



## Área: Ciência de Alimentos

# EFEITO ANTIBACTERIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE COENTRO SOBRE *Listeria monocytogenes*

**Bruna Azevedo Balduino\*, Anderson Henrique Venâncio, Mônica Aparecida da Silva, Luara Aparecida Simões, Michelle Carlota Gonçalves, Roberta Hilsdorf Piccoli**

*Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Mestrado em Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*

\*E-mail: brunaazevedo.94@hotmail.com

**RESUMO** – *Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogênica, causadora de toxinfecção alimentar, que possui a capacidade de sobreviver em condições adversas e de formar biofilme sobre superfícies de processamento de alimentos, sendo de grande preocupação para a indústria alimentícia, já que pode causar listeriose em humanos, pela ingestão de alimentos contaminados. O uso de produtos naturais como conservantes em alimentos tem se destacado, uma vez que os conservantes sintéticos têm sido relacionados a certa toxicidade e impactos negativos à saúde. Dentre os antimicrobianos naturais destacam-se os óleos essenciais, substâncias com atividade antimicrobiana e potencial para o controle de bactérias patogênicas e deteriorantes. Esse trabalho teve como objetivo determinar a concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de coentro sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117. A CMB foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, em microplacas de poliestireno com 96 cavidades. O óleo essencial foi utilizado nas concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03 e 0,015% (v/v). Aliquotas de 10 µL da cultura padronizada em 10<sup>8</sup> UFC/mL foram inoculadas nas cavidades da microplaca, seguido de incubação a 37 °C/24 h. Após esse período, realizou-se o plaqueamento pela técnica de microgota, e incubação a 37 °C/24 h. A menor concentração do óleo em que não houve crescimento do microrganismo na placa foi denominada CMB. O experimento foi realizado em triplicata com três repetições. O óleo essencial de coentro apresentou efeito antibacteriano sobre *Listeria monocytogenes*, sendo sua CMB de 1% (v/v), o que demonstra seu potencial para ser utilizado como conservante natural.

**Palavras-chave:** Antimicrobianos naturais, bactéria patogênica, toxinfecção alimentar.

## 1 INTRODUÇÃO

Patógenos de origem alimentar estão relacionados a uma série de doenças, sendo uma das maiores causas de problemas de saúde pública no mundo. Essas doenças veiculadas por alimentos podem ser classificadas como infecção alimentar ou toxinose. A primeira é causada pela ingestão do patógeno, presente no alimento, que irá se estabelecer e multiplicar no organismo humano. Já a segunda ocorre pela ingestão da toxina produzida por um patógeno toxigênico no alimento (BINTSIS, 2017).

Dentre esses patógenos destaca-se *Listeria monocytogenes*, uma bactéria Gram-positiva, em forma de bastonete, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa e capaz de sobreviver e se multiplicar em condições adversas, como amplas faixas de pH (4,1 - 9,6), temperatura (1 - 45°C), altas concentrações de sal (10%) e até mesmo na presença de agentes antimicrobianos (BHUNIA, 2008; ROBERTS et al., 2020).

Devido sua capacidade de sobreviver em ambientes diversos, *L. monocytogenes* é capaz de se desenvolver em superfícies de processamento de alimentos, sendo grande preocupação para indústrias alimentícias, como laticínios e indústrias de carnes, frutas, hortaliças e alimentos prontos para o consumo (ROBERTS et al., 2020).

Uma vez presente no alimento, esse patógeno pode ser ingerido e causar listeriose, doença de origem alimentar com altas taxas de letalidade que afeta principalmente grupos mais susceptíveis, como recém nascidos, idosos, mulheres grávidas e indivíduos imunocomprometidos (BUCHANAN et al., 2017; KAWACKA et al., 2020; RODRIGUEZ et al., 2021). Já que, *L. monocytogenes* quando ingerida, tem a capacidade de atravessar as barreiras epiteliais, causar invasão celular e replicação intracelular devido a fatores de virulência como internalinas e hemolisinas (MATEREKE; OKOH, 2020).

Desse modo, uma forma de controlar a contaminação dos alimentos por patógenos alimentares se dá pelo uso de conservantes, que são aditivos alimentares capazes de eliminar os microrganismos ou inibir sua proliferação, além de reduzir o processo de deterioração durante a produção, transporte e comercialização (JU et al., 2019).

Os conservantes podem ser naturais ou sintéticos, sendo os sintéticos os mais utilizados pela indústria alimentícia. No entanto, devido à busca cada vez maior dos consumidores pela saudabilidade, aumentou-se o interesse pela substituição de conservantes sintéticos por alternativas naturais que atendam essa demanda (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019). Dentre essas alternativas, os óleos essenciais vêm se destacando.

