



INSTITUTO FEDERAL
MINAS GERAIS
Reitoria

Pró-Reitoria de Pesquisa, Inovação
e Pós-Graduação



SEMINÁRIO DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Resumo Expandido

Título da Pesquisa: Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em Biofilmes formados por <i>Salmonella</i> spp.		
Palavras-chave: <i>Thymus vulgaris</i> ; <i>Origanum vulgare</i> ; Sanitizante.		
Campus: Bambuí	Tipo de Bolsa: PIBIC	Financiador: IFMG
Bolsista (as): Ana Carolina Avelar Rocha		
Professor Orientador: Alcilene de Abreu Pereira		
Área de Conhecimento: Biologia		

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* e *Origanum vulgare* 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, buscam-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, identificação e a quantificação dos constituintes químicos por meio de cromatografia. As células vegetativas das cepas em caldo TSB (Tryptone Soy Broth) serão reativadas e incubadas, por 24 horas, a 37 °C. O número de células por mL, de cada cultura, será quantificado utilizando-se curva padrão. 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). Posteriormente será avaliada a capacidade de formação de biofilme sobre superfície de poliestireno e para a realização dos ensaios de susceptibilidade aos óleos essenciais e seus compostos, 150 µL de TSB será depositado nas cavidades de uma microplaca de poliestireno. Todo procedimento será realizado em triplicata

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. Quando em biofilmes as bactérias podem desenvolver resistência aos agentes antimicrobianos por mutação, aquisição de novas informações genéticas por transferência horizontal de genes e expressão de genes silenciosos, pois neste estado, além das alterações fenotípicas, as células ficam expostas a concentrações sub letais de desinfetantes nas etapas de higienização na indústria.

Biofilmes podem ser definidos como formas de existência microbiana espacialmente e metabolicamente estruturadas em comunidades embebidas em matrizes de substâncias poliméricas extracelulares (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007) e aderidas a superfícies bióticas ou abióticas (DUNNE JUNIOR, 2002; LASA et al., 2005). 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 constante exposição das bactérias em biofilme a concentrações sub letais de agentes detergentes/sanificantes durante os procedimentos de higienização pode ativar os mecanismos de resposta adaptativa ao estresse das bactérias fazendo com que essas sobrevivam em condições ambientais inóspitas. Esse fato é preocupante, pois essas bactérias, ao se desprenderem dos biofilmes, podem migrar para os alimentos e chegarem aos seres humanos.

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. Nas indústrias de alimentos, a higienização é dividida em duas etapas: limpeza e sanificação. A limpeza é responsável pela remoção de até 99,9% das partículas indesejáveis; o restante 0,01% inclui os microrganismos capazes de deteriorar os alimentos ou causar toxinfecções alimentares aos indivíduos que os ingerem (FUJIHARA; SYLVIO, 2003). Entretanto, após a limpeza, o número de microrganismos sobreviventes ainda é elevado, o que torna a sanificação procedimento obrigatório. Os agentes sanificantes físicos ou químicos devem eliminar as bactérias patogênicas e reduzir o número de microrganismos deteriorantes em níveis aceitáveis

Estudos mostram que os desinfetantes utilizados atualmente na indústria de alimentos e na área da saúde não são eficientes em eliminar os biofilmes bacterianos. Observa-se que os microrganismos, quando em biofilme, têm sua fisiologia modificada, tornando-se mais resistentes aos agentes antimicrobianos, antibióticos e sanificantes, disponíveis no mercado. Assim, buscam-se antimicrobianos alternativos àqueles já disponíveis no mercado.

O controle de biofilmes representa um dos mais persistentes desafios nos ambientes alimentares e industriais onde as comunidades microbianas são problemáticas. Os biofilmes na indústria de alimentos podem ser eliminados através da adoção de diferentes estratégias, incluindo métodos físicos e químicos. Além disso, os meios biológicos tem sido a nova dimensão, nos últimos anos para o biocontrole de biofilmes bacterianos (KUMAR, 1998).

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. Assim, o emprego dos óleos essenciais é uma alternativa, pois apresentam elevada atividade antimicrobiana e em concentrações adequadas são considerados seguros.

