

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

## AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ADAPTATIVA DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRÁGICA AO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

M.C. Gonçalves<sup>1</sup>, C.M.G. Lima<sup>2</sup>, J. P. Pagnossa<sup>3</sup>, J.J. Pinelli<sup>4</sup>, T.R. Souza<sup>5</sup>, R.H. Piccoli<sup>6</sup>

1- Departamento de Biologia – Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola – CEP: 37200-900 – Lavras – MG – Brasil, Telefone: 55 (35) 3829-1613 – Fax: +55 35 3829 5185 – e-mail: ([michellemicroagricola@gmail.com](mailto:michellemicroagricola@gmail.com))

2- Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias – CEP: 88034-001 – Florianópolis – SC – Brasil, Telefone: 55 (48) 3721-5374 – Fax: (48) 3721 – 9943 – e-mail: ([claramarianalima@gmail.com](mailto:claramarianalima@gmail.com))

3- Departamento de Biologia – Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola – CEP: 37200-900 – Lavras – MG – Brasil, Telefone: 55 (35) 3829-1613 – Fax: +55 35 3829 5185 – e-mail: ([jorgepampa@gmail.com](mailto:jorgepampa@gmail.com))

4- Departamento de Biologia – Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola – CEP: 37200-900 – Lavras – MG – Brasil, Telefone: 55 (35) 3829-1613 – Fax: +55 35 3829 5185 – e-mail: ([jujpinelli@gmail.com](mailto:jujpinelli@gmail.com))

5- Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – Goiás – CEP: 75901-970 - Rio Verde – GO – Brasil, Telefone: 55 (64) 3620-5600 Fax: 55 (64) 3620-5640 - e-mail: ([tenillemicro@gmail.com](mailto:tenillemicro@gmail.com))

6- Professora Titular - Departamento de Ciências dos Alimentos – Universidade Federal de Lavras – CEP: 37200-900 – Lavras – MG – Brasil, Telefone: 55 (35) 3829-1613 – Fax: +55 35 3829-1401 – e-mail: ([rhpiccoli@ufla.br](mailto:rhpiccoli@ufla.br))

**RESUMO** – O trabalho objetivou verificar a capacidade adaptativa de EHEC O157:H7 ao óleo essencial de orégano. Inicialmente, a Concentração Mínima Bactericida (CMB) do óleo foi determinada e posteriormente, as células de EHEC foram expostas a concentrações subletais do óleo (CMB/4 e CMB/8). Adiante, testadas frente a diferentes concentrações do óleo essencial (CMB/2 até 2CMB). Estas foram incubadas e plaqueadas em TSA (Ágar Triptona de Soja) empregando a técnica de microgotas. As células de EHEC foram classificadas como capazes de se adaptarem por crescerem em placas após cultivo em presença do óleo em concentração igual ou maior que a CMB do óleo (0,5% (v/v)). As células de EHEC apresentaram a capacidade adaptativa por crescerem em concentrações de até duas vezes o valor de CMB (1,0%), após expostas a CMB/8. Os resultados demonstram a necessidade de utilização adequada da concentração do óleo essencial de orégano (0,5%), a fim de evitar a adaptação.

**ABSTRACT** – The work aimed to verify the adaptive capacity of EHEC O157: H7 to oregano essential oil. Initially, the Minimum Bactericidal Concentration (CMB) of the oil was determined and later, the EHEC cells were exposed to sublethal concentrations of the oil (CMB/4 and CMB/8). Ahead, tested against different concentrations of essential oil (CMB/2 to 2CMB). These were incubated and plated on TSA (Soy Tripton Agar) using the microdroplet technique. EHEC cells were classified as capable of adapting by growing in plates after cultivation in the presence of oil in a concentration equal to or greater than the oil's CMB (0.5% (v/v)). The EHEC cells showed the adaptive capacity for growing in concentrations up to twice the value of CMB (1.0%), after being

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



[www.officeeventos.com.br](http://www.officeeventos.com.br)



exposed to CMB/8. The results demonstrate the need for an adequate use of oregano essential oil concentration (0, 5%) in order to avoid adaptation.

**PALAVRAS-CHAVE:** patógeno alimentar; plantas condimentares; segurança alimentar.

**KEYWORDS:** food pathogen; condiment plants; food security.

## 1. INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa da família Enterobacteriaceae, anaeróbia facultativa pertencente a microbiota comensal intestinal normal da maior parte dos animais e seres humanos. Apresenta-se na forma de bacilo e possui de 1,1 a 1,5 x 2,0 a 6 µm, motilidade com flagelos peritríqueos e capacidade de fermentar a glicose com formação de ácido e gás (HOLT, 1994).

Embora seja considerada não patogênica, são conhecidos seis sorotipos que apresentam patogenicidade em diferentes graus. Dentre eles, a *Escherichia coli* Enteroemorrágica (EHEC), destaca-se por causar um sério dano renal que resulta em Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda que pode ser fatal (KAPER, et al., 2004).

