

ACÇÃO BACTERICIDA DE DETERGENTE-SANIFICANTE À BASE DE ÓLEOS
ESSENCIAIS SOBRE BIOFILME DE *Aeromonas hydrophila*

Alessandra F. Millezi¹; Eduardo Alves² Maria das Graças Cardoso³; Roberta Hilsdorf Piccoli⁴

RESUMO:

Os biofilmes são comunidades complexas formadas por microrganismos embebidos em matriz de substância exopolissacarídica. Diversas bactérias deterioradoras e patogênicas são capazes de formar biofilme, entre elas muitas responsáveis por causar prejuízos econômicos nas indústrias alimentícias e problemas de saúde pública devido a contaminações dos alimentos. Atualmente, uma opção promissora, que vem sendo bastante estudada, é a aplicação de óleos essenciais como antimicrobianos. Nesse estudo, os óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão) demonstraram ser alternativas eficazes quando utilizados como soluções sanitizantes reduzindo o biofilme formado por *Aeromonas hydrophila*.

Palavras-chaves: bactérias, antimicrobianos, óleos essenciais

INTRODUÇÃO

Biofilmes são complexos ecossistemas microbiológicos embebidos em matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície. Uma vez estabelecidas, bactérias sésseis expressam genes em modelo que difere extremamente ao de bactérias planctônicas, levando a mudanças fenotípicas (Prigent-Combaret & Lejeune, 1999). Portanto, células em biofilme podem persistir e sobreviver mesmo após processos de sanitização, representando fonte original de contaminação de alimentos e consequentes toxinfecções em humanos e animais (Chavant et al., 2007).

Atualmente há vários estudos sobre a formação de biofilmes em superfícies usadas na indústria de alimentos, entre esses está *Aeromonas hydrophila*, que é reconhecida pela capacidade de produzir vários fatores de virulência como a produção de citotoxinas e enterotoxinas, hemolisinas e capacidade de adesão e invasão de células epiteliais (Pin et al., 1997) causando gastroenterites em humanos. Devido sua origem aquática, apresenta distribuição ubíqua no ambiente podendo estar presente nos mais diferentes tipos de produtos animais e vegetais, como pescado e derivados, carnes e derivados ou qualquer alimento que entre em contato com água (Suñen et al. 2003).

O crescente interesse em compostos antimicrobianos naturais tem aumentado devido a mudanças nas atitudes dos consumidores em relação ao uso de agentes sintéticos de preservação de alimentos, detergentes e sanitizantes que possuam impacto negativo ao ambiente (Lebert et al., 2007), neste contexto, destaca-se a utilização de óleos essenciais. Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, observa-se que sua atividade antibacteriana não é atribuída somente a um mecanismo específico, havendo diferentes alvos na célula microbiana (Lambert et al., 2001).

Diversas espécies de plantas medicinais e condimentares produzem no seu metabolismo secundário óleos essenciais, dentre elas, destaca-se a espécie *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., que é conhecida popularmente por mais de 20 nomes, dentre estes capim-limão, capim-santo (Gomes & Negrelle, 2007), limonete, capim de cheiro, capim cidreira, citronela menor, melissa e erva cidreira verdadeira.

A maior importância econômica de *Cymbopogon citratus* reside na produção de seu óleo essencial, rico em citral e largamente utilizado na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (Costa et al., 2005). Além do *C. citratus* o gênero *Thymus* possui numerosa quantidade de espécies e variedades e seus óleos essenciais têm sido estudados (Jordán et al., 2006; Lerbert et al., 2004). Seu óleo essencial é rico em timol, apresentando traços de carvacrol, potentes bactericidas e fungicidas reconhecidos cientificamente (Essawi & Srour, 2000).

