

## Avaliação do efeito antibacteriano do composto D-Limoneno sobre a bactéria *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg e desenvolvimento de um sabão com o produto

### Evaluation of the antibacterial effect of the compound D-Limonene on the bacterium *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg and development of a soap with the product

**Gustavo da Silva Matos**

**Autor**

[gmatos@alunos.utfpr.edu.br](mailto:gmatos@alunos.utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Cleverson Busso**

**Orientador**

[clvbusso@gmail.com](mailto:clvbusso@gmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

#### RESUMO

O estado do Paraná é atualmente o maior produtor e exportador de frangos de corte do Brasil, levando as empresas do ramo a seguirem normas quanto a qualidade e segurança alimentar desse produto. Um fator de risco a essas normativas que vem assolando o estado é a proliferação dos patógenos do gênero *Salmonella*, em especial *Salmonella enterica* serovar Heidelberg, encontrado com maior frequência na região. Devido aos riscos gerados pela ingestão de aves contaminadas com o patógeno, medidas de controle tornam-se necessárias, logo, o objetivo desse trabalho foi verificar a eficiência de D-Limoneno, um monoterpeno de fácil obtenção e baixo custo no controle de *S. Heidelberg*. Para isso foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do composto sobre a bactéria segundo padronização estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (NCCLS). Com base na CIM obtida, um sabonete higiênico foi confeccionado e posteriormente submetido ao teste de controle perante os padrões do NCCLS. Os resultados mostraram que o D-Limoneno empregado diretamente sobre a *S. Heidelberg* foi eficiente em concentrações superiores a 25 mg/ml, já na composição do sabonete a CIM foi de 5,5 mg/ml. O presente estudo revelou que D-Limoneno possui atividade antibacteriana significativa quanto ao sorotipo, apresentando maior eficiência no sabonete higiênico, podendo esse ser um possível produto empregado na higienização de equipamentos do ramo avícola passíveis de serem vetores de proliferação do patógeno.

**PALAVRAS-CHAVE:** Contaminação avícola. Higienização. CIM. Prejuízos na exportação

#### ABSTRACT

The state of Paraná is currently the largest producer and exporter of broiler chickens in Brazil, leading companies to follow standards for quality and food safety of this product. A risk factor to these norms that has been raging in the state is the proliferation of pathogens of the genus *Salmonella*, in particular to serotype *Salmonella enteric* serovar Heidelberg, which is found with greater frequency in the region. Due to the risks generated by the ingestion of birds infected with the pathogen, control measures become necessary, therefore, the objective of this study is the verification of efficiency of D-limonene, a monoterpeno easy to obtain and low cost in controlling the proliferation of *S. Heidelberg*. For it was determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of the compound on the bacterium according to standards established by the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Based on the MIC obtained, a hygienic soap was prepared and subsequently submitted to the test of control before the CLSI standards. The results showed that the D-limonene employed directly on the *S. Heidelberg* was efficient in concentrations exceeding 25 mg/ml, already in the composition of the soap the MIC was 5.5 mg/ml. The present study revealed that D-limonene has significant antibacterial activity as the serotype, being more efficient in the composition of a hygienic soap, this stamp may be a possible product used in disinfection of equipment in the poultry industry liable to be vectors of proliferation of the pathogen.

**KEYWORDS:** Poultry contamination. Sanitation. MIC. Losses on exports

**Recebido:** 31 ago. 2018.

**Aprovado:** 04 out. 2018.

**Direito autoral:**

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.





## INTRODUÇÃO

Dados fornecidos pela Embrapa Suínos e Aves (EMBRAPA, 2018) colocam o estado do Paraná como o maior produtor e exportador de frangos de corte do Brasil, com cerca de 30% de toda demanda nacional, levando as empresas a se adequarem cada vez mais as normatizações de segurança alimentar impostas pelos países importadores.

Uma das normas exigidas pelos comitês internacionais é a qualidade e segurança dos alimentos, que podem oferecer riscos a saúde do consumidor prejudicando assim as relações comerciais alimentares entre os países (MATTÉ, 2015).

Entre os patógenos veiculados na avicultura, destacam-se os do gênero *Salmonella* (SILVA e DUARTE, 2002), em especial o sorotipo *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg, que se faz presente com maior intensidade na região sul do Brasil (ARMANINI, 2017).

A *S. Heidelberg* é umas cinco *Salmonellas* associadas a toxinfecção em seres humanos e umas das mais comumente isoladas em aves de corte (FOLEY e LYNNE, 2008).

