

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

Potencial antibacteriano do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betcher) Cheel e desenvolvimento de filmes ativos para aplicação em alimentos

Kamila Furtado da Cunha

Pelotas, 2019.

Kamila Furtado da Cunha

Potencial antibacteriano do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel e desenvolvimento de filmes ativos para aplicação em alimentos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini

Co-orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2019.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C972p Cunha, Kamila Furtado da

Potencial antibacteriano do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel e desenvolvimento de filmes ativos para aplicação em alimentos / Kamila Furtado da Cunha ; Angela Maria Fiorentini, orientadora ; Wladimir Padilha da Silva, coorientador. — Pelotas, 2019.

65 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Ação bactericida. 2. Acetato de celulose. 3. Presunto cozido. 4. *Salmonella* spp.. 5. Tea tree. I. Fiorentini, Angela Maria, orient. II. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. III. Título.

CDD : 664

Kamila Furtado da Cunha

Potencial antibacteriano do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betcher) Cheell e desenvolvimento de filmes ativos para aplicação em alimentos

Dissertação de mestrado aprovada, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 26 de fevereiro de 2019.

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a. Ângela Maria Fiorentini (orientadora), Doutora em Ciências dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a Dr^a. Gladis Aver Ribeiro, Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr^a Juliana de Lima Marques, Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Guilherme da Silva Dannenberg, Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

A minha mãe Ana Maria e minha avó Anna, por todo apoio, incentivo e amor, sem isso eu não conseguiria ter chegado até aqui. Muito, muito, muito obrigada por sempre acreditarem em mim e jamais me deixarem desistir nos momentos de dificuldade, sem o incentivo de vocês nada disso seria possível. Vocês foram fundamentais para mais essa nossa conquista, minha eterna gratidão e amor!

Ao meu namorado Patrick, pelo incentivo e paciência nos momentos de desespero. Por estar presente em mais essa etapa importante e sempre me incentivar a ser melhor. Obrigado por trilhar esse caminho comigo e por fazer parte da minha jornada.

A minha orientadora, professora Ângela por toda ajuda, conversas, disponibilidade e incentivo durante o desenvolvimento desse trabalho, além de todo aprendizado e desafios para meu crescimento profissional.

Ao professor Wladimir, meu co-orientador, pelos ensinamentos, por ceder o espaço de seu laboratório e me acolher tão bem.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Animal, Andreia, Darla, Louise, Isabela, Tassiana, Letícia, Natalie, Itiane, Claudio, Carla, Juliana e Helena por todo apoio, auxílio, incentivo, carinho e risadas nesses dois anos. E em especial, a Camila, por me ajudar em todas as etapas de desenvolvimento desse trabalho, por dividir as dificuldades e alegrias nesse período, e principalmente, pela amizade e cumplicidade.

Aos estagiários do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Animal Patrícia, Fernanda, Élder, Kauana e Ytacyana por toda ajuda nos momentos de aperto e pela troca de conhecimento.

As amigas Priscila, Gladis, Marcelle e Taiane, por estarem sempre presentes na minha vida, mesmo que distante fisicamente. Por todo apoio nos momentos difíceis, incentivo, risadas e comilanças. A presença de vocês fez toda diferença nessa jornada, não tenho palavras para expressar todo meu carinho e gratidão!

Aos membros da banca Dra. Gladis Aver Ribeiro, Dra Juliana Marques e Dr. Guilherme Dannenberg pela disponibilidade em participar da banca examinadora desta dissertação e pelas suas contribuições.

A todos que auxiliaram ou estiveram presente, direta ou indiretamente, obrigada!