¹Departamento de Ciências Biológicas, Setor de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil, amillezi@yahoo.com.br, ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil, ³Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil e ⁴Departamento de Ciência do Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil

Com base no exposto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a ação detergente sanificante de soluções de hidróxido de sódio adicionadas de óleos essenciais de *C. citratus* e *T. vulgaris* sobre esses biofilmes

MATERIAIS E METODOS

Local e condução do experimento

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos no Departamento de Ciência dos Alimentos (CMI e Tratamento de cupons), no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química (extração de óleos essenciais) e no Laboratório de Microscopia Eletrônica, no Departamento de Fitopatologia (Microscopia Eletrônica de Varredura), da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Microrganismo utilizado e material vegetal

A bactéria utilizada nesse experimento foi *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 e para extração dos óleos essenciais foram utilizadas folhas secas de *Cymbopogon citratus*, obtidas no Horto de Plantas Medicinais de UFLA. As coletas foram realizadas das 8 às 9 horas da manhã, em dias ensolarados e ausentes de chuva, no mês de setembro de 2009, sob temperatura de, aproximadamente, 20°C. As folhas secas de *Thymus vulgaris* foram adquiridas no comércio de Lavras, MG, Brasil.

Extração dos óleos essenciais e quantificação dos compostos majoritários

O processo de extração dos óleos essenciais foi realizado empregando-se o método de hidrodestilação, em aparelho de Clevenger (Castro, 2006). As análises quantitativas foram realizadas utilizando-se cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 17^a equipado com detector de ionização de chamas (FID). A quantificação dos compostos majoritários foi obtida por meio da normalização de áreas (%).

Determinação da concentração mínima inibitória dos óleos essenciais (CMI)

A atividade antimicrobiana dos óleos foi testada pelo método de difusão cavidade placa ágar proposto por Deans & Ritchie (1987) modificado (Pereira et al., 2008). O inóculo foi padronizado na concentração final de 10⁸ UFC mL⁻¹. Foram utilizadas soluções de óleos de *C. citratus* e *T. vulgaris* em etanol absoluto e nas concentrações de 0 (controle), 4, 8, 16, 31, 62, 125, 250 e 500 µl ml⁻¹/NaOH. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Os halos de inibição foram medidos com paquímetro.

Adesão das células bacterianas em superfície de aço inoxidável

As células bacterianas foram aderidas em cupons de aço inoxidável AISI 304 contidos em placas de Petri, utilizando-se leite desnatado UHT como substrato. As placas foram incubadas a 28 °C durante 48 horas sob agitação de 50 rpm.

O monitoramento do biofilme foi realizado através da contagem padrão em placas, para isso foi realizada a remoção das células aderidas foi utilizada a técnica de esfregaço em superfície, empregando-se *swabs* de algodão padronizados, previamente esterilizados. O número de células aderidas nos cupons foi determinado a cada dois dias até o décimo dia de cultivo.

Tratamento dos cupons de aço inoxidável com óleos essenciais adicionados em detergente alcalino

Após o período de incubação de 10 dias, os cupons com biofilme de *A. hydrophila*, foram mergulhados em solução de NaOH (1% p/v) sem adição de óleo e contendo óleo essencial de *C. citratus* e *T. vulgaris*. As soluções, contendo os cupons, foram mantidas por 15 minutos às temperaturas de 20°C e 40°C. Para a avaliação da eficiência das soluções detergentes-sanificantes (óleo essencial e NaOH 1%), foram utilizadas as CMI de ambos os óleos sobre o biofilme de *A. hydrophila*. Após, os cupons foram submetidos ao esfregaço com os *swabs*. Diluições seriadas em água peptonada 0,1% (p/v) foram realizadas a partir do tubo de ensaio contendo o *swab*, seguindo-se o

plaqueamento de alíquotas de 100 µl na superfície de TSA. As placas foram incubadas a 28°C por 24 horas.

Delineamento Estatístico

Para a proporção de bactérias sobreviventes aos tratamentos com os óleos essenciais, o experimento foi instalado segundo o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, em que os tratamentos constituíam-se de três tipos de detergente (NaOH, óleo essencial de capim-limão adicionado em NaOH e óleo essencial de tomilho adicionado em NaOH) e duas temperaturas (20°C e 40°C). Foram realizadas contagens de unidades formadoras de colônia UFC /cm², antes e depois da adição do detergente sobre o cupom, expressas na forma logarítmica (log UFC /cm²), sendo a variável medida a razão (proporção) de entre o log UFC /cm² antes e log UFC /cm² depois.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos valores de Concentração Mínima Inibitória, para o óleo essencial de tomilho foi de 62 µl ml⁻¹ e para o óleo de capim-limão 31 µl ml⁻¹, tais valores foram utilizados nas soluções detergentes-sanificantes.

