

Óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia origanoides* Kunth) no controle de *Pseudomonas* spp. aderidas em superfície de aço inoxidável

GOMES, E.R.¹; CARELI, R.T.¹; ALMEIDA, K.V.¹; GUIMARÃES, A.D.B.¹; ANTUNES, A.L.M.¹; ALMEIDA, A.C.¹; MARTINS, E.R.¹, DUARTE, E.R.¹

¹Universidade Federal de Minas Gerais. Montes Claros, MG. *E-mail: elisangelaramieres@yahoo.com.br

RESUMO: Objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) de alecrim pimenta sobre células de *Pseudomonas* aderidas por 48 h em superfície de aço inoxidável AISI 304 # 4 na presença de leite desnatado. Na análise cromatográfica foram detectados compostos com ação antimicrobiana como carvacrol (31 %) e timol (2,8 %). Foram utilizadas a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e a *Pseudomonas* sp., isolada de leite cru, para determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), potencial de biotransferência, adesão e a ação sanitizante do OE. Para as duas estirpes utilizadas, a CIM foi de 240 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ e não foi possível encontrar CBM dentre as concentrações testadas. O potencial de biotransferência atingiu valores de 8,16 e 8,05 $\log \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ e contagens de células aderidas ao aço inoxidável de 3,84 e 3,24 $\log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$ para as estirpes padrão e isolada, respectivamente. Após o tratamento sanitizante com solução do OE a 240 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 2 e 20 min observou-se a eliminação de todas as células presentes nas superfícies de contato nos dois tempos testados. Observou-se que a matéria orgânica interfere na ação do OE, necessitando de um maior tempo de exposição das células para obter o efeito bactericida. Apesar disso, o OE foi capaz de inibir o crescimento bacteriano após 10 e 20 min de contato com as estirpes isoladas e padrão, respectivamente. Portanto, constatou-se eficiência do OE de alecrim pimenta no controle da adesão de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável, material utilizado em equipamentos de ordenha.

Palavras-chave: adesão bacteriana, leite, sanitizante, antimicrobiano

ABSTRACT: Essential oil of rosemary pepper (*Lippia origanoides* Kunth) in the control of *Pseudomonas* spp. adhered in stainless steel surface. The experiment was carried out to evaluate the antimicrobial activity of essential oil (EO) extracted from rosemary pepper (*Lippia origanoides* Kunth) on *Pseudomonas* cells adhered for 48 h on stainless steel AISI 304 # 4 in the presence of skimmed milk. In the chromatography were detected compounds with antimicrobial action as carvacrol (31%) and thymol (2.8%). In order to determinate the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), potential of transfer, adhesion and sanitizing action of the EO the strain *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Pseudomonas* sp. isolated from raw milk were used. To both strains used, the MIC was 240 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ and it was not possible to determinate the MBC with the levels tested. The potential of transfer reached values between 8.16 and 8.05 $\log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$ and counting of cells adhered to the stainless steel of 3.84 and 3.24 $\log \text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$ to the standard and isolated strains, respectively. After the sanitizing treatment with 240 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ of EO during 2 and 20 min it was observed the complete elimination of the microbial cell present on the contact surfaces. It was possible to observe that the organic matter interferes in the EO action, demanding higher exposure time to obtain bactericide effect. Besides that, the EO was able to inhibit the bacterial growth after 10 and 20 min of contact with the isolated and standard strains, respectively. Thus, the present study showed that EO of rosemary pepper is efficient in the control of adhesion of *Pseudomonas* in stainless steel surfaces, material used in milking equipment.

Keywords: bacterial adhesion, milk, sanitizing, antimicrobial

INTRODUÇÃO

A resistência de micro-organismos patogênicos a diversas drogas tem aumentado devido ao uso descontrolado de antibióticos habitualmente usados no tratamento de doenças infecciosas. Diante dessa situação fontes alternativas vêm sendo investigadas (Silva *et al.*, 2009).