Resumo

CUNHA, Kamila Furtado. **Potencial antibacteriano do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Becthe) Cheel e desenvolvimento de filmes ativos para aplicação em alimentos.** 2019. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Para o controle de patógenos em alimentos, métodos alternativos que visam explorar o potencial de extratos naturais, como os óleos essenciais (OE), são considerados promissores para diferentes aplicações, uma vez que esses compostos apresentam diversas propriedades biológicas, como a ação antibacteriana. Dentre essas aplicações, busca-se o desenvolvimento de embalagens ativas, utilizando matrizes biodegradáveis, como acetato de celulose, visando minimizar os impactos ao meio ambiente, decorrente do acúmulo de polímeros sintético. Sendo assim, o objetivo do estudo foi desenvolver filmes de acetato de celulose incorporados com OE de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Becthe) Cheel (OETT) e avaliar seu potencial antibacteriano para aplicação em alimentos. A ação antibacteriana do OETT foi avaliada *in vitro* através de disco difusão, concentração inibitória e bactericida mínima contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e posteriormente, foram elaborados filmes com o OETT, sendo preparados os tratamentos T1 com 2xCIM (1,56% para isolados e 3,2% para *S. Typhimurium* ATCC 14028) e T2 com 4xCIM (3,2% para isolados e 6,4% para *S. Typhimurium* ATCC 14028), e um filme sem OE, os quais foram avaliados *in vitro* contra os mesmos patógenos através dos testes de disco difusão e cinética de ação em caldo. Em seguida, os filmes ativos foram avaliados *in situ*, utilizando presunto cozido fatiado. Como resultados, foi observado que o OE demonstrou ação *in vitro* contra todos patógenos avaliados, sendo que *S. Typhimurium* demonstrou-se mais sensível a ação dos filmes com o OETT, sendo também avaliada a sua ação frente a isolados de origem alimentar. Nos ensaios *in vitro*, o isolado multirresistente de *Salmonella* spp. demonstrou-se mais sensível aos filmes com OETT incorporado, quando comparado ao isolado susceptível e a cepa padrão. Destaca-se que na avaliação *in situ*, desde o primeiro dia de exposição da matriz alimentar contaminada aos filmes, tanto para T1 quando T2, foi observado que não houve crescimento de nenhuma das bactérias avaliadas no estudo, demonstrando ação bactericida. Assim, conclui-se que o OE de *M. alternifolia* (Maiden & Becthe) Cheel apresenta ação antibacteriana frente a diferentes patógenos alimentares, e quando aplicado em filmes de acetato, são efetivos no controle de *Salmonella* spp. em presunto cozido.

Palavras-chave: ação bactericida; acetato de celulose; presunto cozido; *Salmonella* spp.; tea tree

Abstract

CUNHA, Kamila Furtado. **Antibacterial potential of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Becthe) Cheel and development of active films for application in food.** 2019. 65p. Dissertation (Master in Food Science and Technology) Postgraduate Program in Food and Science Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2019.

For the control of pathogens in food, alternative methods to exploit the potential of natural extracts, such as essential oils (OE), are considered promising for different applications, since these compounds present several biological properties, such as the antibacterial action. Among these applications, it is sought the development of active packaging, using biodegradable matrices, such as cellulose acetate, in order to minimize impacts to the environment, due to the accumulation of synthetic polymers. Therefore, the objective of the study was to develop cellulose acetate films incorporated with OE from *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Becthe) Cheel (OETT) and to evaluate its antibacterial potential for food application. The antibacterial action of OETT was evaluated *in vitro* by disc diffusion, minimum inhibitory and bactericidal concentration against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* O157: H7 NCTC 12900 and *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 and thereafter films were made with OETT, and T1 treatments with 2xCIM (1.56% for isolates and 3.2% for *S. Typhimurium* ATCC 14028) and T2 with 4xCIM (3.2% for isolates and 6.4% for *S. typhimurium* ATCC 14028), and a non-OE film, which were evaluated *in vitro* against the same pathogens by disc diffusion and stock kinetics in broth. Then the active films were evaluated *in situ* using sliced baked ham. As results, it was observed that OE demonstrated *in vitro* action against all pathogens evaluated, with *S. Typhimurium* being more sensitive to the action of the films, and its action against food isolates was also evaluated. In the *in vitro* assays, the multidrug resistant *Salmonella* spp. was shown to be more sensitive to films with incorporated OE when compared to the susceptible isolate and the standard strain. It was observed that in the *in situ* evaluation, from the first day of exposure of the contaminated food matrix to the films, both for T1 and T2, it was observed that there was no growth of any of the bacteria evaluated in the study, demonstrating a bactericidal action. Thus, it is concluded that the OE of *M. alternifolia* (Maiden & Becthe) Cheel presents an antibacterial action against different food pathogens, and when applied in acetate films, are effective in the control of *Salmonella* spp. in ham.

Key-words: bactericidal action; cellulose acetate; ham; *Salmonella* spp.; tea tree.

