	0,39063	6,25000	6,25000	6,25000	1,5625	0,39063	0,78125
OET		0,09766	0,09766	0,09766	0,09766	0,09766	0,19531	0,09766	0,19531	0,09766	0,04883
OEA		1,56250	3,12500	1,56250	1,56250	0,78125	3,12500	1,56250	1,5625	0,39063	0,39063

Também apresentaram desempenho inibitório satisfatório os OE de manjerona e hortelã, com CIM variando de 0,09766 a 0,39063 mg/mL, (Tabela 2). O OE de cravo apresentou atividade inibitória variável e dependente da cepa. Ademais, o OE de alecrim demonstrou o menor potencial inibitório, com CIM variando de 0,39063 a 3,12500 mg/mL.

Determinação da concentração mínima bactericida.

Ao analisar os dados obtidos experimentalmente de CMB apresentados na Tabela 3, pode-se validar alguns dos valores de CIM também como CMB (Tabela 3), confirmando que os OE avaliados apresentaram ação antibacteriana frente às cepas de *Cronobacter* spp. até então avaliadas, onde os OE de canela, manjerona, e

tomilho, a partir dos menores valores de CIM e CBM, apresentaram os melhores resultados.

De acordo com Menezes *et al.* (2009), produtos naturais exibem atividade antimicrobiana suficiente quando a concentração inibitória é inferior a 100 mg/mL. No presente estudo, as CIM e CBM dos OE de canela, manjerona, e tomilho, apresentaram valores muito baixos, o que indica elevada atividade antimicrobiana e corrobora o resultado de outros estudos em relação a canela (*C. cassia*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) (Abu-Ghazaleh *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2012; Al-Nabulsi *et al.*, 2015). No entanto, não foi encontrado dados na literatura dos OE de hortelã (*Mentha spicata*), cravo (*Eugenia caryophyllata*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e manjerona (*O. majorana* L) frente às cepas de *Cronobacter* spp.

Tabela 3 - Concentrações Mínimas Bactericidas (mg/mL) dos OE em cepas de *Cronobacter* spp.

Óleo	CMB (mg/mL)										
	Essencial	C06	C10	C39	C62	C101	C125	C131	C144	C146	C152
OEC		0,39063	0,0976	0,09766	0,09766	0,39063	0,39063	0,39063	0,19531	0,04883	0,19531
OEM		0,39063	0,19531	0,19531	0,39063	0,09766	0,19531	0,19531	0,39063	0,09766	0,39063
OEH		0,19531	0,19531	0,39063	0,78125	0,09766	0,39063	0,39063	0,78125	0,19531	0,19531
OECR		0,39063	3,12500	0,78125	6,25000	12,50000	25,00000	12,50000	6,25000	3,12500	3,12500
OET		0,09766	0,09766	0,09766	0,09766	0,09766	0,04883	0,09766	0,19531	0,02441	0,02441
OEA		1,56250	3,12500	1,56250	1,56250	0,78125	3,12500	1,56250	6,25000	0,39063	0,78125

CONCLUSÕES

Diante dos resultados deste estudo surgem possibilidades de utilizar os OE de canela (*Cinnamomum cassia*), manjerona (*O. majorana L*), tomilho (*Thymus vulgaris*), cravo (*Eugenia caryophyllata*), hortelã (*Mentha spicata*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*), a concentrações variadas, como agentes antimicrobianos frente a *Cronobacter* spp., e mais estudos devem ser realizados para avaliar a aplicação desses compostos em alimentos ou embalagens para oferecer atividade antimicrobiana.

BIBLIOGRAFIA

- ABU-GHAZALEH, B. M. Antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* extract, *Syzygium aromaticum* extract, and *Zingiber officinale* extract on *Cronobacter* spp. as compared with common preservatives. **Department of Biology and Biotechnology [Hashemite University]**, 2019.
- ALMEIDA, L. F. D. ; CAVALCANTI, Y. W. ; CASTRO, R. D. ; LIMA, E. O. Atividade antifúngica de óleos essenciais frente amostras clínicas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (Impresso)**, v. 14, p. 649-655, 2012.
- AL-NABULSI, A. A., *et al.* Inactivation of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted infant milk formula by plant essential oils. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 88, p. 97 – 101, 2015.
- BERTHOLD-PLUTA, A., *et al.* Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils against *Cronobacter* strains. **European Food Research and Technology**, v. 245, p. 1137–1147, 2019.
- CALO, J. R., *et al.* Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.
- CECHIN, C. F. *et al.* *Cronobacter* spp. in foods of plant origin: occurrence, contamination routes, and pathogenic potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2022.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2012.
- FARMER III, J. J. My 40-year history with *Cronobacter/Enterobacter sakazakii* – lessons learned, myths debunked, and recommendations. **Frontiers in Pediatrics**, v. 3, n. 84, 2015.
- IVERSEN, C., *et al.* *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1442–1447, 2008.
- JOSEPH, S., *et al.* *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. *genomospecies* 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1277–1283, 2012.
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula: Meeting Report. **Microbiological Risk Assessment Series**, n. 15, 2008.
- FEI, P. *et al.* Antimicrobial activity and mechanism of action of olive oil polyphenols extract against *Cronobacter sakazakii*. **Food Control**, v. 94, p. 289–294, 2018.
- FERQUIMA. **Laudo da composição dos óleos essenciais**.
- FORSYTHE, S. J.; DICKINS, B.; JOLLEY, K. A. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1121, 2014.
- GONÇALVES, N. D., *et al.* Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. **Food Research International**, v. 96, p. 154 – 160, 2017.
- LI, C. *et al.* *Cronobacter* spp. isolated from aquatic products in China: Incidence, antibiotic resistance, molecular characteristic and CRISPR diversity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 335, n. 108857, 2020.
- MENEZES, T.O.A.; ALVES A.C.B.A.; VIEIRA, J.M.S.; MENEZES, S.A.E.; ALVES, B.P.; MENDONÇA, L.C.V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Ver Odontol UNESP**, v.38, p.184-191, 2009.
- SOUZA, B.A. *et al.* Aditivos alimentares: aspectos tecnológicos e impactos na saúde humana. **Revista Contexto & Saúde**, v. 19, n. 36, p. 5-13, 2019.
- RIBEIRO, Bárbara Raianne Silva Carneiro *et al.* ATIVIDADE CONSERVANTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM ALIMENTOS: UMA REVISÃO DA LITERATURA. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-SERGIPE**, v. 8, n. 1, p. 63-76, 2023.
- RIBEIRO-SANTOS, R., *et al.* Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, p. 132-140, 2017.
- VERGIS, J., *et al.* Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, p. 1320–1323, 2015.
- ZENG, H. *et al.* Prevalence, genetic analysis and CRISPR typing of *Cronobacter* spp. isolated from meat and meat products in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 321, n. 108549, 2020.