

Área: Ciência de Alimentos

POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus reticulata* Blanco FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM ALIMENTOS

Élder Pacheco da Cruz^{2*}, Glória Caroline Paz Gonçalves², Kamila Furtado da Cunha¹,
Camila Waschburger Ames¹, Ângela Maria Fiorentini¹, Wladimir Padilha Da Silva¹

¹Laboratório de Microbiologia de Alimentos/Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial,

²Curso de Tecnologia em Alimentos/Centro de Ciências, Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA),

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

*E-mail: elder-pdc@hotmail.com

RESUMO – O uso de aditivos sintéticos em alimentos é necessário para a conservação dos mesmos, porém se forem consumidos em concentrações elevadas ou a longo prazo podem ocasionar danos à saúde do consumidor. Em razão disso, os consumidores buscam, cada vez mais, em não consumir produtos com tais substâncias. Com o intuito de inibir a multiplicação de micro-organismos patogênicos e aumentar o tempo de vida útil dos alimentos, os óleos essenciais (OE) vêm sendo pesquisados acerca de suas propriedades. Assim, o objetivo no presente trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano do OE de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) frente a *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 12900), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), através dos testes de difusão em ágar, determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). O OE de tangerina apresentou ação contra as bactérias avaliadas, no presente estudo. Com relação a CIM, a mesma demonstrou-se mais eficiente contra, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* O157:H7 NCT 12900 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, apresentando menores concentrações inibitórias e bactericidas. Portanto, o óleo essencial de tangerina apresentou ação antibacteriana frente aos patógenos alimentares, testados no presente estudo.

Palavras-chave: ação antibacteriana; bactérias Gram-negativa; bactérias Gram-positiva; tangerina.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, é crescente a busca por substâncias naturais que apresentem ação antibacteriana, auxiliando na preservação dos alimentos por mais tempo, uma vez que a presença de micro-organismos deteriorantes contribui para redução da vida útil dos alimentos e os patogênicos representam um potencial risco à saúde do consumidor. Além disso, o uso de aditivos sintéticos em alimentos pode ocasionar danos à saúde do consumidor, quando consumidos em concentrações elevadas ou a longo prazo. Associado a isso, se observa que

os consumidores buscam, cada vez mais, evitar o consumo de produtos com substâncias sintéticas (MALLET, 2011; OUSSALAH, 2007).

Vários estudos propõem avaliar as propriedades de diferentes plantas e seus extratos, dentre elas as propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Nesse contexto, destacam-se as frutas cítricas, como a tangerina, a qual apresenta uma diversidade de compostos bioativos como flavonóides e ácidos fenólicos, concentrados na casca, também apresentando alto valor nutricional (SUN et al., 2010; MAJO et al., 2005). Além disso, as indústrias de alimentos apresentam grande interesse nessas frutas, visto que das mesmas é possível obter diversos produtos, como sucos a partir da polpa e subprodutos oriundos do seu processamento, como as cascas, diminuindo a quantidade de resíduos produzidos (BIZZO et al., 2009; SMITH e HASSAIN, 2006).

Dentre os compostos bioativos que podem ser obtidos das plantas se destacam os óleos essenciais (OE), sendo considerados como misturas complexas de substâncias voláteis, de natureza lipofílica, líquido a temperatura ambiente, apresentando propriedades antissépticas, fitoterápicas, antivirais, antifúngicas e antibacterianas. Geralmente, são compostos por terpenos, seus derivados oxigenados, flavonóides, alcalóides, dentro outros compostos, podendo ser extraídos de diversas partes das plantas, como dos frutos, sementes, flores, folhas, cascas e raízes (BAKKALI et al., 2008; MALLET, 2011; PROBST, 2012).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA), são provocadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados por agentes químicos, físicos ou biológicos. Podendo ser provocadas por diversos grupos de micro-organismos, mas na maioria das vezes, são causadas por bactérias. Esses micro-organismos podem causar infecções alimentares, sendo causadas a partir da multiplicação no trato gastrointestinal, ou intoxicações, sendo quadro clínico proveniente da ingestão de toxinas. Os principais agentes envolvidos em surtos de DTA no Brasil, são *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2017). Também cabe ressaltar, que *Listeria monocytogenes* possui grande capacidade de multiplicação, tornando-se um grande problema nas indústrias alimentícias e na saúde pública, visto que as infecções causadas, pela mesma, apresentam altas taxas de mortalidade, cerca de 40% (FILHO, 2014).

