

BIOTRANSFERÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* PARA SUPERFÍCIES USADAS NO CORTE DE HORTALIÇAS E CONTROLE POR EXTRATOS DE ALECRIM PIMENTA

BIOTRANSFERENCE OF *ESCHERICHIA COLI* TO SURFACES USED IN THE PROCESSING OF VEGETABLES AND CONTROLLING BY EXTRACTS OF ROSEMARY PEPPER

Roberta Torres Careli¹, Marcia Martins¹, Eduardo Robson Duarte¹, Thiago Gomes dos Santos Braz¹, Cintya Neves de Souza²

¹ Docentes, Instituto de Ciências Agrárias/UFMG

² Técnica de Laboratório, Instituto de Ciências Agrárias/UFMG

Resumo

Objetivou-se analisar a biotransferência de *Escherichia coli*, a partir de folhas de alface contaminadas, para superfícies de corte de hortaliças, antes e após a sanitização com extratos de alecrim pimenta. Cupons de alface (4 cm²) contaminados com 7 log UFC·g⁻¹ de *E. coli*, foram colocados em contato com os cupons de aço inoxidável e de polipropileno (4 cm²) por 24 h a 7 °C. Posteriormente, os cupons foram imersos em soluções de extratos aquoso e etanólico de alecrim pimenta por 10 e 20 min. Ambos os extratos reduziram o número de células biotransferidas e aderidas aos cupons em relação à solução controle no tempo de 10 min. Após 20 min, o extrato aquoso não foi capaz de diminuir as células aderidas nos cupons em relação ao extrato etanólico. Tempos de contatos maiores são necessários para maior eficiência da higienização.

Palavras-chave: polipropileno, aço inoxidável, *Lippia origanoides*

Introdução

O consumo de hortaliças é essencial para a saúde por ser uma importante fonte de nutrientes na alimentação humana. Entretanto, quando contaminadas, são responsáveis pela transmissão de um grande número de doenças infecciosas, principalmente se consumidas cruas e, ou, mal lavadas (ARBOS, 2010). Dentro deste contexto, nos últimos anos, vegetais frescos, incluindo a alface, têm sido identificados como veículos de microrganismos patogênicos como *Escherichia coli*, sendo alvo de grande preocupação por parte dos órgãos de saúde pública (BEUCHAT, 2002).

Estima-se que 40 a 60 % dos casos de doenças transmitidas por alimentos estão relacionados às práticas inadequadas no ambiente doméstico. Os processos de biotransferência e adesão bacteriana em superfícies corte e processamento de hortaliças podem ser responsáveis pela transmissão de doenças (COSTA et al., 2012). A biotransferência ocorre devido a passagem de células microbianas para uma superfície inerte ou para o alimento. O mecanismo de adesão microbiana ocorre devido à deposição de microrganismos em uma superfície de contato, onde eles se fixam e iniciam o crescimento e a liberação desses pode trazer consequências indesejáveis à qualidade do alimento (ANDRADE, 2008).

A higienização é uma das principais formas de retirada de microrganismos transferidos e de prevenção da adesão bacteriana em equipamentos e utensílios. Comercialmente são encontrados vários produtos químicos com efeito de redução da contaminação de superfícies de processamento de alimentos. Contudo, tem-se observado o aumento da demanda de consumidores de produtos seguros, naturais e isentos de resíduos químicos (RAJKOVIC et al., 2010). Dessa forma, o uso de extratos naturais obtidos de plantas nativas pode ser uma alternativa natural de controle da contaminação microbiana.

Lippia origanoides (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, conhecida principalmente como anti-séptico (COSTA et al., 2002). Do alecrim pimenta, pode ser elaborado extratos,

Trabalhos Apresentados

que são ricos em timol, carvacrol e outros compostos que lhe conferem ação antimicrobiana (SILVA et al., 2009).

