

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPECIARIAS SOBRE *LISTERIA MONOCYTOGENES* E *ESCHERICHIA COLI* O157:H7

VOLCÃO, Lisiane Martins¹; MARQUES, Juliana de Lima; RIBEIRO, Gladis²

¹Universidade Federal de Pelotas – Curso de Ciências Biológicas; ²UFPel, Departamento de Microbiologia e Parasitologia - IB. gladisaver@hotmail.com.

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos de origem animal ou vegetal, frescos ou processados, incluindo a água, podem veicular diversos microrganismos patogênicos, causadores de diversas perturbações fisiológicas em seus consumidores. Os alimentos que, eventualmente, estejam contaminados por microrganismos causadores de doenças, ao serem ingeridos, permitem que os patógenos ou os seus metabólitos invadam os fluídos ou tecidos do hospedeiro causando algumas doenças graves (Pinto, 1996).

A utilização de plantas aromáticas, possuidoras de óleos essenciais, geralmente tem ações flavorizantes, porém a combinação de ervas e condimentos com comprovada ação antibacteriana e antioxidante pode ser utilizada na conservação de alimentos, diminuindo a concentração de aditivos sintéticos em tais produtos (Bara; Vanetti, 1999). Óleos essenciais são produtos voláteis resultantes do metabolismo secundário das plantas, normalmente formados em células ou grupos de células especializadas, geralmente encontradas nos caules e folhas (Hili; Evans; Vaness, 2007). A maior parte da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de especiarias e ervas aromáticas parece estar associada com compostos fenólicos (Davidson; Naidu, 2000). O efeito está relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (Lambert et al., 2001).

A *Escherichia coli* O157:H7 é um sorotipo de *E.coli* pertencente ao grupo EHEC (*E. coli* enterohemorrágicas). Este grupo inclui estirpes produtoras de fatores citotóxicos descritos como verotoxinas (VTs) ou Shiga-like (SLTs) (Doyle et al. 1997). Entrou em evidência no ano de 1982, quando começaram a ocorrer os surtos de colite hemorrágica em Oregon e Michigan (EUA). Mas foi em 1993, após um grande surto alimentar associado a hambúrgueres mal cozidos vendidos por uma cadeia de *fast food* nos EUA, que foi reconhecida como um patógeno de grande importância em alimentos (Rangel, 2005). *Listeria monocytogenes*, agente etiológico da listeriose, é tida como agente patogênico para os animais desde 1926. Mas somente em 1980 é que passou a receber o devido interesse em saúde pública, quando sua importância dos alimentos na cadeia de transmissão da infecção ao homem foi reconhecida (Germano; Germano, 2008). Durante a década de 80 ocorreram vários surtos de listeriose. O primeiro deles, que despertou os microbiologistas de alimentos para o problema da *L. monocytogenes*, ocorreu no Canadá. O alimento incriminado foi salada de repolho tipo *coleslaw* (Franco; Landgraf, 2008).

Baseado na necessidade do uso de novas alternativas que impeçam ou diminuam a veiculação de patógenos pelos alimentos, o presente trabalho teve como objetivo determinar o potencial antibacteriano de três óleos essenciais de especiarias, *Cinnamomum zeylanicum* B. (canela), *Eugenia caryophyllus* T. (cravo) e

Mentha piperita L. (hortelã-pimenta) sobre cepas de *Escherichia coli* O157:H7 e de *Listeria monocytogenes*.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Os óleos essenciais de *Cinnamomun zeylanicum* (canela), *Eugenia caryophyllus* (cravo) e de *Mentha piperita* foram adquiridos comercialmente pela Florananda Ind. e Com. de Cosm. e Prod. Nat. Ltda. As bactérias testadas foram *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*, todas pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da UFPel.

Para a determinação da concentração mínima inibitória (CIM) foi utilizada a técnica de Microdiluição em caldo, utilizando-se de placas estéreis de microtitulação, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003). O meio utilizado foi o caldo Muller Hinton (Acumedia®), acrescido do emulsificante Tween 80 (T80-Vetec®) a 0,5%. Foram feitas 8 diluições dos óleos no meio obtendo-se concentrações entre 100 µl/ml e 0,781 µl/ml.

Os inóculos (20µl) de cada uma das bactérias testadas foram ajustadas em solução salina à escala 0,5 de MacFarland, e após a realização de diluições de 1:10 em caldo Muller Hinton, e foram adicionados as cavidades que já continham as diluições do óleo (180µl de meio+óleo+T80), visando obter uma população bacteriana de aproximadamente 10^4 a 10^5 UFC/mL⁻¹. Foram realizadas tríplicas para cada cepa bacteriana analisada. Foi utilizado um controle negativo (meio+T80+óleo essencial) e um positivo (meio+T80+inóculo). As placas foram então incubadas a 36°C por 24h. Para a leitura adicionou-se 20µl de Cloreto de 2,3,5 – Trifenil Tetrazólio a 1%, que após vinte minutos e 36°C de incubação, indicou atividade celular bacteriana, com mudança na coloração.