Plantas medicinais são notórias devido à presença de substâncias produzidas em decorrência do seu metabolismo secundário. Essas substâncias conferem aos óleos essenciais e extratos propriedades antimicrobianas, que são reconhecidas há séculos e comprovadas cientificamente nos últimos anos (Duarte, 2006).

A *Lippia origanoides* (Verbenaceae) (KUNTH, 1817), popularmente conhecida como alecrim pimenta, é um arbusto encontrado em várias regiões do Brasil. A exemplo de outras plantas do gênero, *L. origanoides* é uma planta aromática, de uso medicinal popular, usada principalmente como antisséptico (Costa *et al.*, 2002). Do alecrim pimenta é extraído o óleo essencial, que é rico em timol, carvacrol e outros compostos, que lhe confere ação antimicrobiana (Silva *et al.*, 2009).

O óleo essencial produzido a partir das folhas do alecrim pimenta é rico em compostos antimicrobianos como o timol, responsável pelo cheiro característico, além do carvacrol, p-cimeno, o-terpineno e o-cariofileno, compostos estes que conferem ao óleo essencial propriedades bactericida, fungicida, moluscida e larvicida (Leal *et al.*, 2003; Oliveira, 2008).

Os alimentos podem ser considerados veículos de disseminação de micro-organismos, os quais podem ser responsáveis pela diminuição da vida de prateleira desses produtos. Dentre os micro-organismos causadores de doenças e problemas de deterioração de alimentos destaca-se o gênero *Pseudomonas* spp. As espécies pertencentes a esse gênero caracterizam-se por serem bastonetes Gram-negativos, ubíquos, de vida livre, encontrados em ambientes úmidos como água, solo, plantas, detritos e no leite (Torres *et al.*, 2006).

Ultimamente, tem-se observado o aumento da demanda de consumidores de produtos seguros, naturais e isentos de conservantes químicos, levando a indústria a investigar elementos capazes de conservar e melhorar as características sensoriais, mantendo as propriedades nutricionais dos alimentos (Rajkovic *et al.*, 2010). Dessa forma, o uso de óleo essencial de alecrim pimenta pode ser uma alternativa natural de controle do crescimento de micro-organismos dentre eles o gênero *Pseudomonas*.

Neste contexto, avaliou-se a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim pimenta frente às células aderidas de estirpes de

Pseudomonas spp. em superfícies de aço inoxidável AISI 304 # 4 para uso na cadeia produtiva de leite bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae), espécie conhecida como alecrim pimenta, foram coletadas nos meses de dezembro e janeiro, na área de reserva do Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), campus Montes Claros, MG (coordenadas 16°40'51,5"S e 43°50'32,1"W, altitude de 640 m), cuja exsicata está no Herbário PAMG, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, sob registro 56526. O óleo essencial desta planta foi extraído pela técnica de hidrodestilação de folhas frescas em aparelho Clevenger (Fisatom®, Brasil), conforme metodologia proposta por Ming *et al.* (1998).

A amostra de óleo essencial de alecrim pimenta (0,0011 g) foi pesada utilizando balança analítica da Shimadzu (Kyoto, Japão) e diluída em 1,0 mL de diclorometano para análise cromatográfica. A amostra diluída foi transferida para vial de 2 mL e injetada em equipamento de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS).

As análises dos compostos presentes no óleo essencial de alecrim pimenta foram realizadas em cromatógrafo a gás (GC 7890A; Agilent Technologies) equipado com detector de espectrômetro de massa com impacto de elétrons (MS 5975C) e coluna capilar HP-5 MS (Agilent Technologies) com fase estacionária 5 % fenil e 95 % metilpolisiloxano (30 m comprimento x 250 µm diâmetro interno x 0,25 µm espessura do filme). O hélio (99,9999 % de pureza) foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 1 mL·min⁻¹. O injetor *split/splitless* foi mantido a 220°C. A coluna cromatográfica inicialmente a 50°C foi aquecida a uma taxa de 3°C min⁻¹ até 240°C e permaneceu por 1 min a 300°C (*post run*). A temperatura da interface das massas foi mantida em 240°C. Utilizando um autoinjeter (Combi PAL), 1 µL da amostra foi injetada no cromatógrafo com divisão de fluxo de 1:10 (*split*). A análise foi feita com o detector operando no modo *scan* na faixa de 29 a 550 (m/z).