Devido aos riscos gerados pela ingestão de aves contaminadas, além de enormes prejuízos na exportação de carne de frango, medidas tornam-se necessárias para a redução da proliferação desse patógeno. Uma alternativa viável é o uso de agentes orgânicos, como é caso do D-Limoneno, o monoterpeno mais abundante na natureza, e representa cerca de 90% do óleo de casca de laranja (BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, 2018).

Embora muitos pesquisadores tenham utilizados óleos essenciais como agentes naturais antimicrobianos, observa-se uma grande discrepância nos resultados, mesmo utilizando a mesma planta e a mesma cepa microbiana. Isto se deve, sobretudo, ao difícil padrão de uniformidade de obtenção do produto, pois a composição química ou os compostos majoritários dos óleos pode variar entre espécies, partes do vegetal, condições climáticas, período de colheita e até mesmo o processo de extração empregado (OUSSALAH et al., 2007; GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Estudos do efeito antimicrobiano de diversos monoterpenos obtidos de óleos essenciais como é o caso do citral, citronelal e isopulegol (GARCIA, 2008), vem obtendo resultados positivos quanto a inibição e controle de certos patógenos, o que pode tornar o D-Limoneno um potencial agente antimicrobiano eficiente, de baixo custo e com grande abundância no Brasil. Este é o primeiro relato de uso de um composto majoritário isolado e presente em óleos essenciais com atividade antibacteriana sobre *S. Heidelberg*.

## METODOLOGIA

### DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A CIM foi realizada segundo padronização estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005). Para a determinação da mesma, células viáveis de *Salmonella* Heidelberg foram semeadas em meio de cultura Ágar Nutriente 48h antes do início do experimento. Após 24h de incubação, foi realizado um novo inóculo em caldo Nutriente e incubado em estufa por 24h a 35°C. Após esse período a densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro a 625 nm de acordo com a escala 0,5 McFarland. Para preparação do D-Limoneno foram usados 200 µL do mesmo, 10 µL de emulsificante Tween 80, e 790 µL de caldo Nutriente, a solução foi homogeneizada em vortex, e 200 µL foram adicionados aos seis primeiros poços da primeira coluna da microplaca. Posteriormente 100 µL de caldo Nutriente foram dispostos aos demais poços da placa seguidos pela diluição realizada a proporção de 1:1. Em seguida com a concentração celular já conhecida, 20 µL da suspensão celular foram inseridas em cada um dos poços. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 35°C. Decorrido esse tempo foram adicionados 20 µL do corante de viabilidade celular cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1% e as microplacas incubadas novamente a 35°C por mais 24 horas. A determinação da CIM é uma correlação entre o aparecimento de uma coloração avermelhada nos poços e a formação de botões sedimentados na parte inferior dos mesmos.

### FABRICAÇÃO DO SABONETE

Para a fabricação do sabonete foram utilizadas 2,2 g de base glicerizada, 500 µL de Lauril sulfato de sódio, 50 µL de Tween 80, 3 gotas de corante alimentício e 2,5 ml de D-Limoneno, cerca de 2,23 g. A concentração base do composto usada foi a antecessora ao poço da CIM, sendo ajustada a 4,5% m/v e posteriormente aumentada em 10 vezes para confecção do sabonete. Em um béquer foi adicionada a base glicerizada e o Lauril, o recipiente foi levado a banho maria a temperatura de 60 °C até a liquefação da solução, em seguida adicionou-se o D-Limoneno emulsionado com Tween 80 e o corante. Após a mistura, a solução foi depositada em formas de plástico para a solidificação e posterior embalagem.

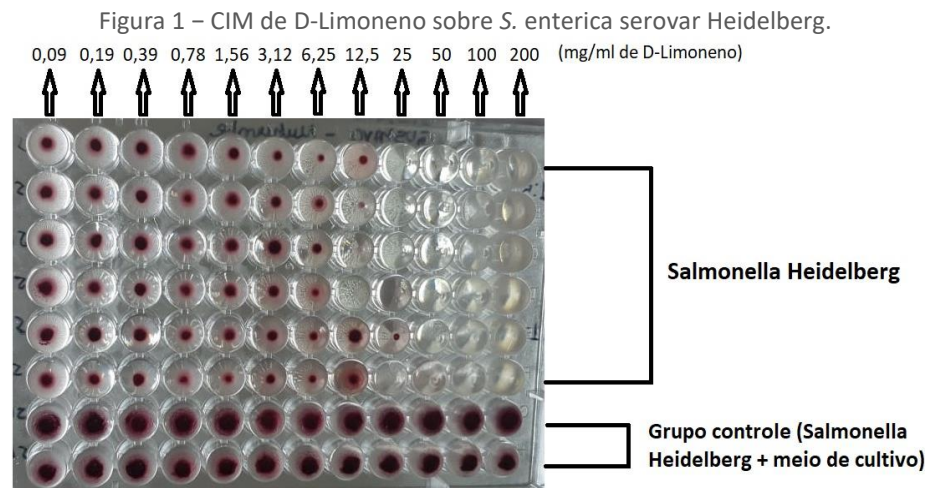
O mesmo procedimento foi empregado na confecção de um sabonete controle, sem a adição de D-Limoneno, sendo este substituído por água destilada.

### VERIFICAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIBACTERIANA DE D-LIMONENO EMPREGADO EM SABONETE CASEIRO

Para tal a mesma metodologia empregada na CIM foi usada, alterando somente a preparação do composto a ser analisado. 1 g do sabonete sólido foi diluído em 10 mL de água destilada com auxílio de agitador magnético. Essa nova solução agora com a concentração de 4,5% v/v foi adicionada aos 6 primeiros poços da primeira coluna da microplaca, seguido dos procedimentos padrões da CIM.

## RESULTADOS

A Figura 1 é o resultado do teste da concentração inibitória mínima, revelando assim a menor concentração de D-Limoneno capaz de impedir o metabolismo da *S. Heidelberg*, nesse caso. O *score* para a CIM é dado com a presença do composto cloreto de trifeniltetrazólio que quando reduzido pelo metabolismo de microrganismos a formazano, apresenta coloração avermelhada, logo a presença desses botões vermelhos na figura indica a atividade metabólica, indicando o crescimento ou não do do sorotipo nas mais diferentes concentrações de D-Limoneno.



Fonte: Gustavo da Silva Matos (2018)

Observando a figura, nota-se a ausência de botões avermelhados nas quatro primeiras diluições, 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml e 25 mg/ml, podendo assim ser determinada a CIM, de 25 mg/ml.

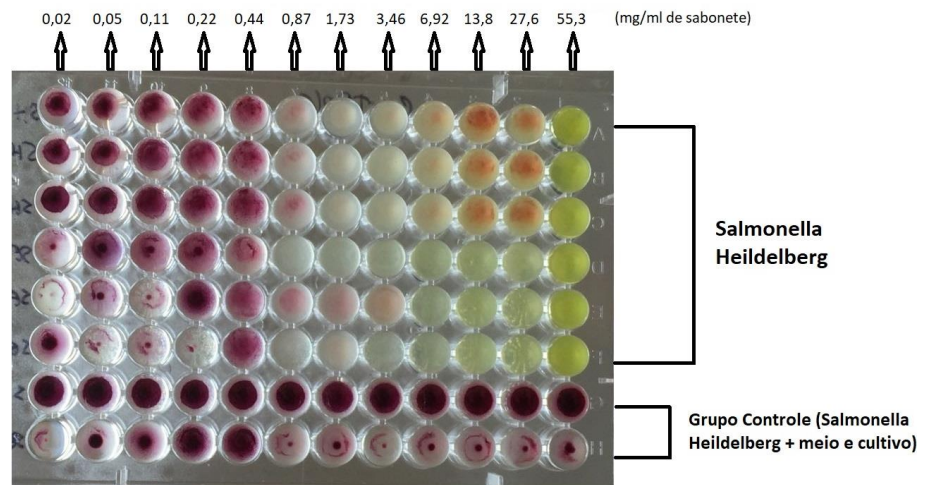
Há também a presença de botões em um dos poços da CIM, justificado por erros de pipetagem que alteraram a concentração do poço.

Com base na CIM obtida no primeiro ensaio (Figura 1), determinou-se a concentração de D-Limoneno a ser usada na fabricação do sabonete, suficiente para inibição do patógeno, entretanto, o valor de 25 mg/ml correspondente a CIM do composto puro não foi usada, a mesma serviu como base para que fosse determinada uma concentração mais elevada, garantindo assim a eficácia do monoterpene quando misturado aos componentes usados na fabricação do sabonete.

Como a ação dos componentes usados na fabricação do sabonete sobre o crescimento do patógeno era desconhecido, um controle foi desenvolvido, substituindo o D-Limoneno por água em sua composição.

A Figura 2 mostra que a *S. Heidelberg* é resistente a composição química do sabonete, exceto em concentrações de 100%, onde não há a presença de nutrientes.