Lista de Figuras

Figura 1	Sítios de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana.....	22
Figura 2	Árvore de <i>Melaleuca alternifolia</i> (Maton & Betcher) Cheel.....	23
Figura 3	Cinética de ação em caldo de filmes com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>tea tree</i> frente a bactérias de patogênicas em alimentos.....	39
Figura 4	Cinética de ação em caldo do óleo essencial de <i>tea tree</i> frente a isolados de <i>Salmonella</i> spp.	41
Figura 5	Ação antibacteriana de filmes com diferentes concentrações de óleo essencial de <i>tea tree</i> contra isolados <i>Salmonella</i> spp. em presunto cozido durante período de armazenamento	42

Lista de Tabelas

Tabela 1	Ação antibacteriana do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> (Madon & Betché) Cheel frente a patógenos alimentares.....	36
Tabela 2	Valores dos halos de inibição formados (disco difusão) pela ação dos filmes com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> (Madon & Betché) Cheel frente a patógenos alimentares.....	38
Tabela 3	Ação antibacteriana do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> (Madon & Betché) Cheel frente a isolados de <i>Salmonella</i> spp.	62
Tabela 4	Características de <i>Salmonella</i> spp. isolados de alimentos e ambientes alimentares no sul do Brasil.....	64
Tabela 5	Composição química do óleo essencia de <i>Melaleuca alternifolia</i> (Madon & Betché Cheel	65

Sumário

1.	Introdução.....	13
1.2	Objetivos.....	14
1.2.1	Geral.....	14
1.2.2	Específicos.....	15
2	Revisão de literatura.....	17
2.1	Contaminação microbiana em alimentos.....	17
2.1.1	Bactérias patogênicas em alimentos.....	18
2.2	Óleos essenciais	20
2.2.1	Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> (Maden & Bettle) Cheel	22
2.2.2	Aplicação de óleos essenciais na área de alimentos.....	25
2.2.3	Embalagens ativas.....	26
3.	Manuscrito: Atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> (Maden & Bettle) Cheel em filme ativo para aplicação em presunto cozido.....	30
4.	Considerações finais	49
	Referências.....	50
	Apêndices.....	61
	Anexos	63

1. Introdução

A presença de micro-organismos patogênicos em alimentos representa um risco à saúde do consumidor, uma vez que os mesmos podem causar diversas enfermidades associadas a Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). No ambiente de manipulação e processamento de alimentos, esses micro-organismos podem se aderir a diversas superfícies, utilizando resíduos orgânicos e inorgânicos como substrato para sua adesão, funcionando como uma fonte de contaminação do produto, tanto no ambiente industrial quanto no domiciliar (OLIVEIRA, BRUGNERA e PICCOLI, 2010; RISOPOLLES-AVILA et al., 2018). Desta forma, cada vez mais se busca soluções efetivas a fim de evitar a contaminação de alimentos ou das respectivas matérias-primas, no ambiente de produção de alimentos (CDC, 2016; ALONZO, 2015).

Dentre os métodos de conservação de alimentos utilizados, o emprego de substâncias sintéticas é uma das mais utilizadas. As mesmas são adicionadas aos alimentos a fim de garantir um padrão de qualidade e segurança microbiológica dos produtos, respeitando os limites preconizados pela legislação (MARTINS, SANTANIN e SOUZA, 2018). Entretanto, há alguns anos, têm se observado uma nova tendência de mercado, onde os consumidores buscam, reduzir o consumo de alimentos contendo substâncias sintéticas (SILVA, 2014).

A fim de encontrar métodos alternativos para o controle desses agentes, as plantas, bem como seus extratos, são avaliadas devido a suas várias propriedades farmacológicas, apresentando uma grande diversidade de compostos bioativos (FENALTI et al., 2016). Dentre eles, destacam-se os Óleos Essenciais (OE), os quais são caracterizados como substâncias complexas, oriundas do metabolismo especializado do secundário vegetal, podendo ser extraído de qualquer parte da planta, apresentando ação fitoterápica, antiviral, antisséptica, antifúngica e antibacteriana, entre outras (ANDRADE et al., 2014).

A ação antibacteriana de OE contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa é bastante documentada sendo esta uma das mais importantes propriedades apresentadas por esses compostos (SILVA, 2014). Dentre as diversas aplicações que visam explorar o potencial dos mesmos na área de alimentos, busca-se o desenvolvimento de embalagens ativas, utilizando matrizes biodegradáveis, como acetato de celulose, visando também minimizar os impactos ao meio ambiente, decorrente do acúmulo de polímeros sintéticos (MIR et al., 2018). Dentre os compostos com ação antimicrobiana com potencial para serem aplicados em embalagens, os OE e seus constituintes se destacam por serem compostos bioativos e de baixa toxicidade (HYLDGAARD, MYGIND e MEYER, 2012; RIBEIRO-SANTOS, 2017; MIR et al., 2018).

