



Área: CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA SOBRE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Mônica Aparecida da Silva*, Anderson Henrique Venâncio, Bruna Azevedo Balduino
Crislaine Klaid do Amaral, Sabrina de Souza Nascimento, Roberta Hisdorf Piccoli

Laboratório de Microbiologia de alimentos, Curso de Bacharelado em Nutrição, Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

*E-mail: mondiga25@gmail.com

RESUMO – *Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva associada à infecções alimentares ocorridas na forma de surtos. A listeriose de origem alimentar pode ser evitada através de práticas que proporcionem um controle microbiológico rigoroso sobre matéria-prima, ambiente e colaboradores. A atual demanda dos consumidores por produtos naturais tem levado a investigação sobre novos agentes antimicrobianos a partir de plantas que melhoram a segurança de produtos alimentícios. Objetivou-se com esse estudo a determinação da concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), contra *L.monocytogenes* ATCC 15313. A CMB do óleo essencial foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, em triplicata e três repetições, em placas de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o NCCLS, com adaptações. O óleo essencial foi diluído em TSB contendo 0,6% (v/v) de extrato de levedura e 0,5% (v / v) de Tween 80, obtendo concentrações de: (%): 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,03 e 0,015 (v/v). Aliquotas de 150 µL das soluções de óleos essenciais foram adicionadas nas cavidades contendo 150 µL TSB e assim sucessivamente até obter as concentrações propostas. Inoculou-se então 10 µL da cultura padronizadas a 10⁸ UFC/mL e as microplacas foram vedadas e incubadas a 37°C/24h. Em seguida alíquotas foram plaqueadas em TSA com extrato de levedura 0,6% (v/v) incubadas por 37°C/24h. O óleo essencial de melaleuca apresentou CMB 2,0%. O resultado indica o óleo essencial de melaleuca como um potencial antimicrobiano no controle de *Listeria monocytogenes*, uma bactéria patogênica de origem alimentar.

Palavras-chave: Antibactericida natural; listeriose; conservante alimentar; patogênico alimentar.

1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é uma bactéria de gênero Gram positivo, constituída pelas espécies *Listeria grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. monocytogenes*, sendo que entre estas, a ultima é caracterizada como patogênica para humanos. Ela possui a forma de coccobacillus e mantém a habilidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura que oscila de - 0,4 ° C a 45 ° C, como também em pHs no intervalo de 4,0 a 9,6 (6-8, pH ótimo), em ambientes aeróbicos e anaeróbicos com até 0,90 na faixa de atividade de água (aw) (KUMARASWAMY et al., 2018; PALMA et al., 2016; VÄLIMAA; TILSALA-TIMISJÄRVI; VIRTANEN, 2015).

Ela possui a habilidade de se fixar em diferentes meios de superfícies, a exemplo os de aço inoxidável e o de poliestireno, onde consegue sobreviver por longos períodos, até mesmo anuais na forma de biofilmes. Estes filmes de proteção a permitem tolerar a ampla gama de agentes estressores, como temperaturas, sanitizantes e antimicrobianos caso o processo de saneamento não seja bem executado, resultando na contaminação de alimentos que entrem em contato com essas superfícies (VÄLIMAA; TILSALA-TIMISJÄRVI; VIRTANEN, 2015; ROBERTS et al., 2020).

A doença acometida pela contaminação deste tipo de bactéria denomina-se listeriose. Ela possui 13 sorotipos destacando-se entre eles quatro, 4b, 1/2a, 1/2b e 1/2c, são eles os promotores de mais de 95% das ocorrências clínicas de listeriose nos humanos e o consumo de alimentos contaminados se mantém como principal veículo de transmissão para essa patologia (PALMA et al., 2016).

Quando humanos consomem alimentos infectados por *Listeria Monocytogenes*, podem ter como consequência uma infecção de variáveis efeitos, acometendo de gastroenterite acompanhada por febre, sem expansão quando ocorrida em pessoas saudáveis, à bacteremia, resultando em risco de morte, meningite, cerebrite, rombencefalite e infecção focal na população classificada em maior risco, formada por mulheres grávidas, neonatos, pacientes imunocomprometidos e os idosos. Sua ação impactante se deve ao fato de conseguir atravessar as três importantes barreiras para os humanos, a intestinal, a hematoencefálica e a fetoplacentária (KUMARASWAMY et al., 2018; LECUIT, 2005).

Existem também na literatura casos de complicações mais raras, porém de grande seriedade como a endocardite. Os casos afetam cerca de 8% dos pacientes com listeriose e podem resultar frequentemente em complicações embólicas levando a um desfecho de 37– 50% de mortes, havendo sido relatada pela primeira vez em 1955 (KUMARASWAMY et al., 2018).



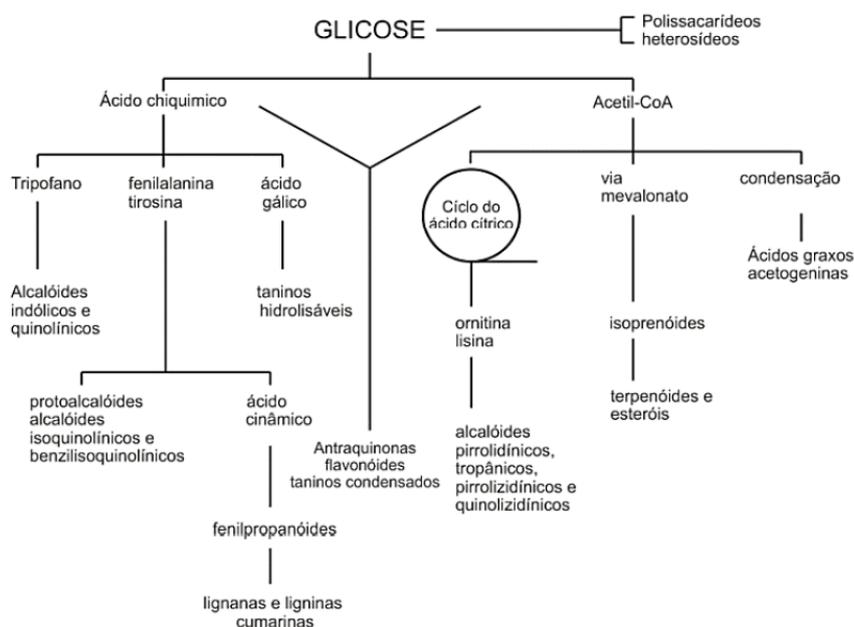
Diante do reconhecimento dos impactos infestos ocasionados pela bactéria é primário que seja seguido as boas práticas de fabricação e higiene ao longo do processo produtivo, de estocagem e de distribuição dos alimentos, reforçando estas atividades de prevenção também nos domicílios a fim de precaver a listeriose. A OMS (Organização Mundial da Saúde) recomenda a refrigeração dos alimentos a temperaturas inferiores aos 5°C e esse controle é eficaz em delimitar o desenvolvimento exponencial de organismos como a *Listeria monocytogenes* nos alimentos industrializados (EFSA, 2020).

Os conservantes alimentares são capazes de oferecer aos alimentos processados sabores semelhantes ao de produtos preparados na hora, tendo inserida a vantagem da extensão vida útil destes alimentos e a inibição do crescimento de microrganismos. Um aditivo alimentar tem como uma das suas definições ser um produto químico adicionado a um alimento, o que seria capaz de reduzir a naturalidade do item, porém uma adição química de ascendência natural pode contrariar tal conotação e fornecer benefícios, atendendo a demanda dos consumidores por alimentos seguros e com qualidade (CHOTYAKUL; BOONNOON, 2016).

Essa crescente busca dos consumidores impõe a oferta de um alimento o mais natural possível e sem aditivos sintéticos como fosfatos, cloreto de sódio (NaCl), nitrito e nitrato, sendo esses dois últimos eficientes em desacelerar quase todas as bactérias patogênicas e deteriorantes, além de melhorar o sabor, porém já é de conhecimento do grande público consumidor que o alto consumo dos aditivos pode gerar riscos à saúde do cólon, do pâncreas e do estômago, devido a reações no ambiente gástrico após ingestão desses alimentos, gerando nitrosaminas, conhecidas como substâncias cancerígenas, além das chances de gerar hipersensibilidade e asma (CHOTYAKUL; BOONNOON, 2016; RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005).

Os óleos essenciais são originados de plantas medicinais e aromáticas, possuem uma farta mistura de substâncias químicas advindas do metabolismo secundário, (Figura 1) como a família dos terpenos, aldeídos, álcoois, ésteres, éteres, fenólicos e cetonas. Encontram-se de forma concentrada e líquida, são límpidos, coloridos e lipofílicos. Com relevantes funções para as indústrias dos mais diversos segmentos, os óleos essenciais representam um forte potencial econômico. Há o conhecimento de cerca de 3000 OE, sendo aproximadamente 300 de maior importância para a produção farmacêutica, alimentícia, de cosméticos entre outras (BAKKALI et al., 2008; NAZZARO et al., 2013; SWAMY; AKHTAR; SINNIHA, 2016).

Figura 1– Ciclo biossintético de metabólitos secundários em plantas.