Foram avaliadas duas estirpes bacterianas pertencentes à bacterioteca do laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais: isolado *Pseudomonas* sp., proveniente de leite bovino estocado no tanque de expansão da Fazenda Experimental do IC, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Para a avaliação dos efeitos bacteriostático e bactericida do OE frente às estirpes, foram realizados

os testes de determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e de Concentração Bactericida Mínima (CBM). A determinação da CIM do OE de alecrim pimenta foi realizada utilizando-se o método de macrodiluição em caldo (NCCLS, 2003) nas concentrações de 7,5; 15; 30; 60; 120; 240 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para a determinação da CBM, uma alçada das suspensões dos tubos que não apresentaram turvação foi transferida para placas contendo Ágar Tripton Soja (TSA), as quais foram incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h para observação de crescimento microbiano (NCCLS, 2003).

Para o estudo de adesão bacteriana culturas ativas das estirpes foram centrifugadas a $9000 \times g$ por 10 min e os *pellets* foram lavados com solução de cloreto de sódio a 0,85 %. As suspensões bacterianas foram preparadas por ressuspensão dos *pellets* em água peptonada a 0,1 % e inoculada em *Erlenmeyers* com 99 mL de leite desnatado esterilizado de modo a obter uma concentração celular de $10^5 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, para cada sistema experimental. Em cada *Erlenmeyer* foram adicionados três cupons de aço inoxidável AISI 304 # 4 com dimensões de 2 cm x 2 cm x 0,1 cm, previamente higienizados e esterilizados de acordo com Rossoni & Gaylarde (2000). A superfície de aço inoxidável AISI 304 # 4 foi escolhida por ser a mais empregada em tanques de expansão de leite (Hood & Zottola, 1997).

Esse sistema experimental foi mantido sob agitação constante em mesa agitadora orbital a 60 r.p.m. de modo a simular a agitação do leite no tanque de expansão. Os cupons foram *rinsados* com água destilada e transferidos para uma nova amostra de leite desnatado esterilizado sem inoculação após 24 h de condução do sistema experimental. Esse novo sistema foi mantido sob agitação de 60 r.p.m. por mais 24 h, totalizando 48 h de adesão bacteriana. Esse período foi dimensionado com base na legislação vigente para qualidade do leite cru, que estabelece como tempo máximo entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento onde será processado (Brasil, 2011). Para avaliação do potencial de biotransferência das células aderidas aos cupons para o leite desnatado sem inoculação, alíquotas de 1000 μL foram retiradas e submetidas a diluições decimais seriadas sucessivas seguidas de plaqueamento em Ágar Cetrimide a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h (Boari *et al.*, 2009), com adaptações.

Para quantificação das células bacterianas aderidas, os cupons foram retirados, *rinsados* por 1 min em 10 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85 % para retirada de células planctônicas, transferidos para 10 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85 % e submetidos a ultrassom por 2 min para despreendimento das células sésseis. Realizaram-se diluições decimais de cada amostra,

com plaqueamento em Ágar Cetrimide a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h, e os resultados foram expressos em $\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Para testar a sensibilidade das células aderidas frente à solução de OE, os cupons foram submetidos à *rinsagem* com solução de cloreto de sódio a 0,85 %. Em seguida, foram transferidos para a solução sanitizante, composto por OE, *Tween* 80 e água destilada esterilizada, nas concentrações inibitórias mínimas encontradas em testes anteriores para cada estirpe de *Pseudomonas*. A solução testada como controle foi formulada com os mesmos componentes da solução de OE, no entanto, sem a presença deste. Os tempos de contato dos tratamentos com OE e controle foram de 2 e 20 min, e esse tempo foi dimensionado com base no tempo de higienização de superfícies e utensílios utilizados nas indústrias de alimentos. Para a quantificação das células bacterianas após o contato com as soluções de OE, foram realizados os procedimentos para a retirada de células aderidas descritos por Careli *et al.* (2009) e os resultados foram expressos em $\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$.