Dentro desse contexto, objetivou-se analisar o processo de biotransferência de *Escherichia coli*, a partir de folhas de alface contaminadas, em superfícies de corte de hortaliças, antes e depois da sanitização com solução de extratos de alecrim pimenta.

Material e métodos

As amostras de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae), espécie conhecida como alecrim pimenta, foram coletadas 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) e possui exsicata no Herbário PAMG da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais sob registro 56526. Folhas saudáveis foram selecionadas e secadas até peso constante em um secador de circulação forçada de ar a 40 °C por aproximadamente 72 h. As folhas secas foram trituradas e armazenadas em sacos de papel escuro sob refrigeração 4 °C até o momento das análises. Os extratos aquosos e etanólicos foram obtidos conforme descrito por Nery et al. (2010) com modificações.

Foi avaliada uma cepa de *Escherichia coli* isolada de folhas de alface lisa (*Lactuca sativa* L.), variedade Vitória de Santo Antão, adquiridas no comércio local, pertencente à bacterioteca do laboratório de Microbiologia do ICA/UFMG.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos foi realizada pelo método de macrodiluição em caldo, de acordo com a norma dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbio (NCCLS 2005). Foram preparadas 2,5 mL de soluções contendo extrato e Caldo BHI com concentrações de 18,75; 37,5; 75; 150 e 300 mg.mL⁻¹. Em seguida, a cada tubo foram adicionados 12,5 µL da suspensão ativa de *E. coli*. Foram homogeneizados e incubados a 35 °C por 24 h, sendo que após o período de incubação, uma alçada dos tubos que não apresentaram turvação foi transferida para placas contendo ágar caseína de soja (TSA), as quais foram incubadas a 35 °C por 24 h, para observar eventual crescimento microbiano e determinar a concentração bactericida mínima (CBM). Foram realizadas três repetições para cada tratamento.

Amostras de alface foram obtidas comercialmente e armazenadas a 7 °C ± 2 °C, até o momento das análises. Em todas as amostras foram realizados testes de exclusão microbiológica para verificar a ausência de contaminação por *E. coli*, espécie avaliada nesse estudo para procedimentos de transferência bacteriana. Utilizou-se o método de número mais provável (NMP), seguido de realização de testes bioquímicos para a determinação de *Escherichia coli* nas folhas de alface (KORNACKI e JOHNSON, 2001).

Antes do teste de biotransferência, a higienização das folhas de alface foi realizada conforme procedimentos descritos por Lima (2008). Foram realizados cortes das folhas de alface, em cupons de dimensões de 2 x 2 cm, sob condições assépticas com auxílio de bisturi cirúrgico esterilizado.

Cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 (2,0 cm x 2,0 cm x 0,1 cm) e de polipropileno (2,0 cm x 2,0 cm x 0,2 cm) foram previamente higienizados a 25 °C ± 2 °C antes dos testes de biotransferência. Os cupons foram lavados em água potável e detergente neutro, e posteriormente enxaguados com água destilada e sanitizados com álcool etílico 70 % (v/v). Os cupons foram secos em estufa a 60 °C por 2 h e esterilizados a 121 °C por 15 min (ROSSONI e GAYLARDE, 2000).

Para a avaliação do potencial de biotransferência, cupons de alface contaminados com 7 log UFC.g⁻¹ de *E. coli*, foram colocados em contato com os cupons de aço inoxidável e de polipropileno previamente higienizados, separadamente, por 24 h a 7 °C ± 2 °C. Após essas condições experimentais, os cupons foram imersos na solução de extratos de folhas de alecrim pimenta nas concentrações inibitórias mínimas por 10 e 20 min. A solução testada como controle foi composta por água destilada esterilizada. Os cupons foram transferidos, separadamente, para 10 mL de solução salina 0,85 % (m/v) e sonificados por 2 min usando banho de ultrassom, com 40 kHz, para a remoção de células aderidas sobreviventes nas superfícies dos cupons segundo Malheiros et al. (2010) com

Trabalhos Apresentados

modificações. A partir de 1000 µL da solução salina 0,85 % (m/v), foram realizadas diluições decimais seriadas sucessivas, com plaqueamento em Ágar MacConkey e incubação de 37 °C por 24 h. Após essas condições de crescimento, as unidades formadoras de colônia (UFC) foram quantificadas e os resultados expressos em UFC·cm⁻², segundo Careli et al. (2009).