A CIM foi determinada como sendo a menor concentração do óleo a qual inibiu completamente o crescimento bacteriano no meio líquido. Já a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada de acordo com os resultados do CIM, onde alíquotas de 5µl de cada diluição que inibiu o crescimento bacteriano foram semeadas em ágar BHI e incubadas a 36°C durante 24h. A CBM foi determinada como sendo a concentração mínima que não apresentou crescimento bacteriano no meio de cultura após o período de incubação. A partir dos valores da CMI, foram calculadas as médias aritméticas para a comparação da atividade antibacteriana entre os três óleos essenciais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três óleos essenciais apresentaram significativa atividade bacteriostática e bactericida. Na Tabela 1 estão demonstrados os valores da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB). *L. monocytogenes* apresentou maior resistência aos óleos essenciais do que *E. coli*. Apesar de Aureli et al. (1992), ao testar trinta e dois óleos essenciais sobre quatro linhagens de *L. monocytogenes* observar lenta atividade do óleo essencial de cravo em estudo da curva de inibição, neste trabalho o óleo essencial de *E. caryophyllus* apresentou maior eficiência (em negrito) sobre ambas as cepas conforme indica a Tabela 2.

Tabela 1 – Valores da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *E. caryophyllus* e *M. piperita* sobre *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*

Microrganismo	<i>C. zeylanicum</i>		<i>E. caryophyllus</i>		<i>M. piperita</i>	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>E. coli</i> O157:H7	6,25	6,25	3,12	12,5	3,12	6,25
<i>L. monocytogenes</i>	12,5	25	3,12	6,25	6,25	12,5

Em estudos com *M. piperita*, Mimica-Dukic et al. (2003) observaram ação bacteriostática principalmente sobre *E. coli*, assim como neste trabalho onde hortelã-pimenta obteve bons resultados como bacteriostático e bactericida tanto para *E. coli* como para *L. monocytogenes*. Apesar de López et al. (2005) observar excelente atividade antibacteriana e antifúngica de *C. zeylanicum* sobre diversos microrganismos contaminantes de alimentos, no presente trabalho, foi o óleo que demonstrou menor eficiência. É importante salientar, que a intensidade da ação inibitória dos compostos dos óleos essenciais de especiarias e condimentos depende da natureza da matéria-prima e do método de extração para a obtenção dos mesmos, do tipo de microrganismo a ser controlado e de fatores relacionados ao armazenamento do alimento, como temperatura, umidade e conservantes químicos utilizados (Kunz; Grohs, 2000).

Tabela 2 – Média aritmética das concentrações mínima inibitória (CMI) e concentrações bactericidas mínimas (CMB) apresentadas pelos óleos essenciais de *Cinnamomun zeylanicum*, *E. caryophyllus* e *Mentha piperita*

Óleo Essencial	Média aritmética	
	CMI	CMB
<i>C. zeylanicum</i>	9,37	15,62
<i>E. caryophyllus</i>	3,12	9,37
<i>M. piperita</i>	4,68	9,37

4 CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada e dentro das limitações deste estudo, estes resultados, permitem sugerir que a adição destas especiarias poderiam servir como alternativa na substituição de conservantes químicos em alimentos.

5 REFERÊNCIAS

AURELI, P.; CONSTANTINI, A.; ZOLEA, S. Antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 55, p.: 344-348, 1992.

- BARA, M. T. F.; VANETTI, M. C. D. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.7, p.: 21-23, 1999.
- DAVIDSON, P. M.; NAIDU, A. S. Phyto-phenol. In: Naidu, AS.(Ed.), **Natural Food Antimicrobial Systems**. CRC Press. p.: 265–294, 2000.
- DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; MENG, J. et al. *Escherichia coli* O157:H7. Foodborne pathogenic bacteria. In: **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington, D.C.: Academic, 1997. p.171-191.
- FRANCO, B.D.G.M.F; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. In: LANDGRAF, M. **Microorganismos indicadores**. Ed. Atheneu, cap.3, p. 27-31, 2008.
- GERMANO, P.M. L; GERMANO, M.I.S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. In: **Agentes Bacterianos de Toxi-infecções**. 3ªEd. Barueri: Manole, 986p. p.: 302-323, 2008.
- HILI, P.; EVANS, C. S.; VENESS, R. G. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, p.: 269-275, 2007.
- KUNZ, B.; GROHS, B. M. Use of spices mixtures for the stabilization of fresh portioned pork. **Food Control**. v. 11, p.: 433-436, 2000.
- Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P. and Nychas, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol, and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**. v. 91, p.: 453-462, 2001.
- LÓPEZ, P. et al. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.17, p.: 6939-6946, 2005.
- MIMICA-DUKIĆ, N. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of three mentha species essential oils. **Planta Medica**. v. 69, n. 5, p.: 413-419, 2003.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A6, 2003.
- RANGEL, J.M.; SPARLING, P.H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P.M.; SWERDLOW, D.L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n. 4, 2005.
- PINTO, A. F. M. A. **Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos**. 1996. Disponível em: www.ipv.pt/millennium/ect41.html. Acessado em maio de 2012.