Após dois dias de cultivo a bactéria já havia formado biofilme sobre a superfície, alcançando 6,6 ciclos log UFC cm⁻², sendo que após 10 dias de cultivo o número de células sésseis aumentou para 7,8 log UFC cm⁻². Esse aumento ocorreu devido à multiplicação das células já aderidas uma vez que o leite foi trocado a cada dois dias. Boari et al. (2009) mostraram que *A. hydrophila* formou biofilme quando cultivada em leite UHT desnatado sob as temperaturas de 4, 7 e 18°C, sendo que, para 7 e 18°C o biofilme já havia sido formado no segundo dia de cultivo, com contagens de 1,4 × 10⁵ UFC cm⁻² e 4,7 × 10⁵ UFC cm⁻², respectivamente. Tré-Hardy et al. (2008) mostram que quanto mais rico o ambiente onde a *Pseudomonas aeruginosa* se desenvolve, mais rápida é a formação do biofilme. Como foi utilizado o leite desnatado nesse trabalho, sugere-se que suas características nutricionais influenciaram na rápida formação do biofilme.

As soluções detergentes-sanificantes reduziram a população bacteriana, resultando em menores valores de Log UFC cm⁻², em comparação ao biofilme maduro sem tratamento. A população microbiana do biofilme sem tratamento foi de 7,63 log UFC cm⁻². Comparando-se as concentrações de UFC cm⁻² obtidas nos cupons cujos tratamentos foram com solução detergente-sanificante de óleo essencial de capim-limão nas temperaturas de 25 e 40°C com a do biofilme maduro, observou-se que houve reduções, respectivamente, de 4,51 e 5,53 log UFC cm⁻² na população de *A. hydrophila*. O detergente-sanificante de óleo essencial de tomilho também promoveu redução do biofilme, sendo essa de 3,84 e 5,22 ciclos Log, às temperaturas de 25 e 40°C, respectivamente. No biofilme tratado apenas com a solução detergente, nas temperaturas de 25°C e 40°C, houve reduções de 2,38 e 4,52, respectivamente.

Apesar de ser considerado apenas agente detergente, a solução alcalina de NaOH a 1% (p/v) diminuiu a concentração de células do biofilme. Porém, nesse tratamento se obteve a maior percentagem de bactérias sobreviventes, 56,05%. Esse resultado mostra que a solução alcalina utilizada nesse trabalho também teve ação biocida.

Os compostos majoritários do capim-limão foram: neral (35%), geranial (47,03%) e mirceno (8,88%), já o óleo de tomilho foi constituído pelos compostos majoritários: 1,8 cineol (53,46). Os compostos majoritários encontrados no óleo de *C. citratus* utilizado, neral e geranial, são monoterpenos cuja ação antibacteriana é comprovada, entretanto o mirceno é um hidrocarboneto acíclico, que se polimeriza e resinifica-se, quando exposto à luz, não possuindo ação antibacteriana (Onawunmi et al, 1984). O 1,8 cineol, um monoterpenóide, composto encontrado como majoritário no óleo de tomilho utilizado, também tem atividade antibacteriana comprovada (Gilles et al, 2010).

Como o óleo essencial de *C. citratus* apresentou maior concentração de substâncias terpenóides sugere-se que esse fator contribuiu para a atuação biocida desse óleo essencial em menor concentração que a do óleo essencial de *T. vulgaris*. As atividades antibacterianas sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, foram mostradas por Pereira et al. (2008). Trabalhos com *T. vulgaris* mostraram atividade biocida sobre bactérias deterioradoras e patogênicas de alimentos, sendo

as Gram-negativas testadas, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*, mais sensíveis (Rota et al., 2008), assim neste estudo com *A. hydrophila*, Gram-negativa, os resultados obtidos são consistentes com os relatos da literatura.

