

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A BIOCIDAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE HORTALIÇAS FOLHOSAS NO MUNICÍPIO DE ALEGRE-ES

Marina Lima da Silveira, Mariana Fabri Lima, Yasmin Pena Santos, Athos de Oliveira Sabino, Mirian de Souza Seixas, Juliana Alves Resende, Mariana Drummond Costa Ignacchiti

Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Departamento de Farmácia e Nutrição/CCENS, Av. Alto Universitário, s/n, Guararema - 29.500-000 - Alegre - ES, Brasil, marinals2708@gmail.com, mariana.fabri@outlook.com, yasminpna2@gmail.com, oliveiraathos223@gmail.com, mirianseixas18@gmail.com, ju.alves.resende@gmail.com, marianadci@gmail.com

Resumo

O aumento do consumo de hortaliças folhosas, impulsionado por seus benefícios nutricionais e pela promoção de uma alimentação saudável, tem gerado preocupações com a qualidade microbiológica desses alimentos. O uso de biocidas na agricultura é comum para desinfecção, mas a exposição contínua pode levar ao desenvolvimento de resistência microbiana. *Escherichia coli*, um microrganismo potencialmente patogênico, representa um risco à saúde pública quando presente em hortaliças. Este estudo avaliou a susceptibilidade de 28 linhagens de *E. coli* a quatro biocidas: hipoclorito de sódio a 2%, digliconato de clorexidina a 2%, iodopovidona a 10% e peróxido de hidrogênio 3%, usando a técnica de disco-difusão. Os resultados indicaram que clorexidina foi o biocida mais eficaz, enquanto iodo, peróxido e hipoclorito foram menos efetivos, destacando a importância desses achados para a segurança microbiológica de alimentos vegetais consumidos crus.

Palavras-chave: *Enterobacteriaceae*. Resistência Bacteriana. Segurança Microbiológica.

Área do Conhecimento: Ciências da saúde

Introdução

A produção hortaliças folhosas desempenha um papel crucial na segurança alimentar global, fornecendo nutrientes essenciais e contribuindo para uma dieta saudável (Silva *et al.*, 2020). No entanto, a emergência de contaminação bacteriana, particularmente por patógenos como *Escherichia coli*, representa um desafio global para a saúde pública. Estes microrganismos podem colonizar hortaliças folhosas durante o cultivo, colheita, processamento ou distribuição, constituindo um risco potencial para os consumidores (Igbinosa *et al.*, 2023).

O uso de biocidas na produção agrícola visa mitigar riscos ao controlar o crescimento microbiano. No entanto, o uso indiscriminado desses compostos pode resultar no desenvolvimento de resistência bacteriana, tanto aos antimicrobianos quanto aos biocidas utilizados na agricultura (Pereira; Wang; Tagkopoulos, 2021). A resistência bacteriana é uma preocupação crescente, pois pode comprometer a eficácia dos tratamentos sanitários e aumentar os desafios no controle de infecções humanas associadas à ingestão de alimentos contaminados, uma vez que essa transmissão pode ocorrer por rotas diretas ou indiretas (Samtiya *et al.*, 2022). A redução da sensibilidade aos biocidas está se tornando mais prevalente, devido a mecanismos de resistência cruzada e/ou co-resistência (Rozman *et al.*, 2021; Ghanem; Haddadin, 2018).

A *E. coli* é um microrganismo presente em solo, água e também na microbiota intestinal de humanos e animais de sangue quente, atuando como um comensal no lúmen intestinal do hospedeiro. A persistência de cepas resistentes de *E. coli* no meio ambiente representa um problema de saúde pública, podendo ser usados como um bioindicador de resistência antimicrobiana. Visto que ao adquirir grande flexibilidade genética e a adaptabilidade, essa bactéria pode circular entre humanos e animais através do ambiente, água e alimentação, com sua transmissão sendo influenciada por migrações humanas e animais (Ramos *et al.*, 2020).

Portanto, este estudo tem como objetivo investigar o perfil de susceptibilidade a biocidas de *E. coli* isoladas de hortaliças folhosas, verificando a eficácia dos biocidas comumente utilizados na rotina da população para o controle microbiológico. Ao determina padrão de susceptibilidade aos principais

biocidas, esperamos contribuir para práticas agrícolas mais seguras e para o desenvolvimento de estratégias de controle da resistência antimicrobiana em alimentos vegetais