Dentre os OE atualmente estudados, o de *Melaleuca alternifolia* (Madon & Bettle) Cheele, popularmente conhecido como *tea tree*, é bastante conhecido por suas propriedades medicinais como ação anti-inflamatória e antimicrobiana (CARSON, HAMMER e RILEY, 2006). Sua ação antimicrobiana foi demonstrada *in vitro* contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Penicillium* spp. (ZHANG et al., 2018), micro-organismos de importância na área de alimentos, entretanto, seu potencial para aplicação ainda não foi explorado na área.

Com a intenção de combater a contaminação de alimentos por micro-organismo causadores de DTA, produzindo alimentos seguros para os consumidores, busca-se diminuir o impacto que essas doenças podem causar na qualidade de vida da população. Concomitantemente, oferecer produtos mais saudáveis com redução de aditivos sintéticos à população, se busca estudar o potencial antibacteriano de diferentes extratos vegetais, para que os mesmos possam ser utilizados em benefício da saúde humana, podendo ser aplicados em filmes biodegradáveis, proporcionando a redução de impactos ambientais.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Desenvolver filmes incorporados com óleo essencial de *M. alternifolia* (Maiden & Bettle) Cheele com potencial antibacteriano para aplicação em alimentos.

1 **1.2. 2 Específicos**

- 2 - Avaliar o potencial antibacteriano do óleo essencial de *M. alternifolia* (Maiden & Betcher)
- 3 Cheel contra bactérias patogênicas em alimentos;
- 4 - Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) do
- 5 óleo essencial em estudo;
- 6 - Desenvolver filmes ativos de acetato de celulose com as concentrações do óleo
- 7 essencial que demonstraram ação antibacteriana *in vitro*;
- 8 - Avaliar *in vitro* a eficácia dos filmes ativos, contra bactérias patogênicas em alimentos;
- 9 - Avaliar *in situ* a eficácia dos filmes ativos, através da sua avaliação em matriz
- 10 alimentar.

CAPÍTULO I

2 Revisão de literatura

2.1 Contaminação microbiana em alimentos

Apesar de serem utilizadas diversas estratégias de controle durante a produção e processamento dos alimentos, visando reduzir a contaminação microbiana no produto final. No entanto, devido a demanda dos produtos, e em alguns casos o descumprimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF), ocorre a contaminação por micro-organismos patogênicos e deteriorantes na cadeia alimentar, comprometendo a qualidade microbiológica dos produtos (AKHTAR, SARKER e HOSSAIN, 2014).

A contaminação por micro-organismos deteriorantes nos alimentos causa perdas econômicas, uma vez que alteram a qualidade do produto, bem como suas características sensoriais. Entretanto a presença de micro-organismos patogênicos, não causa esse tipo de alteração, mas compromete a segurança microbiológica do produto, oferecendo riscos à saúde do consumidor. Assim, a prevalência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) ainda permanece como uma importante causa de morbidade e mortalidade, afetando um terço da população em países subdesenvolvidos (DANNENBERG, 2017; AKHTAR, SARKER e HOSSAIN, 2014).

Os fatores que levam a contaminação microbiana em alimentos estão relacionados a multiplicação celular, sobrevivência e a fonte de contaminação propriamente dita. Com relação aos fatores relacionados a contaminação, sabe-se que grande parte delas ocorre devido aos manipuladores do alimento e contaminação cruzada. Contudo, sabe-se que a contaminação nos alimentos ocorre devido aos manipuladores dos mesmos e contaminação cruzada. O fator que influenciam a

sobrevivência e multiplicação são o aquecimento e cozimento inadequado, e também preparação, estocagem e refrigeração, respectivamente (FORSYTHE, 2013).

Os casos de DTA são atribuídos principalmente ao consumo de produtos de origem animal, crus ou pré-cozidos, e a contaminação e multiplicação dos mesmos pode ocorrer pela sua manipulação, refrigeração ou cocção inadequada e exposição prolongada à temperatura ambiente (FORSYTHE, 2013; BRASIL, 2017). Além disso, dentre esses alimentos, estima-se que grande parte dos casos de intoxicações e infecções alimentares são causadas pelo consumo de produtos cárneos como embutidos, fiambres e linguiças frescas (COLLA et al., 2014).

