



## ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon flexuosos* E HIPOCLORITO DE SÓDIO FRENTE A *Listeria monocytogenes*

Taciara do Amaral PENNO<sup>1</sup>; Naiara Carla ZANFERARI<sup>1</sup>; Ana Júlia Longo NEIS<sup>2</sup>; Anildo CUNHA JUNIOR<sup>3</sup>; Alessandra Farias MILLEZI<sup>4</sup>

1- Discente do curso Engenharia de Alimentos, Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia, Bolsista PIBIT/CNPq – CEP: 89700-000 – Concórdia – SC – Brasil. Telefone: (49) 99122-9206 – e-mail: ([pennotaci@gmail.com](mailto:pennotaci@gmail.com)).

2- Discente do Técnico em Alimentos integrado ao Ensino Médio, Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia, Bolsista PIBIT/CNPq – CEP: 89700-000 – Concórdia – SC – Brasil. Telefone: (49) 99934-6379 – e-mail: ([anajulianeis@gmail.com](mailto:anajulianeis@gmail.com)).

3- Analista, Embrapa Suínos e Aves - CEP: 89715-899 – Concórdia – SC – Brasil. Telefone: (49) 3441-0400-e-mail: ([anildo.cunha@embrapa.br](mailto:anildo.cunha@embrapa.br))

4-Orientadora, Docente do curso de Agronomia, Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia – CEP: 89700-000 – Concórdia – SC – Brasil. Telefone: (49) 99803-9600 – e-mail: ([alessandra.millezi@ifc-concordia.edu.br](mailto:alessandra.millezi@ifc-concordia.edu.br)).

### RESUMO

Biofilme é comunidade de células microbianas envolvida por substâncias extracelulares *Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogênica formadora de biofilme que pode ser encontrada em alimentos, sendo grande problema na indústria de carnes. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antibiofilme do óleo essencial (OE) de *C. flexuosos* e hipoclorito de sódio. Foram realizadas as análises de CFU, MTT e CV. *L. monocytogenes* foi inibida pelo OE e pelo hipoclorito de sódio, na análise de CV, não foi possível verificar redução significativa de biomassa. Conclui-se que a bactéria é sensível ao OE e ao hipoclorito de sódio.

### INTRODUÇÃO

Biofilme pode ser definido como um consórcio funcional de microrganismos que foram aderidos a uma superfície e onde ocorre sua incorporação nas substâncias poliméricas produzidas pelos microorganismos (KUMAR, 1998). Em indústrias de alimentos, biofilmes podem ser benéficos, em alguns casos (MACÊDO, 2000), mas também podem causar sérios problemas quando formados em superfícies (MILLEZI et al. 2012). Por exemplo, em estações de tratamento de água ou efluentes, produção de vinagre, produção de ácido cítrico, além de aplicações farmacêuticas através de produção de metabólitos secundários (XAVIER, 2008). Em outros casos, micro-organismos patogênicos podem se aderir e crescer em superfícies alimentares e nos ambientes de processamento, podendo assim ocorrer uma contaminação cruzada, a qual pode ser causada após o processamento (MILLEZI et al. 2012).

*Cymbopogon flexuosos* é uma planta conhecida como capim-limão, pertence à família *Poaceae* (*Gramineae*), há também o *Cymbopogon citratus*, que é conhecido por capim-limão, assim como o *Cymbopogon flexuosos*. As plantas são do mesmo gênero e apresentam características muito semelhantes devido a isso. Os chás das folhas de ambas as espécies são utilizados como calmante na medicina tradicional (SILVA, 2010).

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogênica que pode ser encontrada em alimentos, tais como o

leite cru ou pasteurizado, carnes de gado, aves, peixes, suínas, e seus derivados, produtos de origem vegetal, marinha e refeições prontas. Esta bactéria é um grande problema na indústria de carnes, pois consegue se desenvolver em baixas temperaturas e suporta níveis recomendados de nitrato de sódio e cloreto de sódio (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

Esse trabalho tem por finalidade avaliar a ação antibiofilme do óleo essencial (OE) *C. flexuosos* e do hipoclorito de sódio, para evitar o desenvolvimento de biofilmes simples formados pela bactéria patogênica *L. monocytogenes*.

## METODOLOGIA

A cromatografia do OE foi realizada na Embrapa – Suínos e Aves, Concórdia, através da Cromatografia gasosa acoplada em espectrômetro de massa. As análises microbiológicas desse experimento foram realizadas no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal Catarinense – Câmpus Concórdia. Foi utilizada a bactéria de *L. monocytogenes*, para a padronização do inóculo foi realizada a leitura em ELISA com absorvância de 630nm e depois o cálculo baseado na curva de crescimento da bactéria para obter  $2 \cdot 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Inoculou-se 100 µL da bactéria e 100 µL da solução com o OE juntamente, sendo testadas três concentrações 0,39%, 0,78% e 1,56%. Também foi realizado mesmo procedimento para hipoclorito de sódio 2%, para controle positivo foi inoculado somente o inóculo padrão, 200 µL, incubou-se a 35°C por 24 horas com 80 rotações por minuto em Shaker orbital (Tecnal, Brasil).