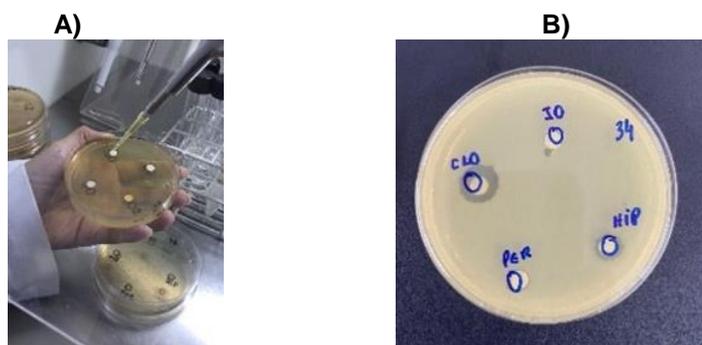
Metodologia

Foram avaliadas 20 amostras de hortaliças folhosas comercializadas no município de Alegre – ES. As amostras foram adquiridas em dias diferentes, em sua embalagem original e sem nenhum tipo de processamento prévio. As amostras foram acondicionadas em recipiente adequado, mantidas a temperatura ambiente para o transporte até o local de análise. A partir destas amostras foram isoladas 28 linhagens de *E. coli*. As linhagens foram identificadas fisiologicamente em meio seletivo - Ágar Eosina Azul de Metileno e ágar TSI.

A avaliação da susceptibilidade aos biocidas foi realizada utilizando a técnica de disco-difusão (CLSI, 2019), com modificações (Figura 1). Foram testados biocidas comumente utilizados em hospitais e de rotina doméstica da população: hipoclorito de sódio a 2%, digliconato de clorexidina a 2%, iodopovidona a 10% e peróxido de hidrogênio 3%.

Os inóculos foram ajustados para o padrão de 0,5 da MacFarland. As suspensões bacterianas foram semeadas em placas contendo meio ágar Mueller Hinton. Discos de papel filtro estéreis (6 mm) foram adicionados e inoculados com 5 µL dos biocidas. As placas foram incubadas a 35° C por cerca de 24 horas em estufa. Após a incubação, foram realizadas medições dos halos de inibição do crescimento ao redor dos discos de papel filtro. A linhagem de controle, *E. coli* ATCC 25922, foi submetida às mesmas condições experimentais para comparação.

Figura 1 – Imagem ilustrativa da avaliação do perfil de susceptibilidade aos biocidas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de hortaliças. A) Método de difusão em disco. B) Imagem ilustrativa de uma placa teste mostrando a inibição do crescimento microbiano pelo biocida.



IO = iodopolividona; HIP = hipoclorito de sódio; CLO = diglicolato de clorexidina; PER = peróxido de hidrogênio

Fonte: Autor

Resultados

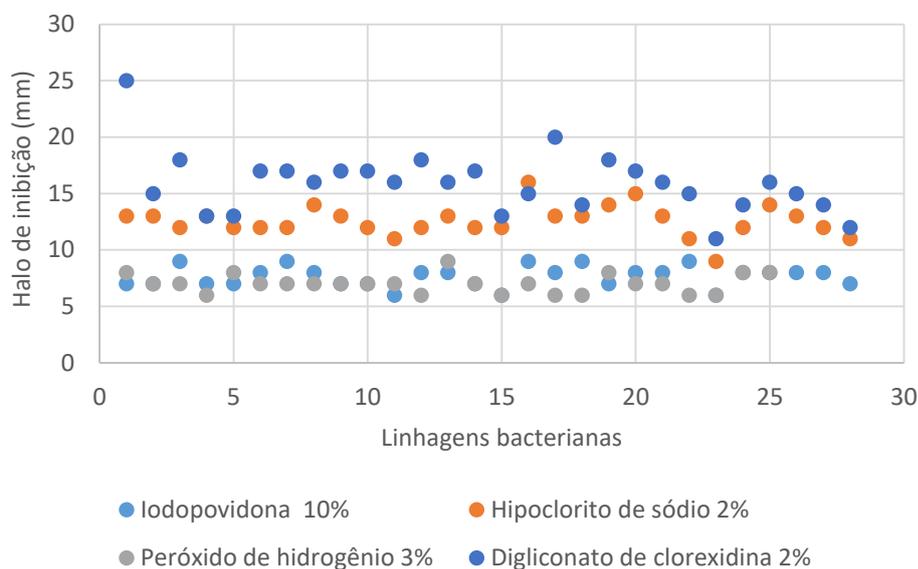
Foram isoladas 28 linhagens de *E. coli* a partir de amostras de hortaliças folhosas. A Figura 1 ilustra o perfil de susceptibilidade dessas linhagens bacterianas aos principais biocidas utilizados na rotina hospitalar e doméstica.