Os óleos essenciais são misturas complexas, compostas por substâncias voláteis e odoríferas, provenientes do metabolismo secundário de plantas (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES et al., 2007). Eles são muito conhecidos por suas



propriedades antibacterianas, antivirais, antioxidantes, antiparasitárias e antimicóticas relacionadas a presença de um grupo funcional fenólico (VERGIS et al., 2015). Embora sejam muito utilizados pela indústria como aromatizantes, são antimicrobianos naturais com potencial para controle de bactérias patogênicas e deteriorantes, sendo, portanto, alternativa promissora (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

O coentro (*Coriandrum sativum*) é uma planta anual ou bienal pertencente à família Umbelliferae/Apiaceae, originária da região europeia mediterrânea e que atualmente é cultivada em todo o mundo (WEI et al., 2019). É uma especiaria muito utilizada na culinária mundial que possui fitoquímicos bioativos que lhe proporciona uma série de atividades biológicas como atividade anticâncer, neuroprotetora, ansiolítica, anticonvulsivante, analgésica, hipoglicêmica, hipotensora, hipolipidêmica, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (PRACHAYASITTIKUL; PRACHAYASITTIKUL; RUCHIRAWAT, 2018).

Estudos demonstram que o óleo essencial de coentro possui atividades antioxidantes, antifúngicas e antibacterianas, além de vários componentes químicos nas diversas partes da planta que contribuem para manutenção da vida útil dos alimentos, evitando o processo de deterioração. Portanto, como a planta não apresenta efeito tóxico aos seres humanos, seu óleo essencial pode ser utilizado em alimentos como conservantes e aromatizantes (MANDAL, 2015), sendo uma alternativa aos conservantes sintéticos.

Diante deste contexto, o objetivo do trabalho foi determinar a concentração mínima bactericida do óleo essencial de coentro sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de condução do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil.

### 2.2 Óleo Essencial

O óleo essencial de coentro (*Coriandrum sativum*) foi adquirido da empresa Oshadhi.

### 2.3 Microrganismo, manutenção e padronização do inóculo

A cepa bacteriana utilizada nesse estudo foi *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, adquirida da Seção de Coleção de Culturas da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-SP). A cultura estoque foi mantida em meio de congelamento (glicerol: 15 mL; peptona bacteriológica: 0,5 g; extrato de levedura: 0,3 g; NaCl: 0,5 g; água destilada: 100 mL) a -18 °C.

A cultura foi reativada pela transferência de alíquotas de 1 mL da cultura estoque para tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo tripton de soja acrescido de 0,6% (m/v) de extrato de levedura (TSB-YE), seguido de incubação a 37 °C por 24h. Após esse período, alíquota de 1mL da cultura foi transferida para frascos contendo 100 mL de TSB-YE, seguido de incubação a 37°C até obtenção de cerca de 10<sup>8</sup> UFC/mL. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento, na qual o crescimento do microrganismo foi monitorado por leituras periódicas da absorbância (D.O. 600nm) em espectrofotômetro (BEL SP-2000) e plaqueamento em superfície da cultura em meio ágar tripton de soja acrescido de 0,6% (m/v) de extrato de levedura (TSA-YE). As placas foram incubadas a 37 °C por 24h para posterior quantificação das colônias e padronização da cultura.

### 2.4 Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2019) com adaptações, em microplacas de poliestireno com 96 cavidades. Para tanto, preparou-se o caldo TSB acrescido de 0,6 % (m/v) de extrato de levedura e 0,5% (v/v) de Tween 80, para diluição do óleo essencial, que foi utilizado nas concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03 e 0,015% (v/v)

Alíquotas de 10 µL da cultura padronizada em 10<sup>8</sup> UFC/mL foram inoculadas nas cavidades da microplaca contendo 150 µL de TSB-YE acrescido de Tween 80 e das concentrações do óleo essencial. As microplacas foram então incubadas a 37 °C por 24h. Após esse período, realizou-se o plaqueamento pela técnica de microgota em meio TSA-YE, seguido de incubação das placas a 37 °C por 24h. A menor concentração do óleo onde não houve crescimento do microrganismo na placa foi denominada CMB. O experimento foi realizado em triplicata com três repetições. Utilizou-se dois controles no experimento, o negativo, contendo TSB, 0,5% de Tween 80, 0,6% de extrato de levedura e as concentrações do óleo essencial, e o controle positivo, contendo TSB acrescido de 0,5% de Tween 80, 0,6% de extrato de levedura e 10 µL da cultura padronizada.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial de coentro apresentou efeito antibacteriano sobre *L. monocytogenes* ATCC 19117, sendo sua CMB de 1% (v/v), como pode ser observado na Tabela 1.