Com o intuito de inibir a multiplicação de micro-organismos patogênicos, várias pesquisas propõem estudar a ação de OE, a fim de comprovar sua capacidade como substâncias antibacterianas e possíveis aplicações na área de alimentos. Com isso, este trabalho teve como objetivo determinar a ação antibacteriana do OE de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) contra *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *S. aureus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, na Universidade Federal de Pelotas. O óleo essencial foi adquirido comercialmente, através da empresa Bioessência, sendo avaliado sua ação frente a quatro cepas padrão, sendo elas *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 12900), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). As mesmas encontravam-se mantidas congeladas, sendo recuperadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI).

Primeiramente, foi realizado o teste de difusão em ágar, seguindo a metodologia proposta por *Clinical and Laboratory Standards Institute* – (CLSI, 2017). Foram preparados inóculos bacterianos em solução salina, correspondendo 0,5 na escala de *MacFarland* ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹), os quais foram semeados com auxílio de *swab* estéril na superfície do ágar Mueller Hinton (MH), em placas de Petri. Em seguida, foram sobrepostos discos de papel filtro esterilizados (6 mm) e acrescidos 10µL do OE. Como controle positivo utilizou-se discos de Gentamicina e como controle negativo discos acrescidos de 10 µL de água destilada esterilizada. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. O resultado foi expresso pela medida do halo de inibição (mm).

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), considerada como a menor concentração de OE capaz de inibir o crescimento bacteriano, utilizou-se a técnica de Microdiluição em caldo (CLSI, 2017). Adicionou-se o caldo BHI acrescido do emulsificante Tween 80 a 1% nos poços das microplacas e, em seguida foram feitas diluições seriadas de razão dois do OE, no meio de cultura, as quais variaram de 75 µL a 0,58 µL e, em seguida realizou-se a adição do inóculo bacteriano (10^4 UFC.mL⁻¹). Utilizou-se como controle positivo de crescimento, meio de cultura acrescido do inóculo bacteriano, como controle negativo utilizou-se apenas o meio de cultura e também se realizou um controle de esterilidade do OE. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, foi adicionado 20 µL do corante revelador Resazurina em todas as cavidades da placa, a fim de indicar possível atividade bacteriana, demonstrado pela alteração da cor roxa para rosa.

A determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), considerada como a menor concentração do OE capaz de inibir 99,9% das células bacterianas, foi feita a partir dos resultados obtidos na CIM. Para tal, foi retirada uma alçada de cada cavidade, que demonstrou inibição do crescimento bacteriano, semeando em placas contendo ágar BHI, sendo incubados a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação foi verificado quais concentrações de OE de tangerina apresentaram ação bactericida, indicado pela ausência de crescimento bacteriano (CLSI, 2017). Os testes foram realizados em triplicata, com três repetições para cada bactéria em estudo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Ação antibacteriana de óleo essencial de *Citrus reticulata* Blanco (tangerina) frente a bactérias patogênicas em alimentos

| Micro-organismo | Difusão em ágar (mm) | CIM (µL. mL ⁻¹) | CBM (µL. mL ⁻¹) |
|--|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 | 16 | 18,75 | 37,5 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 19,3 | 37,5 | 75 |
| <i>Escherichia coli</i> NCTC 12900 | 10 | 18,75 | 37,5 |
| <i>Salmonella</i> . Typhimurium ATCC 14028 | 9,3 | 18,75 | 37,5 |

CIM - Concentração Inibitória Mínima; CBM - Concentração Bactericida Mínima.

Referente ao teste de difusão em ágar, todas as cepas demonstraram-se sensíveis ao OE de tangerina apresentando maiores halos de inibição frente as bactérias Gram-positiva, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 25923. Em relação a CIM e CBM, foi observado que a concentração de 18,75 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ foi efetiva na inibição de *E. coli* NCTC 12900, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *L. monocytogenes* ATCC 7644. Entretanto, para inibição de *S. aureus* ATCC 25923 foi necessária maior concentração do OE.

Segundo Mothana e Lindequist (2005), para os OE serem considerados extratos com poder de ação moderadamente ativos devem ter ação na formação de halos de inibição de 8 a 13 mm, e extratos muito ativos devem formar halos de inibição maiores que 14 mm. De acordo com os resultados obtidos no teste de difusão em ágar, para o *S. aureus* ATCC 25923 (19,3mm) e *L. monocytogenes* ATCC 7644 (16mm), o OE tangerina apresentou-se como muito ativo), entretanto, para *S. Typhimurium* ATCC 14028 (9,3mm) e *E. coli* NCTC 12900 (10mm), o mesmo demonstrou-se como moderadamente ativo.