O teste de suspensão foi realizado para avaliar a possível interferência da matéria orgânica sobre a eficiência antimicrobiana do OE frente às estirpes de *Pseudomonas*. Uma alíquota de 0,1 mL da suspensão ativa de *Pseudomonas* em fase *log* de crescimento foi inoculada em 1 mL de leite esterilizado, acrescido de 9 mL de solução do OE em concentração previamente definida no teste de CIM. Dessa solução, contendo óleo, leite e o isolado, foi transferida uma alçada para o caldo BHI após 5, 10, 15 e 20 min. Os tratamentos foram incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 96 h e, posteriormente, dos tubos que não apresentaram turvação foi transferida uma alíquota para placas contendo Ágar Cetrimide. A seguir, as placas foram incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h para verificação de crescimento de *Pseudomonas*, segundo metodologia descrita pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1993).

Esse experimento foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento. Foi utilizado esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$ sendo constituído por dois micro-organismos (ICA, *Pseudomonas* padrão), dois tratamentos (solução com OE e controle) e dois tempos de contato com OE (2 e 20 min). Para verificar o efeito antibacteriano do OE sobre as células aderidas, os valores de $\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$ foram transformados para *log* $x+1$ a fim de atender a pressuposição de normalidade (Caixeta *et al.*, 2012). Todas as análises estatísticas foram realizadas a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey utilizando o Sistema de Análises Estatísticas – SAEG versão 9.0 (Ribeiro Júnior, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados por meio de cromatografia gasosa 14 compostos majoritários, no óleo essencial de alecrim pimenta, correspondendo a 84,6 % dos componentes presentes na amostra (Figura 1).

A abundância relativa dos componentes presentes na amostra do óleo essencial foi de 31,0 % para o carvacrol e de 2,8 % para o timol, sendo que estes compostos são citados na literatura como fortes agentes antimicrobianos (Matos, 1999; Leal *et al.*, 2003; Oliveira, 2008). Entretanto, outros compostos, como γ -terpineno, cimeno e eucaliptol, podem influenciar na ação antimicrobiana, devido ao sinergismo entre os componentes presentes na composição do OE (Silva *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2006).

Botelho *et al.* (2007) relataram a presença de 16,7 % de carvacrol e de 56,7 % timol no óleo essencial de alecrim pimenta, obtido por meio de hidrodestilação e analisado por CG-MS. Foi constatado que a época do ano na qual a planta é coletada pode interferir no teor de timol, um dos principais princípios ativos desse OE (Leal *et al.*, 2003).

Essas variações de composição química do OE podem ser atribuídas, além da época e horário de colheita (Gomes *et al.*, 2008), a outros fatores tais como qualidade e fertilidade dos solos, clima, umidade do ar, temperatura ambiente, luminosidade, latitude, método e tempo de destilação, além da diversidade genética da espécie, entre outros (Castro *et al.*, 2011; Chaves *et al.*, 2008; Oliveira, 2008).

No teste realizado para a detecção da CIM, observou-se que as estirpes padrão e isolada apresentaram perfis de resistência análogos, sendo que a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento de ambos os micro-organismos-teste foi 240 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os resultados demonstram que as estirpes apresentaram resistência à morte, quando submetido ao tratamento com o OE. Dessa forma, para encontrar a CBM, há necessidade de futuras análises para avaliar o efeito bactericida com concentrações de OE maiores que 240 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Essa resistência das estirpes de *Pseudomonas* frente ao OE de alecrim pimenta pode ser explicada devido à estrutura dos micro-organismos Gram negativos, por apresentarem estrutura celular menos rígida, parede celular quimicamente mais complexa, com a presença do constituinte lipopolissacarídeo, que determina a antigenicidade, toxicidade e patogenicidade desses micro-organismos, além de um maior teor lipídico quando comparado às bactérias Gram positivas (Khan *et al.*, 2001; Cimanga *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2004).