A segurança alimentar relacionada à saúde pública tem sido considerada problema crítico e esta área tem recebido atenção crescente nos últimos anos. Infecção alimentar causada por *E.coli*, em especial por EHEC é um problema emergente em indústrias alimentícias, devido ao desenvolvimento progressivo da adaptação microbiana aos sanitizantes e conservantes utilizados. E essa capacidade das células se adaptarem às condições ambientais inóspitas envolvem respostas fisiológicas ao estresse relacionadas às estratégias de sobrevivência e crescimento (ALIZADE et al., 2014).

O orégano (*Origanum vulgare*) é uma planta aromática amplamente utilizada como condimento na culinária e dessa é extraído o óleo essencial. O uso de óleos essenciais tem sido sugerido como uma maneira de reduzir esses mecanismos de adaptação bacteriana devido à complexidade desses óleos, o que garante que eles atuem em vários alvos nas células microbianas, porque os óleos essenciais podem alterar a permeabilidade das células microbianas, danificar membranas citoplasmáticas, alterar as proteínas da membrana, interferem no sistema de geração de energia (trifosfato de adenosina (ATP)) e interrompem a homeostase celular, resultando em morte (NAZZARRO et al. 2013).

Ao considerar a elevada atividade antibacteriana dos óleos essenciais, faz-se necessário verificar a capacidade de adaptação bacteriana a esses antimicrobianos naturais quando exposta à doses subletais dos mesmos a fim de garantir a segurança alimentar nas indústrias produtoras de alimentos.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de adaptação de *Escherichia coli* Enteroemorrágica (O157:H7-INCQS:00171) frente ao componente óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), utilizado como antibacteriano.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local do experimento

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, localizado no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

## 2.2 Óleo essencial

O óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) foi extraído *in situ* no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), conforme metodologia descrita por Souza et al. (2016). Sua composição é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição do óleo essencial de orégano.

Óleo essencial	Componentes majoritários	Concentração (%)
Orégano	Carvacrol	73.11
	E-Cariofileno	4.32
	$\gamma$ -Terpineno	3.93
	Timol	2.97

Fonte: Souza et al. (2016)

## 2.3 Microrganismo padrão, padronização e preparo do inóculo

Foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* Enteroemorrágica (EHEC) O157:H7-INCQS:00171, cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro. A cultura estoque foi armazenada em meio de congelamento (glicerol - 15 mL; peptona bacteriológica - 0,5 g; extrato de levedura - 0,3 g; NaCl - 0,5 g; água destilada 100 mL, pH 7,0). O inóculo foi reativado inoculando-se alíquota de 100  $\mu$ L da cultura estoque em tubo contendo 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubado a 37 °C/24h. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento. Após a reativação, uma alíquota de 50  $\mu$ L do inóculo foi transferida para 300 mL de caldo BHI e incubada a 37 °C, sendo realizadas leituras periódicas (intervalos de uma hora) em espectrofotômetro (D.O.600nm) e plaqueamento em Ágar Tripton de Soja (TSA) com incubação a 37 °C/24h. A cultura foi padronizada ao redor de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

## 2.4 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de orégano sobre EHEC

A concentração mínima bactericida do óleo essencial foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placa de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o CLSI, 2015 com adaptações. O óleo essencial foi solubilizado em caldo BHI, adicionado de Tween 80 (0,5%) e utilizado. Foram avaliadas as seguintes concentrações (%): 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,03 e 0,015 (v/v). Alíquotas de 150  $\mu$  L das soluções foram adicionadas nas cavidades e inoculados 10  $\mu$ L da cultura padronizada. A microplaca foi vedada e incubada a 37 °C/24h. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas da cultura em TSA e incubado a 37 °C/24h. A concentração mínima bactericida do óleo essencial foi aquela onde, após incubação, não ocorreu crescimento bacteriano em placa. O experimento ocorreu em triplicata e três repetições e foram utilizados dois controles para o composto testado; Controle negativo, contendo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e óleo essencial e controle positivo, contendo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e inóculo.

## 2.5 Adaptação de EHEC ao óleo essencial

As células de EHEC foram expostas a concentrações subletais do óleo essencial de orégano. As doses subletais foram determinadas com base na CMB e equivalentes a CMB/4 e CMB/8 (LUNDÉN et al., 2003; SANTOS et al., 2018). Em tubos tipo Falcon contendo 36 mL de caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 foi adicionado o óleo essencial nas concentrações subletais. Após homogeneização, alíquotas de 4 mL de inóculo padronizado foi adicionado ao meio e os tubos foram incubados a 37 °C/6h. Após esse período as

culturas foram centrifugadas a 5000 xg/5 min e as células recuperadas foram lavadas 3 vezes com solução salina e utilizadas.

## 2.6 Avaliação da Adaptação de EHEC ao óleo essencial

A avaliação da adaptação foi realizada conforme descrito por Lundén et al., (2003) e por Santos et al., (2018). As células expostas às concentrações subletais do antimicrobiano foram ressuspensas em caldo BHI e a cultura foi padronizada em  $10^8$  UFC/mL para posterior exposição às diferentes concentrações do óleo essencial (CMB/2; CMB; 1,2CMB; 1,4CMB; 1,6CMB; 1,8CMB e 2CMB) ao qual a cultura foi previamente exposta. O ensaio foi realizado em microplacas. As microplacas foram incubadas a 37 °C/24h. Após esse período, alíquotas de 10 µL foram retiradas dos poços e plaqueadas em TSA pelo método de microgotas e encubadas a 37 °C/24h.