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

Concentração (%)	Crescimento		
2,0	-	-	-
1,0	-	-	-
0,5	+	+	+
0,25	+	+	+
0,12	+	+	+
0,06	+	+	+
0,03	+	+	+
0,015	+	+	+

(-) ausência de crescimento visível; (+) presença de crescimento visível

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de coentro pôde ser observada em outros trabalhos. Teixeira et al. (2013) avaliaram a eficácia de dezessete óleos essenciais sobre sete cepas patogênicas de alimentos e observaram que o óleo essencial de coentro foi um dos doze óleos capaz de inibir o crescimento de todas as bactérias testadas, levando a uma redução significativa de *Listeria innocua* (8 log UFC/ mL) em meio líquido. Aliakbarlu, Sadaghiani e Mohammadi (2013) avaliaram a concentração mínima inibitória (CMI) de dez óleos essenciais sobre bactérias patogênicas de alimentos, sendo que o óleo essencial de coentro, quando testado sobre *L. monocytogenes*, foi o que apresentou menor ação antibacteriana, com uma CMI igual a 20 mg/mL.

Silva et al. (2011) estudaram o efeito antibacteriano do óleo essencial de coentro sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e avaliaram seu mecanismo de ação por citometria de fluxo. Foi observado ação antimicrobiana eficaz do óleo sobre todas as bactérias testadas e ao avaliar as funções celulares por citometria de fluxo, perceberam que o principal mecanismo de ação do óleo essencial de coentro estava relacionado ao dano à membrana celular, o que aumentou a permeabilidade da mesma e comprometeu outras funções como a respiração celular, potencial de membrana e atividade da bomba de efluxo, causando a morte celular.

Tosun et al. (2018) avaliaram o efeito dos óleos essenciais de alecrim, alho, coentro e casca de laranja sobre *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes* inoculados em amostras frescas de salmão, durante o armazenamento (96 h) a  $2 \pm 1$  °C. Esse estudo demonstrou que as amostras tratadas com os óleos essenciais apresentaram redução da população de *Salmonella* Enteritidis e *L. monocytogenes* quando comparadas as amostras controle, sendo que o óleo essencial de coentro foi capaz de inibir 30% da população de *Salmonella* e 1% da população de *Listeria*.

Šojić et al. (2019) avaliaram a ação de diferentes concentrações do óleo essencial de coentro (0,000, 0,075, 0,100, 0,125 e 0,150 µL/g) em salsicha de porco, produzida com diferentes níveis de nitrito de sódio (0, 50 e 100 mg/kg). Para tanto, eles utilizaram de redes neurais artificiais para modelar uma combinação ideal com intuito de utilizar o óleo essencial para reduzir a concentração de nitrito no produto. Desse modo, uma combinação entre 0,12 µL/g de óleo essencial de coentro e 60 mg/kg de nitrito foi capaz de reduzir a oxidação lipídica, retardar o crescimento microbiano e aumentar a coloração vermelha das salsichas durante 52 dias de armazenamento sobre refrigeração. O que demonstrou o potencial desse óleo para ser utilizado como um substituto parcial do nitrito em produtos cárneos.

Pensando-se na aplicação do óleo essencial de coentro em alimentos, o valor da CMB encontrado em nosso trabalho é considerado alto. Portanto, uma alternativa é a realização de combinações com outros óleos essenciais, com o intuito de reduzir as concentrações utilizadas, sem perder seu efeito antimicrobiano, além de potencializar os efeitos conservantes e reduzir o impacto sensorial (OUEDRHIRI et al., 2017).

Krasniewska et al. (2020) analisaram a aplicação de combinações entre óleos essenciais de coentro, manjerona espanhola e orégano espanhol, em concentrações subinibitórias, em vegetais minimamente processados e verificaram que as combinações entre os óleos essenciais de orégano e de manjerona ( $\frac{1}{4}$  CMI +  $\frac{1}{4}$  CMI) e orégano e de coentro ( $\frac{1}{4}$  CMI +  $\frac{1}{4}$  CMI) apresentaram efeito sinérgico sobre *L. monocytogenes*.

Esses trabalhos demonstram que o óleo essencial de coentro possui potencial antimicrobiano, sendo que as diferenças nas concentrações do óleo encontradas em cada estudo podem estar relacionadas a características da planta ou do processo de extração do óleo, bem como de sua formulação comercial.

Portanto, a capacidade do óleo essencial em inibir o crescimento microbiano, associada ao fato de ser reconhecido como GRAS (Generally Recognized As Safe) (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2006) permite sua utilização em alimentos e aplicação na indústria como conservante natural.



## 4 CONCLUSÃO

O óleo essencial de coentro apresentou efeito antibacteriano sobre *Listeria monocytogenes*, o que demonstra que o mesmo pode ser uma alternativa aos conservantes sintéticos. No entanto, a realização de mais experimentos com diferentes cepas e em produtos alimentícios é importante. Já que a adição de concentrações elevadas do óleo essencial pode influenciar e alterar as características sensoriais do produto e a matriz alimentar pode proteger as células bacterianas dos danos causados pelo óleo essencial, bem como interferir em seu mecanismo de ação.

## 5 AGRADECIMENTOS

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

## 6 REFERÊNCIAS

- ALIAKBARLU, J.; SADAGHIANI, S. K.; MOHAMMADI, S. Comparative Evaluation of Antioxidant and Anti Food-borne Bacterial Activities of Essential Oils from Some Spices Commonly Consumed in Iran. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 1487-1493, 2013.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; WAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008.
- BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis**. 1st.ed. New York: Spring Science Business, 2008. 276p.
- BINTSIS, T. Foodborne pathogens. **AIMS Microbiology**, v.3, 529–563, 2017.
- BUCHANAN, R. L.; GORRIS, L. G. M.; HAYMAN, M. M.; JACKSON, T. C. *et al.* A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v. 75, p. 1-13, 2017.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria. 9th.ed. Wayne: CLSI document M100, 2019.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v.3, n.12, p.1–24, 2012.
- JU, J.; XIE, Y. F.; GUO, Y. H.; CHENG, Y. L.; QIAN, H.; YAO, W. The inhibitory effect of plant essential oils on foodborne pathogenic bacteria in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.59, n.20, p.3281-3292, 2019.
- KAWACKA, I.; OLEJNIK-SCHMIDT, A.; SCHMIDT, M.; SIP, A. Natural Plant-Derived Chemical Compounds as *Listeria monocytogenes* Inhibitors In Vitro and in Food Model Systems. **Pathogens**, v. 10, n. 1, p.12, 2021.
- KRASNIEWSKA, K.; KOSAKOWSKA, O.; POBIEGA, K.; GNIEWOSZ, M. The Influence of Two-Component Mixtures from Spanish Origanum Oil with Spanish Marjoram Oil or Coriander Oil on Antilisterial Activity and Sensory Quality of a Fresh Cut Vegetable Mixture. **Foods**, v. 9, n. 12, p. 1740, 2020.
- MANDAL, S.; MANDAL, M. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: Chemistry and biological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 6, p. 421-428, 2015
- MATEREKE, L. T.; OKOH, A. I. *Listeria monocytogenes* Virulence, Antimicrobial Resistance and Environmental Persistence: A Review. **Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 528, 2020.
- OUEDRHIRI, W.; MOUNYR, B.; HARKI, E. H.; MOJA, S.; GRECHE, H. Synergistic antimicrobial activity of two binary combinations of marjoram, lavender, and wild thyme essential oils. **International Journal of Food Properties**, v.20, n.12, p.3149-3158, 2017.
- PRACHAYASITTIKUL, V.; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S. Coriander (*Coriandrum sativum*): A promising functional food toward the well-being. **Food Research International**, v. 105, p. 305-323, 2018.
- RAO, J. J.; CHEN, B. C.; MCCLEMENTS, D. J. Improving the Efficacy of Essential Oils as Antimicrobials in Foods: Mechanisms of Action. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, n.10, p. 365-387, 2019.
- ROBERTS, B. N.; CHAKRAVARTY, D.; GARDNER, J. C.; RICKE, S. C. *et al.* *Listeria monocytogenes* Response to Anaerobic Environments. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p.210, 2020.
- RODRIGUEZ, C.; TAMINIAU, B.; GARCÍA-FUENTES, E.; DAUBE, G.; KORSACK, N. *Listeria monocytogenes* dissemination in farming and primary production: Sources, shedding and control measures. **Food Control**, v. 120, 2021.
- SILVA, F.; FERREIRA, S.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 1479-1486, 2011.
- SIMÕES, C. M. D. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6th ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.
- SOJIC, B.; PAVLIC, B.; IKONIC, P.; TOMOVIC, V. *et al.* Coriander essential oil as natural food additive improves quality and safety of cooked pork sausages with different nitrite levels. **Meat Science**, v. 157, p. 107879, 2019.
- TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; NENG, N. R. *et al.* Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 587-595, 2013.



TOSUN, S. Y.; ALAKAVUK, D. U.; ULUSOY, S.; ERKAN, N. Effects of essential oils on the survival of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on fresh Atlantic salmon (*Salmo salar*) during storage at 2 +/- 1 degrees C. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 1, p. e12408, 2018.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food status list. Silver Spring: FDA, 2006.

VERGIS, J.; GOKULAKRISHNAN, P.; AGARWAL, R. K.; KUMAR, A. Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 10, p. 1320-1323, 2015.

WEI, J. N.; LIU, Z. H.; ZHAO, Y. P.; ZHAO, L. L. *et al.* Phytochemical and bioactive profile of *Coriandrum sativum* L. **Food Chemistry**, v. 286, p. 260-267, 2019.