

**Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em biofilmes formados por  
*Salmonella* spp.**

**Ana Carolina Avelar Rocha<sup>1</sup>; Alcilene de Abreu Pereira<sup>2</sup>; Roberta Hilsdorf Picoli<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Aluna do curso de Tecnologia em Alimentos e bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do IFMG campus Bambuí;

<sup>2</sup> Professor do IFMG campus- Bambuí

<sup>3</sup> Professor Titular do Depto. Ciência dos Alimentos – UFLA  
Bambuí – MG – Brasil

**RESUMO**

O presente experimento está sendo realizado no Departamento de Ciências Agrárias do IFMG - Campus Bambuí – Laboratório de Microbiologia de Alimentos, com o objetivo de avaliar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Origanum vulgare* (orégano) sobre biofilmes de *Salmonella enterica* Typhimurium e *Salmonella enterica* Enteritidis. Quando em biofilmes as bactérias podem desenvolver resistência aos agentes antimicrobianos, fato que se torna preocupante, uma vez que essas bactérias, ao se desprenderem dos biofilmes, podem migrar para os alimentos e chegarem aos seres humanos. Estudos mostraram que os desinfetantes utilizados atualmente na indústria de alimentos e na área da saúde não são eficientes em eliminar os biofilmes bacterianos. Assim, buscaram-se antimicrobianos alternativos àqueles já disponíveis no mercado e que garantam a inocuidade alimentar e a saúde do ser humano. Serão realizadas análises do efeito inibitório dos óleos essenciais por meio da determinação da concentração mínima inibitória (MIC), empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de microdiluição de 96 cavidades, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003). Posteriormente será avaliada a capacidade de formação de biofilme sobre superfície de poliestireno e para a realização dos ensaios de susceptibilidade aos óleos essenciais, 150 µL de TSB será depositado nas cavidades de uma microplaca de poliestireno. Todo procedimento será realizado em triplicata. Com os resultados obtidos nesse experimento espera-se determinar a ação detergente sanificante dos óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Salmonella* sp.

**Palavras-chave:** *Thymus vulgaris*; *Origanum vulgare*; sanificantes; detergente; alimentos.

**V Semana de Ciência e Tecnologia IFMG – campus Bambuí**  
**V Jornada Científica**  
**19 a 24 de dezembro de 2012.**

## **INTRODUÇÃO**

Para assegurar a qualidade dos alimentos e garantir a saúde da população, as indústrias utilizam cada vez mais agentes antimicrobianos, aumentando a chance do aparecimento de microrganismos resistentes a eles.

Biofilmes podem ser definidos como formas de existência microbiana estruturadas em comunidades embebidas em matrizes de substâncias poliméricas extracelulares e aderidas a superfícies bióticas ou abióticas (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007). Quando em biofilmes as bactérias podem desenvolver resistência aos agentes antimicrobianos por agregação das células sobre as superfícies devido à presença de genes que codificam a capacidade do microrganismo em produzir exopolissacarídeos (COSTERTON et al., 1987)

A formação de biofilmes produz um ambiente dinâmico, no qual células microbianas se encontram em estado de homeostase, organizadas de maneira a utilizar todos os nutrientes disponíveis (SUTHERLAND, 2001). Sua composição é dependente das condições do meio, como temperatura, substâncias envolvidas, pressão, pH e oxigênio dissolvido, não sendo necessariamente uniforme (WIMPENNEY et al., 1993; TOOLE et al., 2000).

A higienização, na indústria de alimentos, visa, basicamente, à preservação da pureza, à palatabilidade e à qualidade microbiológica dos alimentos, auxiliando na obtenção de produtos que possuam, além das qualidades nutricionais e sensoriais, boas condições higiênico-sanitárias, não oferecendo riscos à saúde do consumidor. O processo de higienização consiste num conjunto de práticas aplicado ao controle que elimine ou reduza esses perigos (SILVA, 1995).