Para estimar a adesão nas superfícies de aço e polipropileno foi realizado o teste t a 5 % de probabilidade. Para a enumeração das células aderidas nos cupons de aço inoxidável e polipropileno após o tratamento destes com soluções sanitizantes em diferentes tempos de contato, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3×2×2, constituído por três tratamentos (controle, extrato etanólico e extrato aquoso), duas superfícies de processamento (aço inoxidável e polipropileno) e dois tempos de contato (10 min e 20 min). Todos os experimentos foram analisados com o auxílio do pacote estatístico *Statistical Analysis System* (SAS, 2010).

Resultados e discussão

Constatou-se inibição de crescimento da suspensão bacteriana em concentração de 150 mg.mL⁻¹ de ambos os extratos. Não foi possível determinar a CBM de nenhum dos extratos, pois foram detectadas células viáveis após o contato com os extratos nas maiores concentrações avaliadas (Tabela 1). Ao contrário dos resultados observados, Pinho et al. (2012) não encontraram atividade antibacteriana do extrato etanólico de alecrim pimenta a 500 mg. mL⁻¹ sobre a estipe padrão de *E. coli* ATCC 25753.

Tabela 1. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos de folhas de alecrim pimenta frente a células de *Escherichia coli*, isolada de alface lisa (*Lactuca sativa* L.), variedade Vitória de Santo Antão

Extratos de alecrim pimenta	CMI (mg.mL ⁻¹)	CBM (mg.mL ⁻¹)
Etanólico	150	>300
Aquoso	150	>300

Os resultados do teste de exclusão microbiológica mostraram que todas as amostras de alface apresentaram-se negativas para o micro-organismo analisado. Os cupons de alface, artificialmente contaminados com 7 log UFC.g⁻¹ de *E. coli*, foram capazes de transferir, antes da sanitização, 3,94 log UFC.cm⁻² e 4,75 log UFC.cm⁻² quando mantidos em contato com o aço inoxidável e o polipropileno, respectivamente. Observou-se diferença na quantidade de células biotransferidas e aderidas nas duas superfícies (P > 0,05). Esses resultados demonstram que as superfícies de aço e polipropileno foram capazes de serem colonizadas por um elevado número de células de *E. coli* transferidas de alface, sob temperatura de refrigeração (7 °C) por 24 h.

De acordo com Andrade (2008), para se considerar um biofilme, é necessário um número mínimo de 7 log UFC.cm⁻². Dessa forma, constatou-se um mecanismo de adesão de células de *E. coli* nas superfícies de aço inoxidável e de polipropileno. Fato este que não reduz o problema de contaminação destas superfícies, pois em condições apropriadas de umidade, nutrientes e temperatura, células de *E. coli* podem continuar se multiplicando e produzindo substâncias poliméricas extracelulares para a formação do biofilme bacteriano.

A adesão à superfície e formação de biofilme proporciona vantagens aos micro-organismos como maior capacidade de retenção de nutrição, proteção contra procedimentos de sanitização e vantagens adaptativas. Atualmente, antimicrobianos naturais tem atraído a atenção de pesquisadores, pois apresentam amplo espectro de ação e causam menos impacto ao ambiente (CAIXETA, 2010).