Estudos relataram a ação de extratos das cascas de frutas cítricas, como o realizado por ASHOK et al. (2011), onde os autores verificaram que extratos aquoso, etanólico e de cetona de cascas de *Citrus sinensi* (laranja) e *Citrus limon* (limão) apresentaram ação contra *E. coli*, *S. Typhi*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *S. aureus*. Entretanto, quando comparados os resultados de CIM e CBM ente os extratos das duas frutas, observou-se que foram necessárias menores concentrações para ter ação bacteriostática e bactericida a partir dos extratos de laranja. BOUDRIES et al. (2017), avaliando ação do OE de *Citrus reticulata* Blanco relataram que as bactérias Gram-positiva estudadas, *Listeria innocua*, *S. aureus*, *S. aureus* resistente à Metilina (MRSA), a Gram-negativa *E. coli* O157:H7 e também levedura *Candida albicans*, demonstraram-se sensíveis a ação do mesmo, o qual apresentou CIM de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ contra todos micro-organismos avaliados no estudo.

De acordo com BAJPAI et al. (2012), o potencial antibacteriano de OE deve-se a sua capacidade em penetrar e interagir com a membrana celular, causando uma alteração na estrutura da mesma e também proporcionando ação sobre as propriedades funcionais da célula, como a respiração. Como observado em nosso estudo, as bactérias Gram-negativa *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 e *S. Typhimurium* ATCC 14028, se mostraram mais susceptíveis a ação do OE quando comparadas com bactérias Gram-positiva, como *S. aureus* ATCC 25923.

Diferentemente dos resultados obtidos em nosso estudo, vários autores relatam que, geralmente, bactérias Gram-negativa demonstram-se menos sensíveis a ação desses compostos, o que pode ocorrer devido a presença da membrana externa de lipopolissacarídeos (LPS) na parede celular, evitando a difusão e o acúmulo do OE na célula bacteriana (PROBST, 2012; COX et al., 2000). No entanto, a composição de OE varia em decorrência de muitos fatores, como condições do local, clima, cultivo do fruto, forma de extração, e consequentemente alteram seu potencial antimicrobiano (BURT, 2004; NASCIMENTO et al., 2007).

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) possui ação frente as bactérias avaliadas no presente estudo, sendo mais eficaz contra *E. coli* O157:H7 NCTC 12900, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Para melhor demonstrar seu potencial, estudos futuros são necessários a fim de melhor elucidar sua ação antibacteriana e, posteriormente sua utilização em alimentos.

5 AGRADECIMENTOS

À UFPel, pela concessão da bolsa voluntária de iniciação à pesquisa (PVIP).

6 REFERÊNCIAS

- ASHOK KUMAR, K.; NARAYANI, M.; SUBANTHINI, A.; JAYAKUMAR, M. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of citrus fruit peels – utilization of fruit waste. **International Journal of Engineering Science and Technology** - IJEST, Singapore, v. 3, n. 6, p. 5414-21, jun. 2011.
- BAJPAI, V. K., BAEK, K.-H., & KANG, S. C.). Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. **Food Research International**, 45, 722-734, 2012.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-75, 2008.
- BOUDRIES, H.; LOUPASSAKI, S.; LADJAL ETTOUMI, Y.; ET AL. Chemical profile, antimicrobial and antioxidant activities of Citrus reticulata and *Citrus clementina* (L.) essential oils. **International Food Research Journal**, v.24, n.4, p. 1782-1792, 2017.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS**. 2017. Acesso em 26 março. 2018. Online. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta>
- BURT, S. A. **Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food** [PhD thesis]. Utrech: Utrecht University, p. 94, 2007.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th ed28. CLSI supplement M100. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2017.
- CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 11th ed11. CLSI supplement M07. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2017.
- COX, S. D., MANN, C. M., MARKHAM, J. L., BELL, H. C., GUSTAFSON, J. E., WARMINGTON, J. R., & WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, 88, 170–175, 2000.
- HADDAD FILHO, H. **Efeito do óleo essencial de gengibre e do pH sobre crescimento e indução de tolerância em *Listeria monocytogenes***. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, p. 85, 2014.
- MAJO, D.D.; GIAMMANCO, M.; GUARDIA, M.L.; TRIPOLI, E.; GIAMMANCO, S.; FINOTTI, E. Flavanones in Citrus fruit: Structure antioxidant activity relationships. **Food Res. Int.** 2005, 38, 1161–1166.
- MOTHANA, R. A.; LINDEQUIST U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. **Journal of Ethnopharmacology Etnopharmacology**, 96:177-181. 2005.

- MALLET, A. C. T. **Utilização de óleos essenciais de condimentos na conservação de queijos tipo Quark.** 2011. 132p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2011.
- NASCIMENTO, P. F. C. et al. **Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.
- OUSSALAH M. et al. 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.
- PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação do potencial sinérgico.** 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada)- Curso de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, 2012.
- SUN, Yinshi, et al. Simultaneous Determination of Flavonoids in Different Parts of *Citrus reticulata* 'Chachi' Fruit by High Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection. *Molecules*. Taian, v. 15, n. 8, p. 5379-5388, ago. 2010.