Gomes Neto *et al.* (2012) avaliaram o efeito inibitório do óleo de alecrim frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Estes autores relataram que para inibir *P. aeruginosa* foi necessária a utilização de OE de alecrim a 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, apresentando assim sensibilidade ao antimicrobiano em concentração inferior a CIM encontrada para as estirpes deste presente estudo.

Outras pesquisas avaliaram o efeito antibacteriano do OE de alecrim pimenta frente a outras espécies bacterianas. Bertini *et al.*

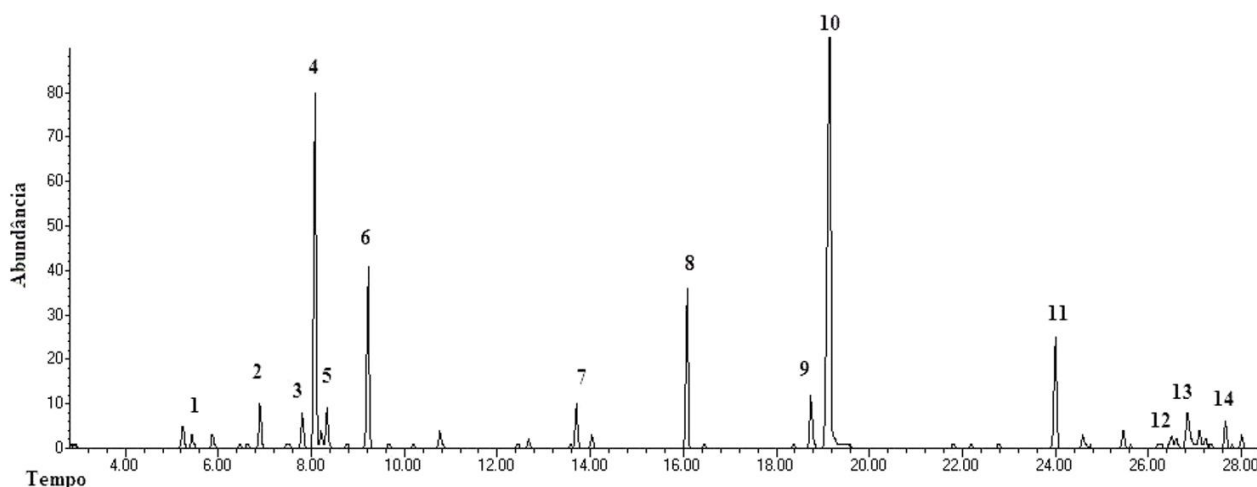


FIGURA 1. Cromatograma do óleo essencial de *Lippia organoides* analisado por cromatografia gasosa com detector de massa.

Legenda - Os compostos detectados com suas respectivas porcentagens dos fragmentos na amostra do óleo essencial foram: 1 - α -Felandreno (1,2 %), 2 - β -Miraceno (2,1 %), 3 - α -Terpineno (1,7 %), 4 - o-Cimeno (16,5 %), 5 - Eucaliptol (1,9 %), 6 - γ -Terpineno (8,2 %), 7 - Borneol (2,1 %), 8 - Éter metílico do timol (7,4 %), 9 - Timol (2,8 %), 10 - Carvacrol (31,0 %), 11 - Cariofileno (5,6 %), 12 - Desconhecido (2,9 %), 13 - α -Selineno (1,1 %), 14 - β -Bisaboleno (0,1 %).

(2005) demonstraram que dentre as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, somente essa última apresentou sensibilidade ao OE de alecrim pimenta, integral apresentando CIM inferior a 5 %.