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. Possuem capacidade de se desenvolver em temperaturas que variam de 5,3 a 45°C, pH entre 6,6 a 8,2 e atividade de água de 0,94 (JAY, 2005).

Dessa forma, a importância de biofilmes microbianos, tanto na área médica quanto na área industrial envolvendo a qualidade dos alimentos, é indiscutível, sendo essa demonstrada por vários estudos já publicados que relatam as graves conseqüências causadas pela presença de biofilmes microbianos, em diferentes superfícies, à saúde pública. Representando assim, o controle de biofilmes um dos mais persistentes desafios nos ambientes hospitalares e indústrias alimentícias onde as comunidades microbianas são problemáticas buscando-se cada vez mais agentes sanitizantes alternativos e eficazes.

METODOLOGIA

A análise do efeito inibitório dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare* está sendo 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. A identificação e a quantificação dos constituintes químicos será no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM), utilizando o aparelho Shimadzu modelo CG-17A, com detector seletivo de massa modelo QP 5000.

As bactérias utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram cedidas pela FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). *Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Typhimurium* ATCC 14028 e *Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Enteritidis* ATCC 13076. As culturas estoque estão mantidas sob congelamento, 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 padrão. As culturas bacterianas serão padronizadas para cerca de 10⁸ 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). Para tanto, 100 µL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de 0,5% de Tween 80 serão adicionados em cada cavidade da placa de microdiluição. Em seguida, 100 µL de óleo essencial será acrescido as cavidades correspondentes a coluna 1 e linha A, transferido-se 100 µL para a linha seguinte após a homogeneização e assim sucessivamente, desprezando-se os 100 µL finais, obtendo-se, assim, concentrações finais do óleo essencial variando de 3,9 µL.mL⁻¹ a 500 µL.mL⁻¹. As suspensões bacterianas previamente padronizadas serão inoculadas nas cavidades. Serão realizadas triplicatas e utilizados três controles para cada óleo essencial testado; sendo dois controles negativos, um com cavidades contendo somente caldo BHI acrescido de Tween 80 e óleo essencial ou seus compostos e outro com cavidades contendo caldo BHI, Tween 80, inóculo e Clorhexidina a 0,012% e; um controle positivo, contendo somente caldo BHI 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 entérica subsp. Entérica serovar Typhimurium* ATCC 14028 e *Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Enteritidis* ATCC 13076 nas cavidades de

microdiluição, determinando-se, assim, a mínima concentração inibitória do óleo essencial ou composto testado em $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$.

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^{-1} 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 600 nm em leitor de microplaca. Para determinar a capacidade de formação de biofilme, será utilizada a seguinte classificação: não formadora de biofilme ($\text{Doa} \leq \text{Docn}$), fracamente formadora de biofilme ($\text{Docn} < \text{Doa} \leq 2 \times \text{Docn}$), moderadamente formadora de biofilme ($2 \times \text{Docn} < \text{Doa} \leq 4 \times \text{Docn}$) e fortemente formadora de biofilme ($4 \times \text{Docn} < \text{Doa}$). 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 e seus compostos, 150 μL de TSB será depositado nas cavidades de uma microplaca de poliestireno. Os inóculos bacterianos (*Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Typhimurium* ATCC 14028 e *Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Enteritidis* ATCC 13076) no volume de 50 μL e concentração de, aproximadamente, 8 Log UFC. mL^{-1} serão depositado nas cavidades 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; 1,00 e 2,00% (v/v). As soluções de óleos essenciais serão adicionadas no volume de 200 μL as cavidades. Para cada concentração serão feitas triplicatas. 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 600 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.