Após a sanitização, não foi observada interação entre os tratamentos e as superfícies de aço e polipropileno (P > 0,05), indicando que o efeito das soluções dos extratos e controle, em cada tempo de contato, foram os mesmos na redução das células aderidas em ambas as superfícies (Tabela 2). Todas as soluções sanitizantes à base dos extratos reduziram (P > 0,05) a quantidade de células biotransferidas e aderidas nos cupons

Trabalhos Apresentados

em relação à solução controle no tempo de 10 min. Após 20 min de contato, a solução do extrato aquoso não foi capaz de provocar redução significativa ($P < 0,05$) das células aderidas nos cupons em relação ao extrato etanólico (Tabela 2).

Tabela 2. Número de células aderidas ($\log \text{UFC.cm}^{-2}$) de *Escherichia coli*, quantificadas nas superfícies de aço inoxidável e polipropileno, após 24 h a 7 °C, em contato com cupons de alface, após diferentes tempos de contato com a solução controle e as soluções dos extratos de folhas de alecrim pimenta em concentrações mínimas inibitórias de 150 mg.mL^{-1}

Tratamentos	Tempo de contato	
	10 min	20 min
Extrato etanólico	3,42Ba	3,01Bb
Extrato aquoso	3,81Ba	3,70Aa
Controle	4,33Aa	4,05Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade

Em relação aos tempos de contato das soluções sobre as células aderidas, constatou-se que o extrato aquoso, não apresentara diferença de efeito antimicrobiano quando a sanitização foi realizada por 10 ou 20 min. Porém, o extrato etanólico mostrou uma maior redução com 20 min de sanitização (Tabela 2). Neste experimento, observou-se que os extratos foram capazes de reduzir parte da carga bacteriana aderida nas superfícies. No entanto, para melhor eficiência do processo de sanitização, há necessidade da realização de testes com tempos maiores do que 20 min.

Conclusão

Células de *E. coli*, a partir de cupons de alface, foram capazes de transferir e aderir em aço inoxidável e polipropileno antes do procedimento de sanitização. As soluções sanitizantes formuladas com os extratos reduziram parte da população bacteriana aderida nas superfícies. Contudo, testes com tempos maiores de sanitização e de toxicidade devem ser realizados para verificar um melhor efeito antimicrobiano dos extratos de alecrim pimenta.

Referências bibliográficas

- ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. Editora Varela, 2008, 412 p.
- ARBOS, K. A. et al. Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30 p. 215-220, 2010.
- BEUCHAT, L. R. Ecological factor influencing survival and growth of humans pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes and Infections**, v. 4, p. 413-423, 2002.
- 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**. Lavras, MG: 128p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, 2010.
- 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, p. 171-176, 2009.
- COSTA, E. A. et al. Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa* L.) convencionais e orgânicas e a eficiência de dois processos de higienização. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, p. 387-392, 2012.
- COSTA, S. M. O. et al. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Chan) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.12, p.66-67, 2002.
- KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (ed.). **Compendium of Methods**

Trabalhos Apresentados

- for the **Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001. Cap.8, p.69-82.
- 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 out. 2016.
- LIMA, P. M. **Influência da microbiota natural e de fatores físico químicos na adesão de *Salmonella* Enteritidis em alface de cultivo hidropônico e convencional**. Viçosa, MG: 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- MALHEIROS, P. S. et al. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. **Food Control**, v. 21, p. 298-301, 2010.
- NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement**. [Online]. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. (2005) Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf> Acesso em: 10 mar. 2016.
- NERY, P. S. et al. Effect of *Anacardium humile* on the larval development of gastrointestinal nematodes of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p. 361-364, 2010.
- PINHO, L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v. 42, p. 326-331, 2012.
- RAJKOVIC, A.; SMIGIC, N.; DEVLIEGHERE, F. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.29-42, 2010.
- ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 81-85, 2000.
- SAS Institute. SAS/ETS user's guide. Version 9.0 ed. Cary: SAS Institute, 2010.
- 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.

Autor a ser contatado: Roberta Torres Careli, Docente do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, Av. Universitária, n. 1000, Universitário, Montes Claros/MG – robertacareli@ufmg.br