Costa *et al.* (2011) verificaram que OE de *Lippia origanoides* na concentração de 320 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentou efeito inibitório pelo método de difusão em disco sobre *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* e *E. coli*, ambos isolados do leite de rebanhos provenientes de unidades agrícolas do Norte de Minas Gerais.

Segundo Castro *et al.* (2011), a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* mostrou-se eficaz contra as espécies *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de queijo minas artesanal. Os valores de CIM e CBM encontrados nesse estudo para ambas as espécies foram 13 e 25 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, sendo que esses testes foram realizados pelo método de difusão em disco, o que pode explicar a divergência aos resultados encontrados no presente estudo.

O potencial de biotransferência indica a quantidade de células aderidas do micro-organismo à superfície que pode ser desprendida para o meio onde se encontra. Isso pode levar a problemas para as indústrias de alimentos, principalmente para os laticínios, uma vez que pode ocorrer a recontaminação do leite, que pode causar sérios prejuízos econômicos e de saúde pública (Oliveira *et al.*, 2010). Os resultados encontrados para esse teste mostraram um elevado desprendimento das células aderidas dos cupons de aço inoxidável com conseqüente multiplicação das mesmas para o leite desnatado sem inoculação (Tabela 1). A estirpe padrão apresentou maior capacidade de desprendimento para o leite, quando comparada a estirpe isolada ($P < 0,05$). Esses dados são preocupantes uma vez que, em uma situação em que o tanque de expansão não tenha sido submetido a uma higienização eficiente, fica comprovado que as células bacterianas que não foram retiradas da superfície de aço inoxidável podem contaminar o leite recém-ordenhado.

TABELA 1. Potencial de biotransferência de estirpes de *Pseudomonas* após 24 h e adesão bacteriana em superfície de aço inoxidável AISI 304 # 4 após 48 h em leite desnatado.

Estirpes	Biotransferência	Adesão (Log
	(Log UFC·mL ⁻¹)	UFC·cm ⁻²)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	8,16 a	3,84 a
Isolada ICA	8,05 b	3,24 b
CV (%)	11,94	5,05

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5 % de probabilidade.

A quantificação de células aderidas na superfície de aço inoxidável após 48 h estão apresentadas na Tabela 1. Verificou-se uma maior capacidade de adesão da estirpe padrão em comparação à isolada ($P < 0,05$). Segundo Andrade *et al.* (1998), para se considerar um biofilme, é necessário um número mínimo de 10^7 UFC·cm⁻² de superfície. Dessa forma, constatou-se que nenhuma das bactérias testadas foi capaz de formar biofilme.

Os resultados do número de células aderidas no cupom de aço inoxidável AISI 304 # 4 após a sanitização com as soluções de OE de alecrim pimenta estão apresentados na Tabela 2. Observou-se uma redução significativa ($P < 0,05$) na concentração celular aderida após o tratamento com a solução sanitizante com OE, quando comparado ao controle para as estirpes (Tabela 2).

TABELA 2. Número de células de *Pseudomonas* aderidas em superfície de aço inoxidável AISI 304 # 4 expressas em log UFC·cm⁻² após o tratamento com soluções de óleo essencial de alecrim pimenta e solução controle.

Bactéria	Controle	Solução de OE	CV (%)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	3,63 Aa	< 1,00 Ba	8,41
Isolada ICA	3,30 Aa	< 1,00 Ba	

Médias seguidas por letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não foram constatadas diferenças ($P > 0,05$) no número de células presentes na superfície de aço após 2 e 20 min de contato com a solução sanitizante de OE. Assim, as soluções de OE de alecrim pimenta na concentração de 240 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ poderiam ser utilizadas para a sanitização das células bacterianas de *Pseudomonas* aderidas em aço inoxidável AISI 304 # 4 por apenas 2 min nas condições deste teste.

Esses resultados corroboram com os encontrados por Tebaldi (2008), que testou diferentes óleos essenciais no controle de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas* sp., mostrando que o óleo de tomilho e cravo-da-índia apresentaram ação biocida. Entretanto, Caixeta (2010) testou óleo essencial de açafraão e urucum frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 em superfície de polipropileno e verificou que, por um tempo de 15 min para OE de açafraão e 15 e 60 min para o OE de urucum, não houve redução expressiva no crescimento desse micro-organismo.