Para os ensaios envolvendo a formação de biofilmes serão utilizados cupons de prova feitos em aço inoxidável (de dimensões 1 x 8 x 18 mm). Os cupons serão imersos em solução comercial de ácido peracético 0,3% por 30 min. sobre agitação de 50 rpm a 50 °C. Em seguida serão rinsados por imersão em água destilada estéril a temperatura de 80 °C por 5 min e a temperatura ambiente por 1 min, sobre agitação de 50 rpm. Os cupons serão secos em estufa de secagem a 40 °C por 2 horas e autoclavados por 15 min. a 115 °C (OULAHAL et al., 2007). Em duas placas de Petri de 140 mm de dimensão, contendo aproximadamente 45 cupons, serão imersos 60 mL de leite desnatado e inoculados 10^8 UFC/mL de cada cultura. *Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Typhimurium* ATCC 14028 e *Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Enteritidis* ATCC 13076, serão incubadas a 37°C, sob agitação branda (50 rpm). Na análise de biotransferência serão retirados 1 mL do leite, em seguida realizadas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL serão tomadas e o número de células viáveis determinadas em TSA, empregando-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas serão incubadas a 37°C ou 28°C por, aproximadamente, 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas, expresso em UFC/mL. Em intervalos de 48 horas, os cupons serão removidos, lavados com água peptonada por cinco vezes e imersos em leite desnatado AUT adicionado na placa. Esse procedimento será realizado por cinco vezes, visando à formação completa do biofilme após 10 dias de incubação. Todo o experimento será realizado em três repetições e as análises em triplicata. Para enumerar as células aderidas, a cada dois dias de incubação será retirado um cupom de cada placa de Petri. Estes serão lavados com água peptonada por 5x, para a eliminação de células não aderidas e o biofilme será removido utilizando-se *swab* padronizado esterilizado. Os *swabs* serão transferidos para tubos contendo água peptonada 0,1% (v/v), sendo, em seguida, agitados em vórtex, por 2 minutos. Após esse procedimento, promoverá diluição seriada, onde alíquotas de 0,1 mL serão tomadas e o número de células viáveis determinadas em TSA, empregando-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas serão incubadas, a 37 °C, por, aproximadamente, 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas, expressa em UFC/cm². Todo o procedimento será realizado em triplicata. No teste de sensibilidade das células aderidas, serão utilizados óleos essenciais de *Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Typhimurium* ATCC 14028 e *Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Enteritidis* ATCC 13076 em combinação com hipoclorito de sódio, nas melhores concentrações inibitórias definidas pelo método de microdiluição. No décimo dia de cultivo serão retirados 9 cupons de cada placa de Petri, lavados em água peptonada 0,1% (v/v) por 5 vezes, para eliminação de células não aderidas, e imersos nas soluções contendo os óleos essenciais, compostos majoritários e soluções detergentes sanificantes, nos tempos de 15, 30 e 60 minutos a temperatura ambiente. Após a sanificação será realizado um esfregaço sobre o cupom sanificado com auxílio de um *swab* padronizado esterilizado. Os *swabs* serão transferidos para tubos contendo água peptonada 0,1% (v/v), sendo, em seguida, agitados em vórtex, por 2 minutos. Após esse procedimento, promoverá diluição seriada, alíquotas de 0,1 mL serão tomadas e o número de células viáveis determinadas em TSA, empregando-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas serão incubadas, a 37 °C, por, aproximadamente, 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas, expressa em UFC/cm² (Joseph et al., 2001) adaptado. Todo procedimento será realizado em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O projeto iniciou-se em maio de 2012, portanto, até o presente momento foram realizados os procedimentos de padronização da cepa por meio da construção da curva padrão para quantificação do número de células por mL, de cada cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DUNNE JUNIOR, W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.15, n.2, p. 155-166, Apr. 2002.

FUJIHARA, R.M.; SYLVIO, S.B. Limpeza e desinfecção de plantas de processamento. In: CONTRERAS, C.C.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K.M.V.A.B.; MIYAGUSKU, L. (Ed.) **Higiene e sanitização na indústria de carne e derivados**. São Paulo: Varela, 2003. P. 7-16.

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

JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 367-372, Mar. 2001.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 42, n. ½, p. 9-27, June 1998.

LASA, I.; POZO, J.L. del; PENADÉS, J.R.; LEIVA, J. Bacterial biofilms and infection. **Anales Del Sistema Sanitario de Navarra**, Pamplona, v.28, n.2, p. 163-175, 2005.

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.

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.