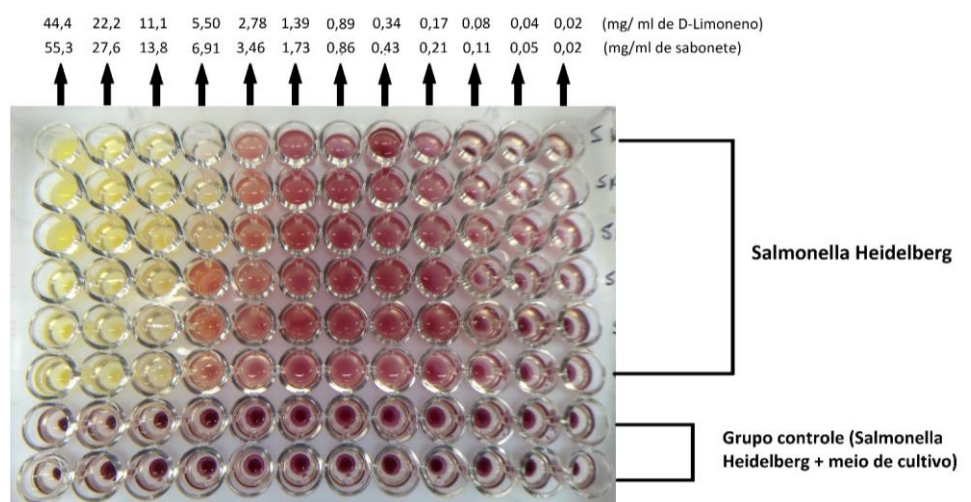
Figura 2 – CIM do grupo controle composto apenas por sabonete sobre *S. enterica* serovar Heidelberg.



Fonte: Gustavo da Silva Matos (2018).

Na figura 3, o sabonete adicionado possuía a concentração de D-Limoneno estabelecida a partir do primeiro ensaio, mostrando uma CIM de 5,5 mg/ml de D-Limoneno.

Figura 3 – CIM de sabonete composto por D-Limoneno sobre *S. enterica* serovar Heidelberg.



Fonte: Gustavo da Silva Matos (2018).

## DISCUSSÕES

Os resultados sugerem uma maior efetividade do composto quando em conjunto com a formulação do sabonete, o que poderia ser causado devido aos componentes do mesmo, entretanto tal possibilidade é descartada no experimento correspondente a Figura 2, uma vez que não há a presença do monoterpeno. Uma possível hipótese seria a de uma reação entre o D-Limoneno e os componentes do sabonete, que por fim tornaram esse novo produto de fato mais efetivo no controle de *S. Heidelberg*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há um grande potencial antibacteriano de D-Limoneno sobre a bactéria *Salmonella* entérica serovar Heidelberg, mostrando-se mais eficiente quando disposto na composição de sabonetes higiênicos, podendo esse ser um possível produto de higienização de equipamentos que possam vir a ser vetores desse patógeno, como as plantas de processamento de uma indústria exportadora do ramo.

## REFERÊNCIAS

ARMANINI, E.H. et al. **Salmonella Heidelberg: EMERGÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS BETA- LACTÂMICOS**. p. 4–5, [S.d.], 2017.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and uses**. 4th ed. Weinheim: Wiley - VCH, 2001. 293 p.

CLSI. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**. [S.l: s.n.], 2005. v. 23.

Embrapa. **Estatísticas | Brasil | Frangos de corte - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/brasil>>. Acesso em: 31 jul 2018.

FOLEY, S L e LYNNE, A M. Food animal-associated Salmonella challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance1. **Journal of Animal Science**, 10.2527/jas.2007-0447, v. 86, n. suppl\_14, p. E173–E187, 1 Abr 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2527/jas.2007-0447>>. Acesso em: 31 jul 2018.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, 30(2): 374-381, 2007.

GARCIA, R.; SANTOS, M.; et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian journal of microbiology** : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], v. 39, n. 1, p. 163–8, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3768356&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 31 jul 2018.

MATTÉ, Fabrizio. Determinação da Eficácia de Probióticos e Prebióticos Contra o Desafio Horizontal de Samonella Heidelberg em Frangos de Corte. 2015. Dissertação (**Mestrado**) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, PR, 2015.



OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. **Food Control**, 18(5): 414-420, 2007.

SILVA, EN.; DUARTE, A. Salmonella Enteritidis in Poultry: Retrospective in Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, 2002.

### **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo fomento à bolsa de pesquisa pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC). Ao meu orientador Prof. Dr. Cleverson Busso, pelo empenho dedicado à orientação deste trabalho. A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial ao Campus Dois Vizinhos pela disponibilização do espaço físico laboratorial para que este trabalho pudesse ser desenvolvido. E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho.