



## 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 10<sup>8</sup> 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 última 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).



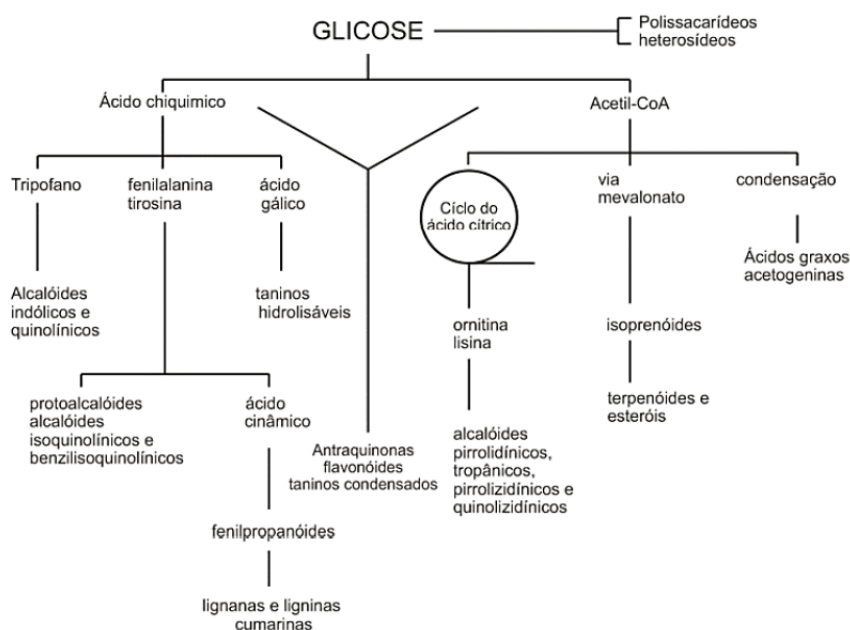
Diante do reconhecimento dos impactos infestos ocasionados pela bactéria é primário que seja seguido as boas práticas de fabricação e higiene ao longo do processo produtivo, de estocagem e de distribuição dos alimentos, reforçando estas atividades de prevenção também nos domicílios a fim de precaver 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.

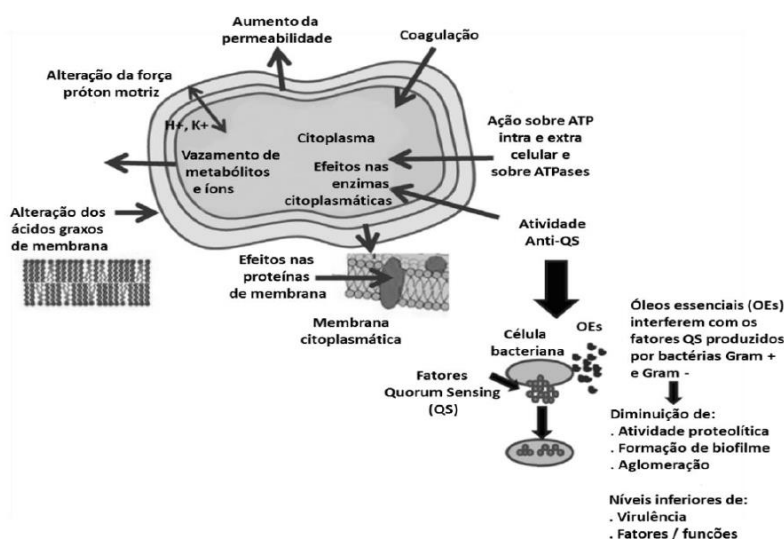


Fonte: Santos (2000)

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 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

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 10<sup>8</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>.

## 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. Alíquotas 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<sup>-4</sup> mg/ml utilizando óleo essencial de melaleuca aplicado em uma cepa de *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e concentração mínima inibitória (CMI) de 1,0x10<sup>-4</sup> mg/ml. As concentrações também diferenciaram das encontradas por Mazzarrino et al. (2015), que obteve CMI de 1,0x10<sup>-3</sup> 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.