No teste de suspensão observou-se que a sensibilidade das estirpes bacterianas foi detectada em tempos diferentes após o contato com a solução de OE a 240 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ acrescida do leite. A estirpe

padrão apresentou maior resistência para esse teste, necessitando de 20 min, ou seja, o dobro do tempo para obtenção de efeito antibacteriano quando comparado com a isolada (Tabela 3).

TABELA 3. Resultado da atuação do óleo essencial de alecrim pimenta a $240 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ obtidos pelo teste de suspensão frente a *Pseudomonas* em diferentes tempos de contato com a matéria orgânica.

Estirpes	Tempo de exposição (min)			
	5	10	15	20
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	R	R	R	S
Isolada ICA	R	S	S	S

R – Resistente, S – Sensível ao óleo essencial na concentração testada.

O perfil de sensibilidade de outras espécies bacterianas quanto ao OE de alecrim pimenta foi testado pelo teste de suspensão por Castro *et al.* (2011). Estes autores verificaram que a solução de OE na concentração de $25 \mu\text{L}/\text{mL}$ por um minuto foi suficiente para obter um efeito bactericida em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Dessa forma, as *Pseudomonas* padrão e isolada foram capazes de sobreviver por tempos mais longos após contato com o OE na presença de matéria orgânica, quando comparadas com essas outras espécies.

O teste de suspensão demonstrou interferência do leite, pois com 5 min de exposição ao OE as estirpes ainda permaneceram resistentes e nos testes sem a matéria orgânica sua ação ocorreu em 2 min (Tabela 3). Assim, uma superfície de processamento de leite deve estar livre de resíduos dessa matéria orgânica para uma melhor ação do OE.

Os óleos essenciais podem ser usados para o combate de micro-organismos, até mesmo quando se encontram na forma mais resistente como é o caso de células aderidas ou na forma de biofilmes. A aplicação de soluções de OE de alecrim pimenta em procedimentos de sanitização pode ser uma alternativa de controle de bactérias do gênero *Pseudomonas* aderidas aos equipamentos e utensílios de aço inoxidável do setor de ordenha bovina.

Podemos concluir que o óleo essencial de alecrim pimenta possui atividade antimicrobiana frente às células aderidas de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável na concentração de $240 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$, por um tempo de 2 min em comparação ao controle. Vale notar que para o teste frente à matéria orgânica o leite interferiu na ação do OE, sendo necessário um maior tempo de contato para obter um efeito bactericida. Contudo, são ainda necessários testes toxicológicos para avaliar o efeito nocivo desse produto na concentração sugerida.

AGRADECIMENTOS

PRPq/UFMG, FAPEMIG, CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N.J.; BRIDGMAN, T.A.; ZOTTOLA, E.A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v.61, n.7, p.833-838, 1998.
- BERTINI, L.M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n.3\4, p.80-83, 2005.
- BOARI, C.A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.4, p.886-895, 2009.
- BOTELHO, M.A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, n.3, p.349-356, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 29 de dez., p. 24, 2011.
- BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento (MAPA). Secretaria De Defesa Agropecuaria. Portaria nº 101, de 11 de ago. de 1993.
- CAIXETA, D.S. et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 142-150, Mar. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612012000100021>. Acesso em: 20 jan. 2015.
- CARELI, R.T. et al. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.1, p.171-176, 2009.
- CAIXETA, D.S. **Ação de óleos essenciais de *Curcuma longa* L. e *Bixa orellana* L. sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes* planctônicas e sésseis em polipropileno: Aplicação de óleos essenciais de *Curcuma longa* L. (açafraão) e *Bixa orellana* L. (urucum) no controle de biofilme formado por *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 em superfície de polipropileno.** 2010. 128p. Tese de Doutorado – Área de concentração em Microbiologia de Alimentos – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CASTRO, C.E. et al. Atividade antimicrobiana de *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) de óleo essencial contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.3, n.4, p.293-297, 2011.
- CHAVES, F.C.M. et al. Teor de óleo essencial e seus constituintes em alecrim pimenta (*Lippia sidoides*)