Alguns trabalhos como o de Lebert et al. (2007) investigaram a eficiência de soluções de timol e eugenol e sanificante a base de sal de amônio quaternário, e de óleo essencial de *S. thymbra* sobre biofilme multiespécie formados por *Pseudomonas fragi* e *E. coli* e patogênicas formados por *S. aureus* e *L. monocytogenes*. O sal de amônio quaternário é um bactericida tradicional utilizado nas unidades de processamento de alimentos. Quando utilizado o óleo essencial de *S. thymbra* a 1% e 2%, houve redução das bactérias deterioradoras de 5,1 Log para *E. coli* e 5,2 para *L. monocytogenes*, mas, as bactérias patogênicas não foram reduzidas suficientemente: 1,3 log para *S. aureus* e 2,5 log para *L. monocytogenes*. Na combinação do composto de quaternário de amônio com timol e, ou eugenol, ocorreu redução na inibição do biofilme. De acordo com os autores, o timol não apresentou solubilidade no composto a base de sal de quaternário de amônio formando emulsão ao se promover a mistura dos compostos.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados demonstrados nessa pesquisa, o sanificante-detergente de capim-limão promoveu a redução de 1 ciclo log a mais do que aquela obtida com o tomilho. Tendo em vista as condições do meio, o microrganismo em questão e o seu tempo de geração, essa diferença é importante, pois poderá resultar na contaminação elevada de produtos e transmissão de doenças.

Portanto, pode-se dizer que as soluções detergentes sanificantes de *C. citratus* e *T. vulgaris* apresentaram boa capacidade redutora de biofilme formado por *A. hydrophila* a 40°C.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

Boari, C. A., Alves, M. P.; Reis, V. M.; Savian, T. V.; Piccoli, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, 886-895, 2009.

CARLSON, H. G.; MACHADO, R. A. F.; SPRICIGO, C. B.; PEREIRA, L. K.; BOLZAN, A. Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**. New York, v. 21, n. 1, p. 33-39, Sept. 2001.

CASTRO, D. P.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; SANTOS, N. M.; BALIZA, D. P. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lpdóptera: *Noctuidae*) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 27-32, 2006.

CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE, B.; TALON, R.; HÉBRAUD, M.; BERNARDI, T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 68, n. 3. 605-612, 2007.

COSTA, L. C. do B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W. PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 956-959, dez. 2005.

DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 165-180, Nov. 1987.

ESSAWI T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, 343-349, 2000.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B.; DIMAS FILHO, L. Caracterização da produção de capim-limão no estado do Paraná, Brasil, **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 4, 385-390, 2007.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. **Food Chemistry**, v. 119, 731–737, 2010.

JORDÁN, M. J.; MARTÍNEZ R. M.; GOODNER, K. L.; BALDWIN, E. A.; SOTOMAYOR, J. A. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. **Industrial Crops and Products**, v. 24, 253-263, 2006

LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology**, London, v. 24, p. 281-287, 2007.

ONAWUNMI, G. O.; YISAK, W.; OGUNLANA, E. O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. **Journam of Ethnopharmacology** 12, 279-286, 1984.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; RONALDO, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G.; SALGADO, A. P. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

Pin, C., Morales, P., Marjn, M.L.; Selgas, M.D.; Garcia M.L.; Casas, C.; Virulence Factors-Pathogenicity Relationships for *Aeromonas* Species from Clinical and Food Isolates **Folia Microbiol.** 42, 385-389, 1997.

PRIGENT-COMBARET, C.; LEJEUNE, P. Monitoring gene expression in biofilms. **Methods Enzymology**, New York, v. 310, 56-79, 1999.

ROTA, C. M.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R. M.; SOTOMAYOR, J. A. JORDÁN, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 7, p. 681–687, 2008.

SUÑEN, E.; ARISTIMUÑO, C.; FERNANDEZ-GALIAN, B. Activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout stored at 4 C. **Food Research International**, Barking, v. 36, n. 2, p. 111-116, 2003.

TRÉ-HARDY, M.; VANDERBIST, F.; TRAORE, H.; DEVLEESCHOUWER, M. J. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, 329–336, 2008.