Os microrganismos, quando em biofilme, têm sua fisiologia modificada, tornando-se mais resistentes aos agentes antimicrobianos, antibióticos e sanificantes, disponíveis no mercado (MAH; O'TOOLE, 2001). Assim, buscam-se antimicrobianos alternativos àqueles já disponíveis no mercado, pois o controle de biofilmes representa um dos mais persistentes desafios nos ambientes alimentares e industriais onde as comunidades microbianas são problemáticas.

As plantas, por meio de seu metabolismo secundário, produzem uma variedade de compostos com características antimicrobianas, antioxidantes, antimicrobianas, flavorizantes, aromáticas, anti-sépticas, carminativas, antiespasmódicas e expectorantes (POSER; MENTZ, 2004).

Os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) contêm, entre outros compostos, o timol e o carvacrol que são considerados potentes bactericidas e fungicidas reconhecidos cientificamente (BADI et al, 2004; LORENZINI; MATOS, 2002). Dessa forma, o emprego dos óleos essenciais é uma alternativa, pois apresentam elevada atividade antimicrobiana e em concentrações adequadas são considerados seguros.

## V Semana de Ciência e Tecnologia IFMG – *campus* Bambuí

### V Jornada Científica

19 a 24 de dezembro de 2012.

Dentre os microrganismos de interesse na indústria de alimentos destacam-se as bactérias do gênero *Salmonella*. Essas bactérias caracterizam-se por provocar contaminações devido às deficiências de saneamento básico e às más condições higiênico-sanitárias da maioria da população, aliadas ao precário controle de qualidade de algumas indústrias alimentícias e de abatedouros de aves (TUNON et al., 2008). São da família Enterobacteriaceae, gram-negativas em forma de bastonetes, aeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, catalase-positivas, oxidase-negativas e redutoras de nitratos a nitritos (JAY, 2005).

O objetivo desse trabalho será avaliar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare* sobre biofilmes de *Salmonella enterica* Typhimurium e *Salmonella enterica* Enteritidis.

## MATERIAL E MÉTODOS

A análise do efeito inibitório dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare* será realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal de Minas Gerais – Campus Bambuí e Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras. Os óleos essenciais serão adquiridos na FERQUIMA, Vargem Grande-SP e a identificação e a quantificação dos constituintes químicos será no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras. As bactérias utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram cedidas pela FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), Manguinhos-RJ. *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076. As culturas estoque estão mantidas congeladas, 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).

Para a reativação das células vegetativas das cepas, foram inoculados 10 µL de cada cultura em tubos contendo 3 mL de caldo TSB (Tryptone Soy Broth) e incubados, por 24 horas, a 37 °C.

Após a incubação, os inóculos foram retirados e transferidos para 200 mL de caldo TSB. O número de células por mL, de cada cultura, será quantificado utilizando-se curva analítica. As culturas bacterianas foram padronizadas para cerca de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

A concentração mínima inibitória dos óleos essenciais e de seus compostos será determinada empregando-se técnica de microdiluição em caldo, em placas de microdiluição de 96 cavidades, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003).

## V Semana de Ciência e Tecnologia IFMG – *campus* Bambuí

### V Jornada Científica

19 a 24 de dezembro de 2012.

Serão realizadas triplicatas e utilizados três controles para cada óleo essencial testado; sendo um controle negativo, contendo somente caldo TSB acrescido de Tween 80 e óleo essencial e; um controle positivo, contendo somente caldo TSB acrescido de Tween 80 e inóculo.

As placas de microdiluição serão, então, vedadas e incubadas a 37 °C por 24h. A leitura da absorbância dos poços será realizada após o período de incubação a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir completamente o crescimento de *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 nas cavidades de microdiluição, determinando-se, assim, a mínima concentração inibitória do óleo essencial.