2.1.1 Bactérias patogênicas em alimentos

O consumo de alimentos fora dos padrões higiênico-sanitários é o principal fator responsável pela ocorrência de DTA, representando importantes problemas de saúde pública, causando doenças e que podem chegar a óbito em casos graves (CDC, 2016; MARINHO et al., 2015). No Brasil, segundo dados obtidos entre 2015 a 2017, foi verificado que ocorreram mais de 20 mil casos de DTA (BRASIL, 2017).

Nos últimos anos, observou-se que a incidência de doenças vinculadas a alimentos é crescente, entretanto a grande maioria dos casos não é notificada, visto que muitos agentes causam apenas sintomas leves, onde o indivíduo afetado não procura os serviços de saúde (HOELZER et al., 2018; MARINHO et al., 2015). Atribui-se o aumento no número de casos ao aumento populacional e, conseqüentemente, o aumento no número de indivíduos pertencentes aos grupos de risco, a maior exposição de alimentos direcionados ao consumo coletivo e deficiência de fiscalização em relação à qualidade dos alimentos distribuídos a população (BRASIL, 2017; MARINHO et. al, 2015).

Atualmente, sabe-se que no Brasil, os agentes bacterianos são os responsáveis por 95% dos casos de DTA, onde *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* são os agentes mais frequentes associados aos surtos (BRASIL, 2017), sendo dados semelhantes aos reportados pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, 2016), o qual descreve que os agentes mais comuns são *Salmonella* spp. e *E. coli*.

Conhecida por ser uma bactéria que faz parte da microbiota intestinal em humanos e outros animais, *E. coli* quando fora do seu sítio comum pode causar diversas infecções. Algumas cepas de *E. coli* causam diarreias agudas e gastroenterites, sendo transmitidas por alimentos ou água contaminadas (CDC, 2016). Essas cepas patogênicas são classificadas em grupos, sendo as principais: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), hemorrágica (EHEC) e a enteroinvasiva (EIEC) (MURRAY et al, 2017). Dentre essas destaca-se a *E. coli* O157:H7, pois a mesma é a causadora de diarreias hemorrágicas, podendo ser produtora da Toxina Shiga, a qual pode levar a Síndrome Hemolítica Urêmica (GONÇALVES et. al, 2016; CDC 2016).

Caracterizado por fazer parte da microbiota normal da pele e membranas mucosas de cerca de 20-40% da população, *S. aureus* é um importante agente causador de intoxicações alimentares, devido a produção de diversas enterotoxinas. Esse micro-organismo pode ser facilmente encontrado contaminando alimentos devido à manipulação inadequada de quem os prepara. Além disso, pode ser encontrado em superfícies de equipamentos e no ambiente, nos quais podem formar biofilmes, servindo como fontes para contaminações recorrentes (MURRAY, 2017; RUBAB et al., 2018).

Bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* spp. apresentam ampla distribuição, estando associada a diversos hospedeiros como suínos, aves, répteis e até mesmo o homem. São agentes responsáveis por casos de gastroenterites com sintomas de gravidade variável, podendo desenvolver em casos mais graves, sepse e infecções endovasculares (COSTA, 2014; TANNER e KINGSLEY, 2018; ISSENHUTH et al., 2014). Esses micro-organismos se destacam por serem altamente patogênicos, devido a expressão de diversos fatores de virulência que irão auxiliar na sobrevivência durante o trânsito gastrointestinal, colonização e invasão no hospedeiro, além de apresentar resistência a antibacterianos e sanitizantes (HERRERO-FRESNO e OLSEN, 2018).

Apesar de *Listeria monocytogenes* não ser considerada um dos agentes mais frequentes associados a surtos, são responsáveis por desencadear quadros clínicos graves e apresenta índice de mortalidade de até 30%. Casos de listeriose são altamente graves em indivíduos pertencentes ao grupo de risco, particularmente em gestantes visto que pode causar aborto, morte fetal, parto prematuro e infecções neonatais. Essa bactéria apresenta capacidade de se adaptar a condições adversas como pH baixos e altas concentrações de sal, além de formar biofilmes e se multiplicar

em temperaturas baixas (2°C a 4°C). Essas bactérias são amplamente distribuídas na natureza podendo estar presente no solo, água, vegetais e os animais podem ser considerados como reservatórios (GONÇALVES et. al, 2016).