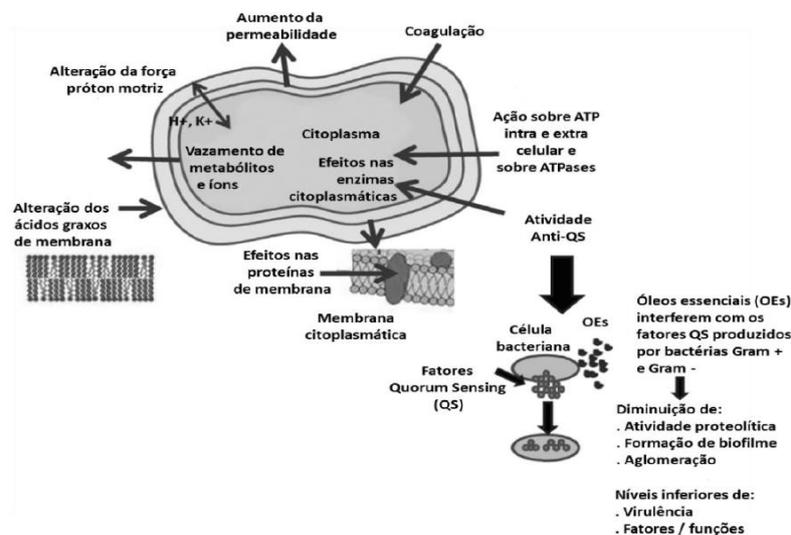


Fonte: Santos (2000)

As propriedades biológicas dos compostos são influenciadas pelo local onde se encontram os grupos funcionais nas partículas e diante de situações estressoras as quais as plantas podem ser submetidas, enzimas específicas ativam essas moléculas caso elas não sejam naturalmente ativadas na planta a fim de garantir sua sobrevivência. Os mecanismos da atividade dos OE, Figura 2, e seus compostos não podem ser descritos por uma única linha de ação, mas em regra atuam coibindo o crescimento bacteriano e a produção dos seus metabólitos tóxicos (NAZZARO et al., 2013; SWAMY; AKHTAR; SINNIHA, 2016).



Figura 2– Sítios de ação dos óleos essenciais sobre células bacterianas.



Fonte: Adaptado de Nazzaro et al. (2013).

Sua eficácia se deve ao fato de atuarem em múltiplos alvos na célula microbiana. Possuem propriedade lipofílica, tornando-os capazes de se agregar às membranas bacterianas, seguido por modificação da sua permeabilidade e promovendo o extravasamento do conteúdo celular, uma vez que essa etapa ocorra é possível que haja morte celular. Outra consequência possível é a geração de danos às proteínas de membrana ou alteração na síntese de ATP, culminando na redução do pool intracelular de ATP, além de interferência na síntese proteica intracelular. É importante salientar que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais se compõe por mecanismos diversos, sendo afetada diretamente pela composição deles e pela quantidade individual de cada componente. (NAZZARO et al. 2013; SOUZA, 2016).

Perante o exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar a concentração mínima bactericida do óleo essencial de melaleuca contra a cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de condução do experimento

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

2.2 Óleos essenciais

O óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) foi adquirido da FERQUIMA® Indústria e Comércio Ltda (Brasil).

2.3 Microrganismos e cultura estoque

A cepa empregada foi *L. monocytogenes* ATCC 15313, pertencente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos/ DCA-UFLA, adquiridas da Seção de Coleção de Culturas da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo-SP.

As culturas estoques foram mantidas congeladas em caldo de congelamento (glicerol 15%, peptona bacteriológica 0,5%, extrato de levedura 0,5% e água destilada), até a sua utilização. Anterior ao seu uso foi confirmada a identidade dos microrganismos por meio do equipamento MALDI-TOF MS.

2.4 Preparo e padronização do inóculo

A reativação da cepa foi realizada inoculando uma alíquota de 1 mL da cultura estoque em tubo de ensaio, contendo 10 mL de caldo de triptona de soja acrescido de extrato de levedura 0,6% (TSB- EL), e incubado a 37 °C por 24 horas.



Após esse período, alíquota de 100 µL da cultura foi transferida para 100 mL de TSB-EL e incubada a 37 °C até a obtenção de cerca de 10⁸ UFC.mL⁻¹.

A padronização do inóculo foi realizada com uma curva de crescimento. A densidade óptica (DO 600nm) foi monitorada juntamente com a contagem em placa contendo ágar tripton de soja (TSA) mais 0,6% (m / v) de extrato de levedura (EL). A absorvância encontrada 0,135 para *L. monocytogenes* ATCC 15313, à concentração de 10⁸ UFC. mL⁻¹.