- de três regiões demográficas distintas. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n.2, p.1462-1465, 2008.
- CIMANGA, K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, n.2, p.213-220, 2002.
- COSTA, S.M.O. et al. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Chan) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.12, p.66-67, 2002.
- COSTA, J.P.R. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. **Revista Biotemas**, v.24, n.4, p.1-6, 2011.
- DUARTE M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência**. p.1-16, 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2015.
- GOMES, G.A. et al. Rendimento de óleo essencial e teor de timol em alecrim-pimenta, em função do horário de colheita. In: 48^o CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 48., 2008, Rio de Janeiro. **Sociedade Brasileira de Química**, Rio de Janeiro, 2008. p. 1-1. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2008/trabalhos/7/7-250-199.htm>> Acesso em: 31 jan. 2015.
- HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 9, p. 1034-1037, 1997.
- KHAN, M.R. et al. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. **Fitoterapia**, v.72, n.7, p.825-828, 2001.
- KUNTH, K. S. et al., Nova Genera et Species Plantarum (quarto ed.) 2: 267. 1817[1818]. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/33700277>>. Acesso em: 20 mar. 2014.
- LEAL, L.K.A.M. et al. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p.9-11, 2003.
- LIMA, I.O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.197-201, 2006.
- MATOS, F.J.A. et al. Medicinal plants of Northeast Brazil containing thymol and carvacrol – *Lippia sidoides* Cham. and *L. gracillia* H. B. K. (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.11, n.6, p.666-668, 1999.
- MING, L.C; SCHEFFER, M.C.; CORRÊA JÚNIOR, C.; BARROS, I.B.I.; MATTOS, J.K.A. **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: Avanços na Pesquisa Agrônômica**. 1.ed. Botucatu: UNESP, 1998.192p.
- NETO, N.J.G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and 1,8-cineole acquire no direct and cross protection in a meat-based broth. **Food Research International**, v.49, p.143–146, 2012.
- NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard**. 6^a Ed. NCCLS document M7-A6. NCCLS, 940. West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087-1898. United States of America (USA), 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_publicacoes_bac_cresc.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2014.
- OLIVEIRA, C.T. **Influência das épocas seca e chuvosa no comportamento de acessos alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.): Caracterização e comportamento de acessos de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) mantidos em Banco Ativo de Germoplasma em São Cristóvão – SE**. 2008. 86p. Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas – Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão.
- POZZO, M.D. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v.41, n.4, p.667-672, 2011.
- RAJKOVIC, A.; SMIGIC, N.; DEVLIEGHERE, F. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, n.31, p.29-42, 2010.
- ROSSONI, E.M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracet acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, n.1, p.8185, 2000.
- SAS INSTITUTE Inc. **Statistical Analysis System user's guide**. Version 9.0 ed. Cary, 2002. 513p.
- SILVA, A.C. et al. Efeito in vitro de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p. 1853-1860, 2009.
- SILVA, J.P.L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella* Enteritidis. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p. 136-141, 2010.
- SILVA, V.A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana "in vitro" da *Lippia sidoides* cham sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.05, p.52-56, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Surface protection and secondary defense compounds. In: _____. **Plant Physiology**. Redwood City: Benjamin Cummings, 1991. p.318-345.
- TEBALDI, V.M.R. **Análise e Potencial de uso de óleo essenciais no controle de *Pseudomonas* sp e na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa***. 2008. 105 p. Tese de Doutorado em Ciências de Alimentos - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- TORRES, J.C.N. et al. Cepas de *Pseudomonas* spp. produtoras de metalo-betalactamase isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n.5, p.313-318, 2006.
- VARGAS, et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n.1, p. 159-163, 2004.