Para a análise de quantificação de biomassa, após a 24 horas, lavou-se a placa com água destilada estéril, a placa foi seca próximo à chama, adicionou-se metanol em todos os poços que haviam sido inoculados, deixou-se agir por 15 minutos, adicionou-se cristal violeta deixando agir por 5 minutos, passado esse tempo, lavou-se a placa em água corrente, secou-se a placa novamente e foi adicionado ácido acético 33% nos poços e leitura da placa em espectrofotômetro Elisa (Biotek, USA) a 630 nm (Stepanovic, et al 2000).

Para a análise de atividade metabólica, após 24 horas, lavou-se a placa com água destilada estéril, secou-se perto da chama, e adicionou-se a solução de MTT nos poços que haviam sido inoculados, e mais três poços extras, para serem obtidos os resultados sem interferência da solução de MTT na leitura. Incubou-se por 2 horas e 30 minutos em over night a 37°C. Fez-se a leitura da placa em Elisa, a 630 nm (Freimoser et al. com modificações 1999).

Para a análise de quantificação de células viáveis, após a incubação no Shaker, a placa foi lavada com água destilada estéril, secou-se próximo à chama, adicionou-se água destilada

estéril, seguindo assim para o banho-maria de ultrassonografia, permanecendo por seis minutos. Após transferiu-se 100 µl da água destilada contida no poço para um microtubo contendo 900 µL de água destilada esterilizada. Foram realizadas as diluições até 10<sup>-6</sup>. Inoculou-se em triplicata, pelo método de microgota. As placas foram incubadas a 36°C por 24 horas, fez-se esse procedimento para todos os poços da placa. Após o tempo de incubação realizou-se a contagem das colônias (MILLEZI et al., 2012).

Para análise dos resultados aplicou-se o teste de ANOVA pelo método de Bonferroni: Compare Select Pairs of Columns, tendo 99% como nível de significância, assim gerando assim gráficos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à constituição química do OE de *C. flexuosos*, os componentes majoritários foram geranial (41,8%), neral (33,25%) e geranil acetato (4,23%). As figuras 1A e 1B apresentam os resultados obtidos para a análise de CV, a qual determina a quantificação de biomassa do biofilme. Pode-se observar que tanto hipoclorito de sódio quanto o OE não reduziram significativamente a quantidade de biomassa, porém essa biomassa pode ser composta de células não viáveis.

Figura 1 - A: Resultado da quantificação de biomassa utilizando óleo essencial *C. flexuosos*; B: Resultado da análise de quantificação de biomassa, utilizando hipoclorito de sódio.

