



Área: Ciência de Alimentos

EFEITO ANTI-LISTERIAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO

**Anderson Henrique Venâncio*, Bruna Azevedo Balduino ,
Francielly Corrêa Albergaria, Mônica Aparecida da Silva, Sabrina de Souza Nascimento,
Roberta Hilsdorf Piccoli**

Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

**E-mail: anderson123dfgh21@gmail.com*

RESUMO – Os óleos essenciais são substâncias naturais que apresentam atividades biológicas, sendo a antimicrobiana um alvo de pesquisas, com destaque, sob a inibição da bactéria *Listeria monocytogenes*. Visto que, é um microrganismo resistente às condições inóspitas na indústria de alimentos devido suas características fisiológicas, e com isto, pode representar um risco a saúde do consumidor. Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito anti-listerial do óleo essencial de tomilho sobre a bactéria *Listeria monocytogenes* ATCC 19177. O óleo essencial de tomilho foi solubilizado em um eppendorf, contendo caldo triptona de soja (TSB) acrescido de 0,6% (m/v) de extrato de levedura e 0,5% (v/v) de Tween 80. Foram avaliadas as concentrações de 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 % (v/v). Aliquotas de 10 µL da cultura padronizada a 10⁸ UFC/mL foram inoculadas nas microplacas, e elas foram vedadas e incubadas a 37°C/24h. Após incubação, alíquotas de 10 µL foram transferidas para ágar triptona de soja (TSA) acrescido de 0,6% (m/v) de extrato de levedura, empregando-se a técnica de plaqueamento em microgota. As placas foram incubadas a 37°C/24h. A concentração mínima bactericida (CMB) foi definida como a menor concentração onde não houve crescimento do microrganismo. O experimento foi conduzido com três repetições e em triplicata. A menor concentração que apresentou efeito de inibição na *Listeria monocytogenes* foi de 1%. Os resultados demonstram que o óleo essencial de tomilho pode ser utilizado como conservante, entretanto devem existir mais estudos para que eles não possam impactar nas características sensoriais dos produtos.

Palavras-chave: Conservantes naturais; Bactérias patogênicas; Infecção alimentar.

1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é uma bactéria patogênica que causa um ciclo intracelular grave de infecção, capaz de causar danos as células epiteliais intestinais, podendo também atingir a corrente sanguínea desenvolvendo a septicemia, podendo comprometer a saúde de pessoas imunocomprometidas como mulheres grávidas e idosos, sendo capaz também de gerar outros tipos de doenças, inclusive causar a morte (RADOSHEVICH; COSSART, 2018). Além disso, é considerada emergente podendo contaminar os alimentos que quando consumidos causam uma zoonose chamada de listeriose em seres humanos e animais (GARCÍA et al., 2018).

É uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa, não formadora de esporos, catalase positiva, que se multiplica em pH entre 4.1-9.6 e se multiplica em temperaturas entre 1°C - 45°C. Também é resistente a altas concentrações de sal (10%) e se multiplica em superfícies, utensílios e outros objetos dentro da indústria de alimentos (BHUNIA, 2008). É um patógeno intracelular, apresenta um composto lipídico no envelope celular semelhante ao lipopolissacarídeo (LPS) encontrado na membrana externa das bactérias Gram-negativas, assim se diferenciando de outras bactérias Gram-positivas. É capaz de produzir uma substância que é secretada para fora de sua célula, a listeriolisina (LLO) uma hemolisina que entra dentro da célula epitelial intestinal multiplicando o microrganismo de célula em célula (JAY, 2005). Existem seis espécies do gênero *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. grayi*. Sendo a *L. monocytogenes* um patógeno que utiliza como hospedeiros seres humanos e animais (BHUNIA, 2008).

Assim, devido aos perigos alimentares, estratégias estão sendo buscadas dentro da indústria de alimentos para manter o controle de qualidade em relação à inativação de *Listeria monocytogenes* e manutenção da inocuidade dos produtos. Dentre essas, estudos *in vitro* estão sendo desenvolvidos com antimicrobianos naturais, que apresentam grande apelo comercial, devido a exigência dos consumidores por produtos mais saudáveis. Como exemplo de substâncias naturais com potencial efeito antimicrobiano, têm-se os óleos essenciais, que são substâncias obtidas das plantas ou de suas partes, por processos de hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor, bem como de pericarpos de frutas cítricas, sem envolver processo de aquecimento (SIMÕES et al., 2007).

Podem ser utilizadas diferentes partes da planta para se obter o óleo essencial, como: caules, cerne, rizomas, folhas, flores e outras partes como o os próprios frutos. Dependendo de sua concentração, o óleo essencial pode estar depositado em determinada parte da planta, com a presença de seus compostos majoritários que muitas vezes tem maior



efeito antimicrobiano (SIMOES et al., 2007). De acordo com Jakiemiu et al. (2010), fatores como a época de colheita, o clima e o solo são responsáveis por influenciar o rendimento e a composição química dos óleos essenciais. Os estudos ganham destaque e o emprego dos óleos essenciais nos produtos alimentares está cada vez mais sendo estudado, mas as utilizações de altas concentrações podem impactar na qualidade sensorial do produto.

Como características físico-químicas, os óleos essenciais são líquidos a temperatura ambiente, oleosos, voláteis, de origem vegetal, com uma alta complexidade, são ligeiramente amarelados com exceção do óleo essencial de camomila que apresenta uma coloração azul devido ao alto teor de azuleno. São denominados também de óleos etéreos e apresentam aromas muito peculiares. Quimicamente são constituídos de uma mistura composta por fenilpropanóides e terpenóides sendo a classe dos terpenos em maiores quantidades, cerca de 90% (SIMÕES et al., 2007). Apresentam diversas atividades biológicas como expectorantes, antioxidantes, entre outras, sendo a antimicrobiana um alvo de estudos *in vitro* e com aplicações em matrizes alimentares. Além disso, eles apresentam em sua composição vários componentes químicos, como os ácidos fenólicos, efetivos para o rompimento da membrana plasmática bacteriana, sendo utilizados em alimentos como substituintes de conservantes sintéticos e inibindo patógenos graves e microrganismos que podem causar prejuízo às diversas culturas (BHAVANIRAMYA et al., 2019).

O tomilho (*Thymus vulgaris*) é uma planta pertencente à família Lamiaceae, apresentando 150 gêneros, que produz durante o metabolismo secundário o óleo essencial (ALMEIDA, 2014; JAKIEMIU et al., 2010). Diversos estudos têm demonstrado a presença de compostos majoritários do óleo essencial de tomilho. Jakiemiu et al. (2010), estudando a caracterização do óleo essencial de tomilho, encontrou o timol, p-cimeno, carvacrol, γ -terpineno, linalol e borneol como compostos majoritários. Santos et al. (2020) caracterizando o óleo essencial de tomilho encontrou como compostos destaques o m-Cimeno, alfa pinemo e carvacrol. Existem centenas de compostos químicos nos óleos essenciais e muitos deles exercem atividade antimicrobiana principalmente por desintegrar a membrana plasmática levando ao rompimento celular.

Devidos suas atividades biológicas os óleos essenciais atuam na inibição de várias bactérias patogênicas de origem alimentar, entretanto suas concentrações quando altas e aplicadas nos alimentos podem impactar na qualidade sensorial dos produtos alimentares. Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito antilisterial do óleo essencial de tomilho *in vitro* sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644 e determinar a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir a bactéria.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de condução das análises

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

2.2 Ativação, manutenção, estocagem e padronização dos inóculos

A cepa utilizada no experimento foi a bactéria *Listeria monocytogenes* ATCC 19177, cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Os inóculos congelados foram reativados em caldo triptona de soja (TSB) adicionado de 0,6% de extrato de levedura. Após descongelamento, 100 μ L de cada cepa foi transferido para tubos contendo 5 mL de TSB e incubadas a 37°C por 24h. A verificação da pureza das culturas foi realizada pelo plaqueamento de alíquotas das culturas em ágar Oxford e ágar Palcam com incubação a 37°C por 24h. Após cultivo, as colônias foram repicadas em TSB adicionado de 0,6% de extrato de levedura e incubadas a 3°C por 18h e identificadas pela técnica MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight). Após ativação, alíquotas de 1 mL de cada cultura foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 10.000 xg por 5 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e substituído por 1 mL de meio de congelamento (glicerol, 15 mL; peptona bacteriológica, 0,5 g; extrato de levedura, 0,3 g; NaCl, 0,5 g e água destilada, 100 mL, pH 7,0), o material foi homogeneizado e congelado a -18°C para utilização.

As culturas de *L. monocytogenes* foram padronizadas por curva de crescimento. Alíquotas dos inóculos ativados foram transferidas para frascos contendo 300 mL de TSB adicionado de 0,6% de extrato de levedura e incubadas a 37°C. As absorbâncias das culturas foram periodicamente aferidas (DO 600nm) em espectrofotômetro e alíquotas plaqueadas em ágar triptona de soja (TSA) adicionado de 0,6% de extrato de levedura. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e as colônias quantificadas. As culturas foram padronizadas em 10⁸ unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC.mL⁻¹).

2.3 Concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial

O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), foi adquirido da empresa Ferquima® e Flora Fiora®.



A concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial, foi realizada utilizando-se da técnica de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno contendo 96 cavidades com base no NCCLS (M7-A6) (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2003), com adaptações.

O óleo essencial de tomilho foi solubilizado em caldo BHI, acrescido de Tween 80 (0,5%) e extrato de levedura 0,6%. Posteriormente Alíquotas de 150 µL das soluções foram adicionadas nas cavidades, foi feita a técnica de microdiluição e inoculados 10 µL das cepas padronizadas e as microplacas vedadas e incubadas, a 37°C, por um período de 24h. Utilizou-se dois controles no experimento para cada óleo testado, o negativo, contendo BHI, 0,5% de Tween 80 e 0,6% de extrato de levedura e o controle positivo, contendo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e 0,6% de extrato de levedura e 10 µL da cultura padronizada. A concentração mínima bactericida foi a menor concentração onde não houve crescimento de microrganismos em placas. Foram avaliadas as concentrações de 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 % (v/v). O experimento foi conduzido em triplicata com três repetições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 está apresentada a concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de tomilho sob a inativação da *Listeria monocytogenes*.

Tabela 1. Concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de tomilho.

Concentração do óleo essencial de tomilho (%)	Crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i>		
1,0000	-	-	-
0,2500	+	+	+
0,1250	+	+	+
0,0625	+	+	+

(+) Presença de *Listeria monocytogenes*; (-) Ausência de *Listeria monocytogenes*.

Pela Tabela 1, nota-se que o óleo essencial de tomilho apresentou CMB de 1% (v/v). Embora tenha apresentado ação anti-listerial, a CMB obtida é considerada elevada, podendo alterar o sabor e odor dos alimentos quando aplicados em matrizes alimentares.

De acordo com Tarik (2019), o principal alvo dos óleos essenciais é a membrana plástica, havendo uma desintegração e extravasamento dos íons celulares e do conteúdo celular, assim, a célula conseqüentemente perde energia e morre. O mecanismo de ação dos óleos essenciais ainda não está completamente elucidado, dessa forma, pesquisas estão sendo desenvolvidas para estudar o seu mecanismo de ação nas células bacterianas. Alguns estudos estão sendo desenvolvidos (BOUHTIT, et al., 2021; GUO, et al., 2021; KAWACKA, et al., 2021).

O óleo essencial de tomilho apresenta atividades antimicrobianas sob diversos patógenos de origem alimentar, dentre eles, a bactéria *Listeria monocytogenes*. Reis et al. (2020) avaliando atividade antibacteriana do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris l.*) frente à patógenos alimentares, encontrou halos de inibição de tamanho médio de 1,47 cm para *L. monocytogenes in vitro* utilizando o método de difusão em ágar, mostrando sua atividade antimicrobiana.

Santos (2018), durante a determinação da concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de tomilho, determinou uma CMB de 0,1% para cepas de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*. Durante a caracterização química encontrou também o timol como componente majoritário do óleo essencial de tomilho. O autor ainda ressalta que, o óleo essencial estudado apresenta grande potencial como conservantes natural em alimentos.

Considerando que a aplicação de óleo essencial em alimentos pode ser limitada por alterações causadas nas características sensoriais, pesquisas têm sido realizadas demonstrando a utilização dos óleos essenciais em matrizes alimentares. Martins (2016) avaliou o uso de óleos essenciais na inibição de *Listeria monocytogenes* em mortadelas e constatou que houve uma redução da bactéria ao longo do armazenamento, demonstrando a aplicação prática, como conservantes naturais. Pinelli (2019) avaliou o uso de nanoemulsões de óleos essenciais em mortadela e observou uma redução no número de células vegetativas de *Clostridium sporogenes*. Pesavento et al. (2015) observaram a ação de óleos essenciais de orégano, tomilho e alecrim sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* em almôndegas de carne armazenada a 4°C, e verificaram que a adição de 0,5% dos três óleos pode ter ação tanto bactericida quanto bacteriostático.

Dessa forma, a aplicação de óleo essencial em produtos alimentares apresenta uma tendência de crescimento devido à preocupação da indústria de alimentos em reduzir o uso de conservantes sintéticos.

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial de tomilho apresentou uma concentração mínima bactericida de 1% sobre a inibição de *Listeria monocytogenes*, podendo ser utilizado como conservante natural dos alimentos. Apesar da concentração ser alta



deve-se desenvolver mais estudos para seu emprego nos alimentos, verificando seu efeito nas características sensoriais e na vida útil do produto.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UFLA, CAPES, CNPq e FAPEMIG.

6 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. F. **Atividade antioxidante e microencapsulação de extrato etanólico de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- BHAVANIRAMYA, S. et al. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 49–55. 2019.
- BHUNIA, A. **Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms and Pathogenesis**, New York, NY: Springer; 2008. pp. 165–82.
- BOUHTIT, F. et al. New Anti-Leukemic Effect of Carvacrol and Thymol Combination through Synergistic Induction of Different Cell Death Pathways. **Molecules**, v. 26, n. 2, Jan 2021. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000611462400001 >. Acesso em: 02 mar. 2021.
- GARCÍA, J.P. et al. Controle do crescimento de *Listeria monocytogenes* em co-cultura com *Lactobacillus plantarum*. **Colombian Journal of Biotechnology**, n. 20, v. 2, p. 68-77, 2018.
- GUO, F. Y. et al. Antimicrobial Activity and Proposed Action Mechanism of Linalool Against *Pseudomonas fluorescens*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000616709300001 >. Acesso em: 02 mar. 2021.
- JAKIEMIŪ, E. A. R. et al. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 683-688, 2010.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 347.
- KAWACKA, I. et al. Natural Plant-Derived Chemical Compounds as *Listeria monocytogenes* Inhibitors In Vitro and in Food Model Systems. **Pathogens**, v. 10, n. 1, 2021. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000611831700001 >. Acesso em: 02 mar. 2021.
- MARTINS, A. P. **Atividade bactericida de antimicrobianos naturais sobre *Listeria monocytogenes* inoculada em mortadela**. 2016. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 6th ed. Wayne, 2003. 88 p. (NCCLS Document, M7-A6).
- PESAVENTO, G. et al. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v. 54, p. 188-199, 2015.
- PINELLI, J. J. et al. Óleos essenciais e nanoemulsões como alternativas no controle de *Clostridium sporogenes* em mortadela. **Hig. alim.** n.33, v. 288, p. 2798-2802, 2019.
- RADOSHEVICH, L.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: para um quadro completo de sua fisiologia e patogênese. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, pág. 32-46, 2018.
- REIS, J. B. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares/Evaluation of antimicrobial activity of essential oils against food pathogens. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 1, p. 342-363, 2020.
- SANTOS, J. M. P. **Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria* spp. a óleos essenciais de plantas condimentares e ao estresse ácido**. 2018. 57f. Dissertação (Mestrado em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2018.
- SANTOS, R. S. I. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e determinação da CIM do óleo essencial de *Thymus vulgaris* sobre *Streptococcus mutans* e caracterização química do óleo por cromatografia gasosa. **XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação**- Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, 2020. Disponível em: http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2007/trabalhos/saude/inic/INICG00856_01O.pdf. Acesso em: 02 mar. 2021.
- SIMÕES, C. M. D. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6th ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.
- TARIQ, S. et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drugresistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, 2019.