Dentre os diversos fatores de virulência que os micro-organismos podem expressar, destaca-se a capacidade de formar biofilmes em diversas superfícies, uma vez que essa estrutura possibilita a persistência de micro-organismos por mais tempo no ambiente, resistência a substâncias antimicrobianas e processos de sanitização (COSTERTON, MONTANARO e ARCIOLA, 2005; MADSEN et. al, 2012). Na indústria de alimentos ocorrem principalmente nas áreas de processamento, devido ao acúmulo de materiais orgânicos nas superfícies, os quais servem como substrato para adesão bacteriana. Entretanto, mesmo as células estando fortemente aderidas, quando em biofilmes, várias células podem se desprender dessa estrutura, podendo contaminar os alimentos e outras superfícies (RISOPOLLES et al., 2018).

Além disso, a constante exposição de indivíduos da população e também de animais de criação a antimicrobianos utilizadas durante a produção, vêm atuando como uma pressão seletiva para o surgimento de linhagens de micro-organismos resistentes (LOPES, 2014; COLLA, et al., 2014; HAUBERT et al., 2016). Sendo assim, é crescente a preocupação de que alimentos possam estar contaminados por esses micro-organismos, uma vez que, as alternativas terapêuticas acabam tornando-se restritas, dificultando o tratamento. Dessa forma, é necessário garantir o uso criterioso de antimicrobianos em animais de produção visando diminuir o surgimento de micro-organismos resistentes (COLLA et al., 2014).

2.2 Óleos essenciais

Dentre os compostos bioativos obtidos a partir de plantas, os OE são originados no metabolismo secundário vegetal e são responsáveis pela defesa contra patógenos e herbívoros, permitem a sobrevivência ao estresse hídrico e falta de nutrientes, além de atrair polinizadores (ANDRADE et al., 2014). Esses compostos podem servir como uma fonte variada de substâncias promissoras a serem exploradas pelas indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos (ZANDI-SOHANI e RAMEZANI, 2015).

Os OE podem ser extraídos de diferentes órgãos vegetais como frutas, flores, folhas, cascas e raízes, entretanto sua composição é variável de acordo com o local de extração, época do ano e localização geográfica. Além disso, apresentam baixo peso molecular, não se misturam com a água e apresentam-se líquidos a temperatura ambiente. Sua extração pode ser feita através de CO₂ supercrítico, prensagem à frio e hidrodestilação, sendo este último o método mais utilizado para extração, apresentando a vantagem de não utilizar nenhum solvente que possa ser tóxico, uma vez que é utilizado apenas água (ANDRADE et al., 2014).

A ação antimicrobiana dos compostos dos OE pode ser caracterizada de acordo com sua estrutura química, sendo atribuída principalmente aos terpenos, terpenóides e fenilpropanóides, mas também aos compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides, os quais apresentam diferentes sítios de ação na célula bacteriana (Figura 1) (HYLDGAARD, MYGIND e MEYER, 2012; ANDRADE et al., 2014). A ação dos OE pode ser atribuída a sua hidrofobicidade, permitindo que estes possam interagir com os compostos lipídicos presentes nos envoltórios das células bacterianas, levando a um aumento na permeabilidade da membrana, podendo provocar o extravasamento de algumas substâncias da célula ou ainda interferir na respiração celular, induzindo a morte celular (SOLÓRZANO-SANTOS e NOVALES, 2012; GRAEY e HAMMER, 2015).