Será avaliada a capacidade de formação de biofilme sobre superfície de poliestireno. Como substrato será utilizado Caldo Triptona de Soja (TSB). Serão utilizadas microplacas com 96 cavidades. O substrato será adicionado no volume de 150 µL por cavidade. Em seguida, 50 µL do inóculo bacteriano na concentração de, aproximadamente, 8 Log UFC.mL<sup>-1</sup> será depositado nas cavidades já contendo o substrato. O controle negativo de formação do biofilme será representado por cavidades contendo apenas 200 µL do substrato, sem a adição do inóculo bacteriano. A microplaca será incubada a 37 °C durante 48 horas. Após o período de incubação, os substratos contidos nas cavidades serão removidos cuidadosamente e estas serão lavadas três vezes com solução salina 0,85 % (v/v) para remoção das células não aderidas. Cristal violeta (0,1% p/v, em água destilada estéril) será adicionado no volume de 200 µL em cada cavidade já lavada, com o objetivo de corar as células sésseis presentes. Após 10 minutos, o cristal violeta será cuidadosamente retirado e as cavidades serão lavadas três vezes com solução salina. Os biofilmes, visíveis como anéis corados nas paredes das cavidades, serão desprendidos, após secagem das placas ao ar, pela adição de 200 µL de etanol 95% (v/v). Após 10 minutos, o conteúdo das cavidades será homogeneizado e removido para novas cavidades estéreis de uma nova microplaca. A quantidade de cristal violeta presente na fase líquida será avaliada medindo-se a absorbância a 620 nm em leitor de microplaca. Para determinar a capacidade de formação de biofilme, será utilizada a seguinte classificação: não formadora de biofilme ( $Doa \leq Docn$ ), fracamente formadora de biofilme ( $Docn < Doa \leq 2 \times Docn$ ), moderadamente formadora de biofilme ( $2 \times Docn < Doa \leq 4 \times Docn$ ) e fortemente formadora de biofilme ( $4 \times Docn < Doa$ ). Onde Doa é a densidade óptica do biofilme e Docn é a densidade óptica do controle de crescimento negativo. Os valores finais serão obtidos pelas médias aritméticas das absorbâncias lidas, sendo realizadas, pelo menos, 8 replicatas.

Para a realização dos ensaios de susceptibilidade aos óleos essenciais, 150 µL de TSB será depositado nas cavidades de uma microplaca de poliestireno. Os inóculos bacterianos (no volume de 50 µL e concentração de, aproximadamente, 8 Log UFC.mL<sup>-1</sup> serão depositados nas cavidades

## V Semana de Ciência e Tecnologia IFMG – *campus* Bambuí

### V Jornada Científica

19 a 24 de dezembro de 2012.

que já contém o substrato. A incubação será realizada a 37 °C durante 48 horas para permitir a formação do biofilme. O líquido presente nas cavidades será removido e estas serão lavadas três vezes com solução salina para remoção das células não aderidas. Os óleos essenciais serão adicionados as cavidades em diferentes concentrações. Para tanto, serão adicionados a tubos de ensaio contendo água destilada estéril acrescentada de 0,5% (v/v) de Tween 80 e homogeneizados por agitação vigorosa em vórtex durante 2 minutos. Desta forma, as seguintes concentrações serão obtidas: 0,00; 0,01; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50 e 1,00 (v/v). As soluções de óleos essenciais serão adicionadas no volume de 200 µL as cavidades. Após 20 minutos as soluções contendo os óleos essenciais serão removidas das cavidades que serão lavadas três vezes com solução salina. Em seguida, 200 µL de TSB serão adicionados às cavidades e a absorbância será lida a 620 nm antes do início da incubação (tempo zero) e após 24 horas de a 37 °C. A Concentração Mínima Inibitória do Biofilme (CMIB) será definida como a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir o crescimento bacteriano, o que caracterizará a inativação das células sésseis presentes no biofilme.

## RESULTADOS PRELIMINARES

Até o presente momento, foi realizada a padronização dos microrganismos por meio da Curva analítica (Figuras 1 e 2).