A literatura atual não há critérios padronizados para classificar as bactérias quanto à resistência e susceptibilidade a biocidas. Deste modo, a cepa controle (*E. coli* ATCC 25922) foi utilizado como referência comparativa. Essa cepa apresentou halos de inibição de 15 mm para o digliconato de clorexidina, 12 mm para o hipoclorito de sódio, e 8 mm para a iodopovidona e peróxido de hidrogênio.

Os dados indicam que o peróxido de hidrogênio e a iodopovidona foram os biocidas menos eficazes na inibição do crescimento microbiano, ambos gerando halos de inibição inferiores a 9 mm. Em contrapartida, a maior susceptibilidade foi observada para o digliconato de clorexidina, seguido pelo hipoclorito de sódio (variação de 9 a 16 mm), destacando uma superior eficácia desses compostos no processo de desinfecção.

Considerando o tamanho do disco de papel de 6mm no qual foram impregnados os biocidas, no presente trabalho, os isolados que apresentaram tamanhos de halo de inibição de 6mm (ausência de formação do halo) foram classificados como resistentes. Assim, 25% das linhagens testadas não apresentaram halos de inibição frente ao peróxido de hidrogênio e 10,71% frente ao iodopovidona, sugerindo resistência a estes biocidas.

Figura 1 - Avaliação da susceptibilidade aos biocidas das linhagens de *Escherichia coli* isoladas de hortaliças folhosas.



Fonte: Autor

Discussão

O uso de biocidas é amplamente difundido devido ao seu poder de eliminação ou controle do crescimento de microrganismos na pele, objetos ou em superfícies. A eficácia de antissépticos e desinfetantes pode variar conforme o tipo de microrganismo investigado (Jones; Joshi, 2021). A utilização inadequada desses compostos pode exercer pressão seletiva sobre as bactérias, resultando em resistência, e, de forma ainda mais significativa, promover o desenvolvimento de resistência cruzada com antimicrobianos, embora as evidências sobre esse fenômeno ainda sejam incertas (Pereira; Wang; Tagkopoulos, 2021).

O peróxido de hidrogênio atua induzindo a produção do radical livre hidroxila, o que promove a peroxidação lipídica das membranas celulares, além de causar lise do DNA e de outros componentes celulares essenciais. Em alguns casos, a catalase produzida por microrganismos pode proteger o patógeno, convertendo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. A eficácia desse biocida também depende da concentração utilizada, sendo tipicamente mais eficaz contra bactérias Gram-positivas (Výrostková *et al.*, 2020). Isso é relevante ao comparar a menor eficiência do peróxido contra microrganismos Gram-negativos, como evidenciado pela porcentagem das linhagens com ausência de halo de inibição.

O iodopolvidona, amplamente conhecido por seu amplo espectro antimicrobiano, tem demonstrado eficácia contra tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (Lepelletier *et al.*, 2020). No entanto, em nosso estudo, observou-se que 10,71% das linhagens testadas apresentaram resistência frente à iodopovidona, indicando a presença de variantes bacterianas capazes de tolerar esse biocida. Essa resistência pode refletir um mecanismo de adaptação microbiana ao uso frequente do iodo em desinfecção, levantando preocupações sobre a potencial diminuição de sua eficácia em longo prazo. Embora a maioria dos isolados tenha mostrado susceptibilidade ao iodo, a existência de resistência em

uma fração significativa das linhagens testadas destaca a necessidade de monitoramento contínuo e avaliação crítica do uso de iodopovidona como desinfetante, especialmente em contextos onde a eliminação completa de patógenos é essencial (Barreto *et al.*, 2020).

A clorexidina demonstrou alta eficácia antimicrobiana, evidenciada pela ausência de linhagens sem halo de inibição, em contraste com os demais biocidas testados. Ainda, cerca de 57% (16) dos isolados apresentaram halos de inibição superiores aos observados para a cepa controle *E. coli* ATCC 25922, indicando uma susceptibilidade considerável a esse biocida. Esses resultados sugerem que a clorexidina continua sendo uma opção eficaz para a desinfecção, particularmente devido à sua ação abrangente contra bactérias Gram-negativas. A ausência de resistência entre as linhagens testadas reforça a importância de seu uso em contextos onde a eliminação eficiente de microrganismos é crítica, destacando sua superioridade em comparação com outros biocidas, como iodopovidona e peróxido de hidrogênio.