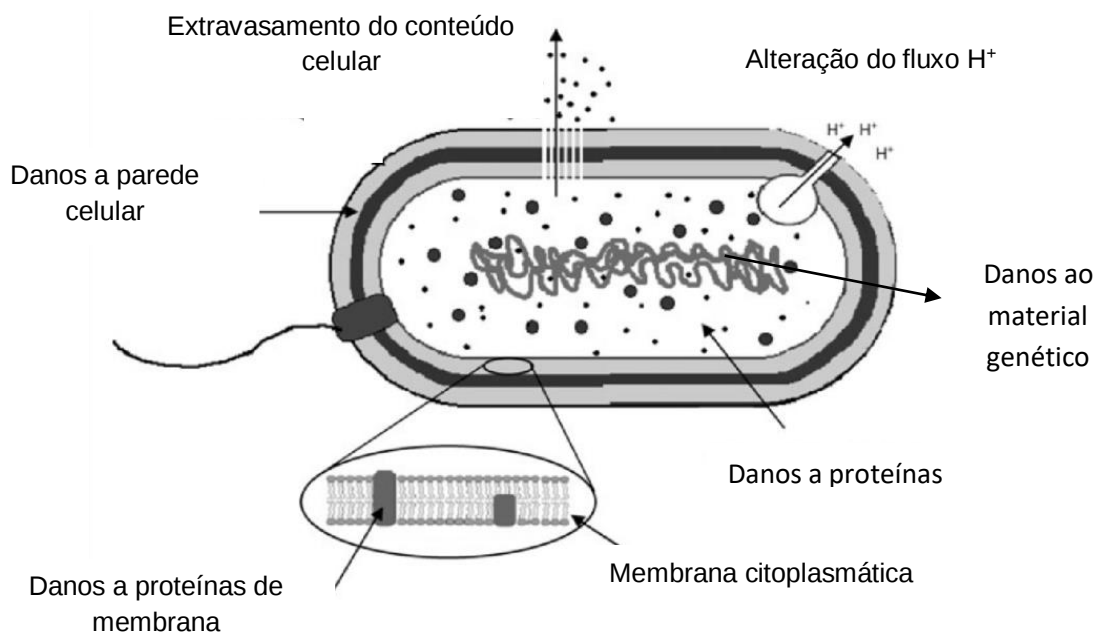


Figura 1: Sítios de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana

Fonte: Adaptada de Karaca e Newman (2015).

Segundo Vasconcelos, Croda e Simionatto (2018) os OE são responsáveis por agirem em diferentes sítios na célula bacteriana, dentre eles causam danos a nível de membrana celular, as quais provocam alterações da permeabilidade e perda de proteínas funcionais responsáveis pelo transporte de moléculas e íons para a célula. Podem causar inibição da enzima ATPase, porinas e inibição de genes relacionados a divisão celular, entretanto, não foram completamente elucidados. Além disso podem atuar na inibição do *quorum sensing*, o qual pode influenciar a expressão de diferentes fatores de virulência, dentre eles motilidade e formação de biofilme.

De acordo com alguns estudos, os OE podem alterar a expressão gênica de importantes fatores de virulência bacterianos, como produção de biofilme e enterotoxinas em *S. aureus* (SHAFIRI et al., 2018; TURCHI et al., 2018) e listeriolisina O em *L. monocytogenes* (LIU et al., 2016). De acordo com Bozik et al. (2018) alguns componentes isolados dos OE, como carvacol e eugenol alteram a expressão proteica em *E. coli*. Contudo, acredita-se também que a combinação dos diferentes compostos químicos presentes nos OE possa atuar de forma sinérgica entre si, com outros OE e até mesmo fármacos convencionais, favorecendo sua ação antibacteriana (ANDRADE et al., 2014).

Em virtude da necessidade de alimentos seguros e de um modo de vida mais saudável e sustentável, é crescente a demanda por alimentos mais naturais, onde percebe-se que os consumidores optam cada vez mais por reduzir o consumo de produtos com substâncias sintéticas (SILVA, 2014). Devido a isso, nos últimos anos se intensificaram os estudos acerca das propriedades de extratos vegetais, uma vez que as plantas apresentam a capacidade de sintetizar uma grande diversidade de compostos bioativos.

2.2.1 Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Madon & Betcher) Cheel

Conhecida por suas propriedades medicinais, *M. alternifolia* (Madon & Betcher) Cheel ou popularmente *tea tree*, é uma planta nativa da Austrália, pertencente à família Myrtaceae e ao gênero *Melaleuca*, o qual possui cerca de 230 espécies. O indivíduo adulto pode chegar até 8 metros, florescendo geralmente em outubro e novembro (D'AURIA et al., 2001; CARSON, HAMMER e RILEY, 2006) (Figura 2).



Figura 2: Árvore de *Melaleuca alternifolia* (Maton & Betcher) Cheel
 A: Indivíduo adulto de em floração; B: flores de *M. alternifolia* (Madon & Betcher) Cheel;
 Fonte: Fazenda Citra.

Os relatos da utilização de *M. alternifolia* (Madon & Betcher) Cheel devido a suas propriedades medicinais, como ação anti-inflamatória e antimicrobiana são bastante antigos. Acredita-se que uma das primeiras descrições do uso dessa planta seja da época dos aborígenes, ao norte do estado de Nova Gales do Sul na Austrália, onde foram preparadas infusões das folhas para tratar doenças de pele e também a inalação das folhas a fim de tratar tosses e resfriados (SHEMESH e MAYO, 1991). Entretanto a utilização do OE propriamente dito é descrita a partir da década de 1920 (CARSON, HAMMER e RILEY, 2006).