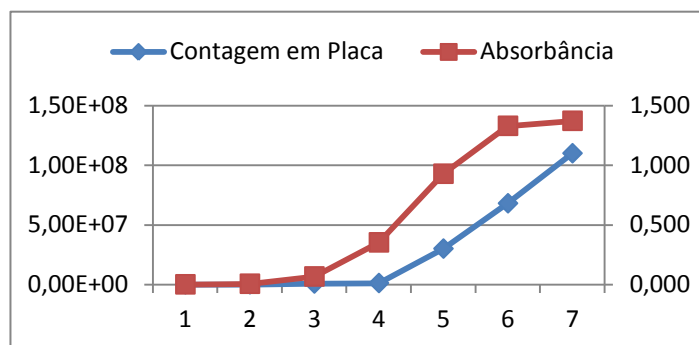


Figura 1 – Curva de crescimento *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Enteritidis.

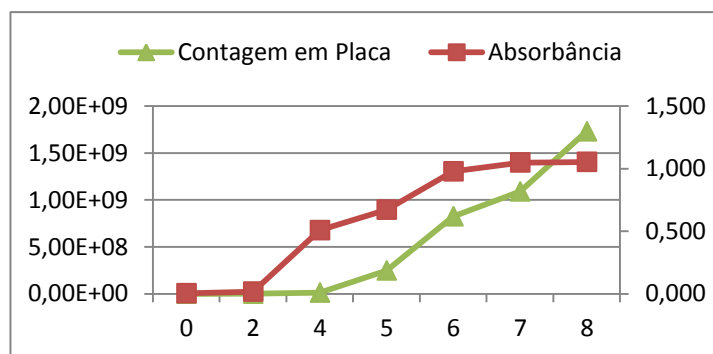


Figura 2 - Curva de crescimento *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Thyphimurium.

**V Semana de Ciência e Tecnologia IFMG – campus Bambuí**  
**V Jornada Científica**  
**19 a 24 de dezembro de 2012.**

A curva analítica das culturas bacterianas foram padronizadas para cerca de  $10^8$  UFC/mL. A cinética de crescimento foi semelhante para *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Thyphimurium e *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Enteritidis que atingiram a contagem de  $10^8$  UFC/mL após aproximadamente seis horas de incubação a 37° C.

As análises da concentração mínima inibitória (CMI) estão sendo realizadas e ainda não foram obtidos dados concretos para discussão. Após conclusão dos experimentos espera-se determinar a ação detergente sanificante dos óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Salmonella* sp.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao IFMG campus Bambuí pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica - PIBIC, para a execução do projeto.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BADI, H. N.; YAZDANI, D.; ALI, S. M.; NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products an internacional Journal**, vol. 19. p. 231-236, 2004.

CONSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.41, p. 435-464, Oct. 1987.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. Nova Odessa, SP, 2002, 512 p.

MAH, T.H.C.; TOOLE, G.A.O'. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiology**, Japan, v. 9, p. 34-38, 2001.

V Semana de Ciência e Tecnologia IFMG – *campus Bambuí*  
V Jornada Científica  
19 a 24 de dezembro de 2012.

NIKOLAEV, Y.A.; PLAKUNOV, V.K. Biofilm: “City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, London, v.76, n.2, p. 125-138, Apr.2007.

POSER, G.L. Von; MENTZ, L.A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2004, p. 467-495.

SILVA, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 4. Ed. São Paulo: Varela, 1995. 475p.

SUTHERLAND, I.W. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in microbiology**, London, v.9, n.5, p. 222-227, May. 2001.

TOOLE, G. O.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.54, p. 49-79, Oct. 2000.

TUNON, G.I.L.; NUNES, R. N.; SILVA, T.M.; CALASANS, M.W.M. Resistência antimicrobiana de Salmonella sp isolada de carne de frango resfriada comercializada em Aracaju, Sergipe. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.5, n.52, p.4-6, 2008.

WIMPENNEY, J.W.T.; PETERS, A.; SCOURFIELD, M.A. The physiology and biochemistry of biofilm. In: CHARACKLIS, W.G.; WILDERER, P.A. (Ed.) **Structure and function of biofilms**. Dahlem Workshop: J. Wiley and Sons, 1993. P. 11-127.