O hipoclorito de sódio demonstrou eficácia notável como biocida, com todas as linhagens testadas apresentando halos de inibição, sem nenhuma evidência de resistência completa. Além disso, 42,85% dos isolados exibiram halos de inibição maiores do que os observados para a cepa controle *E. coli* ATCC 25922, sugerindo uma elevada susceptibilidade ao hipoclorito. O hipoclorito de sódio atua como um agente oxidante potente, cuja eficácia deriva da liberação de ácido hipocloroso (HOCl) em solução aquosa. Este composto é altamente reativo e capaz de penetrar nas membranas celulares dos microrganismos, promovendo a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Souza; Daniel, 2005). A aplicação do hipoclorito de sódio na sanitização de verduras é de grande relevância no contexto da segurança alimentar. Além disso, o hipoclorito é um saneante acessível e economicamente viável (Cavalcante; De Assis, 2020).

A redução na suscetibilidade a biocidas e a persistência de bactérias patogênicas em superfícies, podem contribuir para a co-seleção silenciosa de antimicrobianos e representar um problema de saúde global. A exposição a biocidas e a outros antimicrobianos podem induzir adaptações bacterianas aumentando sua resistência, especialmente em patógenos transmitidos por alimentos (Ghanem; Haddadin, 2018).

Conclusão

Os resultados deste estudo indicam uma variabilidade na suscetibilidade das linhagens de *E. coli* isoladas de hortaliças folhosas frente a diferentes biocidas. Foi observado uma suscetibilidade reduzida ao peróxido de hidrogênio e à iodopovidona, enquanto a clorexidina e o hipoclorito de sódio mostraram-se mais eficazes em promover a inibição do crescimento microbiano. Estes achados ressaltam a importância de uma escolha criteriosa de biocidas para a sanitização de hortaliças, visando minimizar os riscos de contaminação microbiológica. Estes resultados sugerem a necessidade de estudos adicionais para investigar o impacto do uso prolongado desses biocidas no controle de patógenos em alimentos.

Referências

BARRETO, R. *et al.* Addressing the challenges in antisepsis: focus on povidone iodine. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 3, p. 106064-106099, 2020.

BOCK, L. J. Bacterial biocide resistance: a new scourge of the infectious disease world?. **Archives of Disease in Childhood**, v.104, n.11, p. 1029-1033, 2019.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. CLSI supplement M100. 2019. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>. Acesso em: 10 jun. 2024.

CAVALCANTE, R. R.; DE ASSIS, R. C. Utilização de ácidos orgânicos como alternativa para higienização de alimentos: uma revisão integrativa. **Holos Environment**, v. 20, n. 3, p. 335-351, 2020.

GHANEM, B.; HADDADIN, R. N. Multiple drug resistance and biocide resistance in *Escherichia coli* environmental isolates from hospital and household settings. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v.7, n.47, p. 1-7, 2018.

IGBINOSA, E. O. *et al* Multidrug-resistant extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* from farm produce and agricultural environments in Edo State, Nigeria. **PLOS ONE**, v.18, n.3, p. e0282835, 2023.

JONES, A.; JOSHI, A. T. Biocide use in the antimicrobial era: a review. **Molecules**, v. 26 n. 8, p. 2276-2287, 2021.

LAMARQUE, G. C. C. *et al*. Could chlorhexidine be an adequate positive control for antimicrobial photodynamic therapy in-in vitro studies?. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, p. 58-62, 2019.

LEPELLETIER, D. *et al*. Povidone Iodine: Properties, Mechanisms of Action, and Role in Infection Control and *Staphylococcus aureus* Decolonization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 9, p. 10.1128/aac. 00682-20, 2020.

MENEZES, K. V. *et al*. Virulence Factors and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Commercialized Fresh Cheese in the South of Espírito Santo. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 54, n. 3, p. 2063-2071, 2023.

PEREIRA, M. P.; WANG, X.; TAGKOPOULOS, I. Biocide-induced emergence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 640923-640935, 2021.

RAMOS, S. *et al*. *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Production. **Animals**, v. 10, n. 12, p. 2239-2254, 2020.

ROZMAN, U. *et al*. Reduced susceptibility and increased resistance of bacteria against disinfectants: A systematic review. **Microorganismos** v. 9, n. 12, p. 2550-2572, 2021.

SAMTIYA, M. *et al*. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: Trends, Mechanisms, Pathways, and Possible Regulation Strategies. **Foods**, v. 11, n. 19, p. 2966-2986, 2022.

SILVA, E. B. M. *et al*. Bebidas Mistas de Frutas e Vegetais no Contexto de Alimentação Saudável: uma Revisão de Literatura. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 273-282, 2020.

SOUZA, J. B.; DANIEL, L. A. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 10, p. 111-117, 2005.

VÝROSTKOVÁ, J. *et al*. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and caprylic acid on selected foodborne bacteria. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 23, n. 3, p. 439–446, 2020.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).