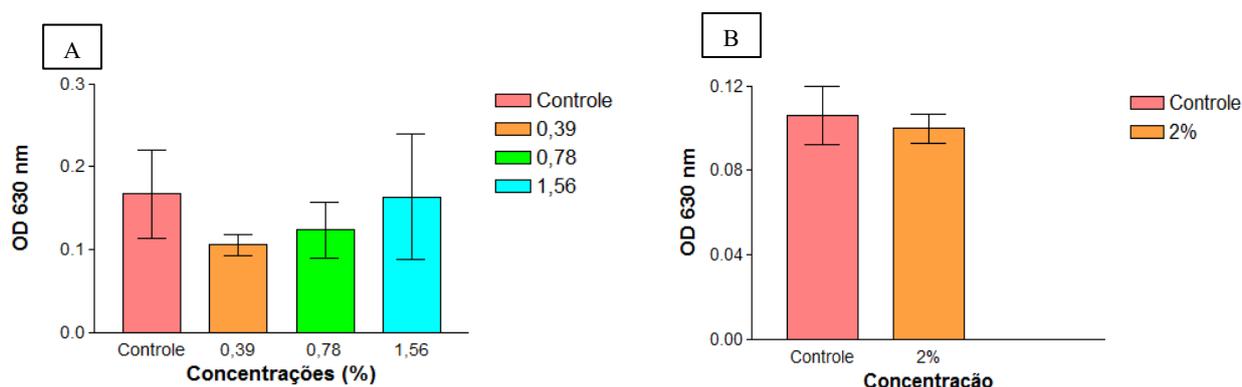
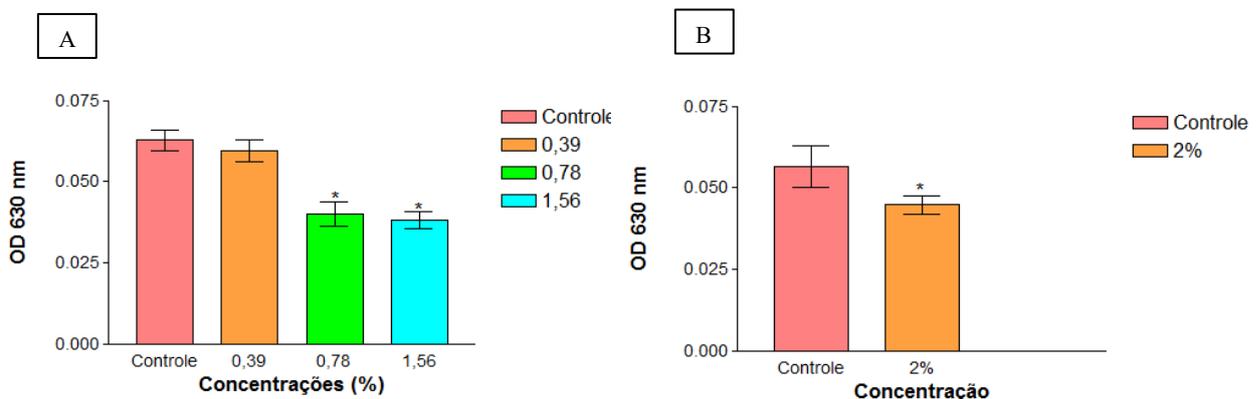
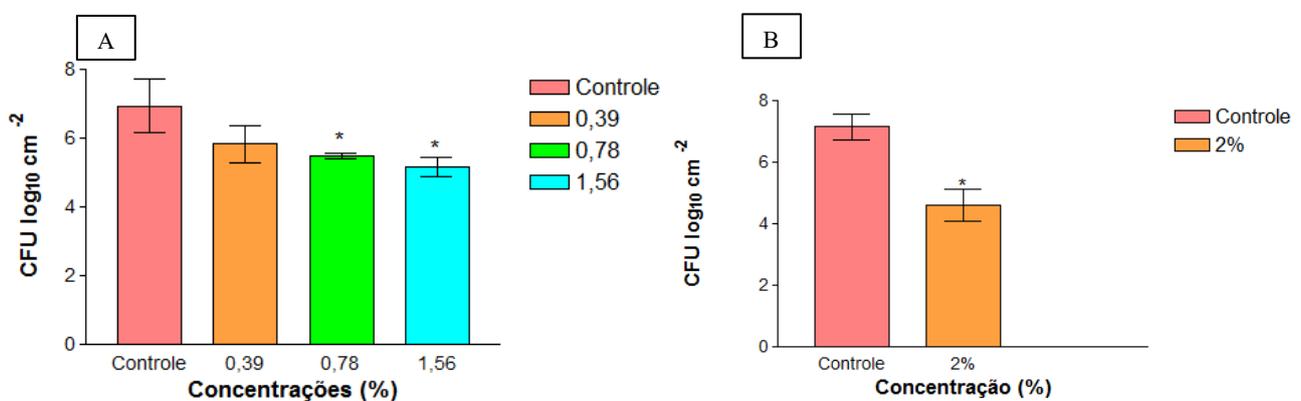


Figura 2 – A: Resultado da análise atividade metabólica utilizando OE *C. flexusosos*; B: Resultado da análise de atividade metabólica, utilizando hipoclorito de sódio 2%.



As figuras 2A e 2B apresentam os resultados obtidos para a análise de MTT, a qual determina a atividade metabólica do biofilme. Pode-se observar boa redução da atividade metabólica, no tratamento com OE nas concentrações 0,75% e 1,56% e no tratamento com hipoclorito de sódio, por meio de análise estatística essa redução foi significativa ( $P < 0,05$ ).

Figura 3 – A: Resultado da análise de CFU, utilizando óleo essencial *C. flexusosos*; B: Resultado da análise de CFU, utilizando hipoclorito de sódio.



As figuras 3A e B apresentam os resultados obtidos para a análise de CFU, a qual determina a quantidade de células viáveis do biofilme. Pode-se observar efetiva redução de células viáveis, no tratamento com OE nas concentrações 0,78% e 1,56% e no tratamento com hipoclorito de sódio, sendo essa redução significativa ( $P < 0,05$ ).

## CONCLUSÃO

Foram obtidos resultados satisfatórios, mostrando assim que o OE e o hipoclorito de sódio 2% são capazes de evitar o desenvolvimento de biofilmes, concluindo-se que há eficiência na função de antibiofilme.

## REFERÊNCIAS

- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2006.
- FREIMOSER, F. M.; JAKOB, C. A.; AEBI, M.; TUOR, U. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and environmental Microbiology*, v. 65, n. 8, p.3727- 3729, 1999.
- KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 42, p 9-27, 1998.
- MACÊDO, J. A. B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica. *Revista Fármacos & Medicamentos*, v.2, n.7, Nov/Dez. p 19-24, 2000.
- MILLEZI, F. M.; et al. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. *Journal of Food Safety*, 32, p 351-359, 2012.
- SILVA, A. F.; SANTOS, A. P.; RABELO, M. F. R. Identificação botânica das plantas medicinais. *Plantas medicinais e aromáticas*. Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 77-xx, Mar/Abr, 2010.
- STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAVIC, I., SAVIC', B. and SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microb.Meth.* 40, 175–179, 2000.
- XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOODRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*. V.3, p. 2-13, 2008.
- Agradecimentos:** Ao Instituto Federal Catarinense, Embrapa Suínos e Aves, CNPq e Profª Drª Sheila Mello da Silveira, Coordenadora do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do IFC Campus Concórdia.