2.5 Determinação da concentração mínima bactericida do óleo essencial contra *Listeria spp.*

A concentração mínima bactericida do óleo essencial de melaleuca foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo com adaptações, utilizando placas de poliestireno de 96 cavidades (CLSI, 2019). Os óleos essenciais foram solubilizados em TSB- EL, acrescido de Tween 80 (0,5%). Foram avaliadas as seguintes concentrações: 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62 e 0,31 mg/mL. Aliquotas de 100 µL das soluções foram adicionadas nas cavidades e inoculadas com 10 µL das culturas padronizadas. As microplacas foram vedadas e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas das culturas em TSA-EL e incubadas a 37 °C por 24 horas. Foi realizado um controle negativo, contendo TSB-EL acrescido de 0,5% de Tween 80 e o óleo essencial. Considerou-se como concentração mínima bactericida (CMB) do componente, a concentração que após a incubação não obteve crescimento bacteriano em placas. O experimento foi realizado em triplicata e três repetições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a cepa ATCC 15313 o óleo essencial de melaleuca apresentou a CMB de 2%.

Silva et al. (2019) determinaram uma CMB de 1,5 x 10⁻⁴ mg/ml utilizando óleo essencial de melaleuca aplicado em uma cepa de *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e concentração mínima inibitória (CMI) de 1,0x10⁻⁴ mg/ml. As concentrações também diferenciaram das encontradas por Mazzarrino et al. (2015), que obteve CMI de 1,0x10⁻³ mg/ml utilizando a mesma cepa. Esse resultado pode estar relacionado à variação da concentração de compostos majoritários do óleo, como de terpinen-4-ol que variava em cerca de 5% de predominância na composição, segundo os autores. A atividade dos óleos essenciais está condicionada à capacidade de desestruturar a parede e membrana celular bacteriana, aumentando sua permeabilidade por meio de alterações na conformação de alguns polissacarídeos, ácidos graxos além das camadas de fosfolípidios (GUTIÉRREZ-DEL-RÍO; FERNÁNDEZ; LOMBÓ, 2018).

4 CONCLUSÃO

Verificou-se que o óleo essencial de melaleuca possui ação bactericida sobre as células da cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC15313.

A capacidade do óleo essencial de inibir o crescimento bacteriano permite que o mesmo possua potencial para ser utilizado como antimicrobiano natural na indústria de alimentos.

5 REFERÊNCIAS

- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology, Oxford**, v. 46, p.446-475, 2008.
- CHOTYAKUL, N.; BOONNOON, N. High Pressure Food Processing: an Alternative Technology To Reduce Food Additives Used in Processed Meat Products. **Panyapiwat Journal**, Tailândia, v. 8, n. 1, p. 327- 341, 2016.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria**; 11. ed. Wayne, PA: CLSI document M100, 2019.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2020). **Listeria**. Acesso em: 09 dez. 2020. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/listeria>.
- GUTIÉRREZ-DEL-RÍO, I.; FERNÁNDEZ, J.; LOMBÓ, F. Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: Terpenoids, polyphenols and thiols. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 52, n. 03, p. 1-7, Sept. 2018.
- KUMARASWAMY, M. et al. *Listeria monocytogenes* endocarditis: case report, review of the literature, and laboratory evaluation of potential novel antibiotic synergies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 468–478, 2018.
- LECUIT, M. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. **Clinical Microbiology and Infection**, USA, v. 11, n. 6, p. 430–436, 2005.
- MAZZARRINO, G. et al. *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. **Food Control**, Vurrey, v. 50, p. 794-803, Apr. 2015.
- NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 06, n. 12, p. 1451-1474, Nov. 2013.



- PALMA, J. M. et al. Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 10, p. 957–964, 2016.
- ROBERTS B. N. et al. *Listeria monocytogenes* response to anaerobic environments. **Pathogens**, Basel, v. 09, n. 03, p. 210-219, Mar. 2020
- RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Reducing sodium intake from meat products. **Meat Science**, v. 70, n. 3, p. 531–541, 2005.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões, C.M. O. et al., (Org.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da universidade, 2000, p.333-365.
- SILVA, C. S. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Melaleuca Alternifolia* (Tea tree) essential oil in ground beef. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 293, p. 79-86, Mar. 2019.
- SOUZA, E.L. The effects of sublethal doses of essential oil and your constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance entre food-related bacteria: A review. **Trends in Food Science & Technology**, Netherlands, v. 56, p. 1-12, 2016.
- SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIHAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. **Evidence- based Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 1, n. 1, p. 1–21, 2016.
- VÄLIMAA, A. L.; TILSALA-TIMISJÄRVI, A.; VIRTANEN, E. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain- A review. **Food Control**, Vurrey, v. 55, p. 103–114, 2015.