As células de EHEC foram classificadas como capazes de se adaptarem quando essas cresceram em placas após cultivo em presença do componente em concentrações iguais ou maiores que a CMB. Paralelamente, o mesmo procedimento foi realizado com células de EHEC não expostas a doses subletais, possibilitando a comparação entre células expostas e não expostas quanto à susceptibilidade ao óleo essencial.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de orégano sobre EHEC

O resultado da determinação da concentração mínima bactericida do óleo essencial de orégano sobre EHEC O157:H7-INCQS:00171 está indicado através da Tabela 2.

Tabela 2: Concentrações de inibição do óleo essencial de orégano para EHEC.

Microrganismo	% de Óleo essencial de orégano (v/v)							
	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,03	0,015
EHEC	-	-	-	+	+	+	+	+

Legenda: (+) Presença de crescimento; (-) Ausência de crescimento.

O resultado da concentração mínima bactericida apresentado na Tabela 2 demonstra a eficiência do óleo essencial de orégano sobre EHEC O157:H7-INCQS:00171, visto que este apresentou uma baixa CMB (0,5%). Estudos relatam que o óleo essencial de orégano é conhecido pela sua atividade antibacteriana em células planctônicas (Burt, 2004; Oussalah et al., 2007; Bakkali et al., 2008) e, portanto, é uma excelente opção para ser utilizado como conservante alimentar.

### 3.2 Avaliação da Adaptação de EHEC ao óleo essencial

Os resultados da avaliação da adaptação de EHEC O157:H7-INCQS:00171 ao óleo essencial estão expressos na Tabela 3.



Tabela 3: Avaliação da adaptação de EHEC ao óleo essencial.

Concentração	Dose subletal 1/4	Dose subletal 1/8	Controle
0,5CMB	+	+	+
CMB	-	+	-
1,2CMB	-	+	-
1,4CMB	-	+	-
1,6CMB	-	+	-
1,8CMB	-	+	-
2CMB	-	+	-

Legenda: (CMB = 0,5%) Concentração Mínima Bactericida; (+) Presença de crescimento; (-) Ausência de crescimento.

A avaliação da adaptação foi realizada pela adição de 1/4 e 1/8 da concentração de óleo essencial de orégano obtida no teste de CMB das células de EHEC, sendo estas 0,25 e 0,125 (%). A estirpe EHEC foi considerada capaz de se adaptar ao óleo essencial por crescer em concentrações de até duas vezes o valor da CMB após exposta a concentração subletal (1/8) do óleo. Já as células não expostas às concentrações subletais (controle), não foram capazes de crescer em concentrações variando de CMB a 2CMB, crescendo apenas em 0,5 CMB.

Adaptação microbiana pode ocorrer em ambiente industrial com relativa facilidade devido a prática habitual de diluição de agentes e sanitizantes para fins de maior rendimento econômico, portanto, os manipuladores de alimentos devem possuir um conhecimento maior sobre o potencial de desenvolvimento de tolerância do(s) microrganismo(s) alvo.

## 4. CONCLUSÕES

EHEC apresentou capacidade adaptativa quando exposta à dose subletal (1/8) do óleo essencial de orégano, por crescer em concentrações de até duas vezes (1%) o valor da concentração mínima bactericida do óleo essencial (0,5%), concentração que anteriormente era considerada bactericida. Portanto, deve-se respeitar as doses corretas de uso do antimicrobiano.

## 5. AGRADECIMENTOS

UFLA, CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

## 6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ALIZADE, H.; GHANBARPOUR, R.; AFLATOONIAN, M. R. (2014). Molecular study on diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from under 5 years old children in southeast of Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(1), 813-817.



- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. (2008). Biological effects of essential oils: a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 446-475.
- BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 94(3), 223-253.
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard-Tenth Edition. CLSI document MO7-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- HOLT, J. G. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 787 p. 1994.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBBLEY, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*, London, 2(1), 123-140.
- LUNDÉN, J. M.; AUTIO, T.; MARKKULA, A.; HELLSTROM, S.; KORKEALA, H. (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 82(3), 265-272.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, Avellino, 6(12), 1451-1474.
- OUSSALAH, M., CAILLET, S., SAUCIER, L., LACROIX, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18(1), 414-420.
- SANTOS, J. M., GONÇALVES, M. C., MARTINS, H. A., PINELLI, J. J., ISIDORO, S. R., & PICCOLI, R. H. (2018). Homologous and Heterologous Adaptation of *Listeria* spp. to Essential Oils of Condiment Plants. *Advances in Microbiology*, 8(08), 639.
- SOUZA, A. A.; DIAS, N.A.A.; PICCOLI, R.H.; BERTOLUCCI, S.K.V. (2016). Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* Enterotoxigênica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, 18(1), 105-112.