O OE de *tea tree* (OETT) é extraído das folhas, sendo obtido a partir da destilação por arraste a vapor, sendo composto principalmente por terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois associados (SALVATORI, et al. 2017). Devido as possíveis variações que podem ocorrer na sua composição, o OE comercial é caracterizado pela presença de três compostos fitoquímicos, sendo eles terpinel-4-ol, γ -terpineno α -terpeno, onde podem ser observadas variações nas suas quantidades, entretanto, de acordo com a ISO 4730/2017 as mesmas devem ser maiores que 30%, 10-28% e 5-13%, respectivamente.

Além disso, foram descritos seis quimiotipos de *M. alternifolia* (Madon & Bettle) Cheel, sendo eles: um quimiotipo de terpinen-4-ol, um de terpinoleno e quatro de 1,8 cineol. Destes, o quimiotipo terpinen-4-ol é o mais utilizado na produção para extração de OE, possuindo níveis de 30-40% de terpinen-4-ol (HOMER, et al., 2000). Apesar dessas variabilidades na composição entre os quimiotipos, não foram descritas diferenças quanto a sua ação biológica em testes *in vitro* e *in vivo* (CARSON, HAMMER e RILEY, 2006).

O OETT é bastante explorado na área dermatológica sendo utilizado no tratamento de acne, devido a sua propriedade antimicrobiana, dermatite seborreica, gengivite crônica e cicatrização de feridas (PAZYAR et al, 2013). Estudo *in vitro* demonstram que esse OE é indutor de apoptose em linhagem de células cancerígenas, sendo indicado seu uso em fórmulas farmacêuticas de uso tópico contra melanomas e cancro em células escamosas da pele (RAMADAN et al., 2019).

Além disso, o OETT demonstra-se ativo quando avaliado quanto a sua ação antifúngica, inibindo *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Botrytis cinerea* (MIAO et al., 2016; YOUGHUA et al., 2017). Pesquisas *in vivo* demonstraram que o OETT quando aplicado em nanoemulsões demonstram efeito antifúngico mais satisfatório do que os fármacos utilizados convencionalmente (MIAO et al., 2016). Em estudo realizado por Baldissera et al. (2014), o OETT demonstrou ação contra o protozoário *Trypanosoma evansi* e ação sinérgica quando combinado a fármacos utilizados no tratamento dessas doenças.

De acordo com o estudo realizado por Zhang et al (2018) o OETT *in vitro* demonstra ação antioxidante e também antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum*, indicando um bom potencial para aplicação como um agente natural na preservação de alimentos. Demonstra ação *in vitro* contra *L. monocytogenes*, inibindo alguns de seus fatores de virulência como a listeriolisina O, além de ser capaz de inibir genes associados a formação de biofilme em *S. aureus* (LIU et al, 2016; ZHAO et al., 2018).

2.2.2 Aplicação de óleos essenciais na área de alimentos

Os aditivos sintéticos são empregados comumente em alimentos a fim de conservá-los e prolongar seu tempo de vida útil, sendo regulados pelos órgãos competentes, como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o FDA (*Food and Drug Administration*). Porém, de acordo com alguns estudos, seu consumo em doses maiores que o preconizado e de forma prolongada pode causar efeitos adversos à saúde humana (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017). Diante disso, estudos propõem avaliar o potencial de conservação de substâncias naturais para aplicação em alimentos.

Dentre as substâncias naturais que vêm sendo avaliadas, destacam-se as de origem vegetal, uma vez que as plantas possuem a capacidade de sintetizar uma grande variedade de compostos bioativos, como os OE. Os mesmos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-glicemicas, anti-tumorais, analgésica, inseticida e também antimicrobiana (BURT, 2004). Além disso, são consideradas como geralmente seguras (GRAS- *Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (FDA, 2016).

Diante dos riscos que a contaminação microbiana pode oferecer aos consumidores e o aumento no interesse por produtos naturais, a utilização de OE demonstra-se como uma alternativa natural a essa problemática. Entretanto, para melhor usufruir sua aplicação tecnológica, são necessários estudos que busquem avaliar desde sua ação antibacteriana *in vitro* até sua aplicação em matriz alimentar (DANNENBERG, 2017).

Dentre as diversas plantas utilizadas em alimentos, o OE o da especiaria cravo-da-índia (*Synzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perril) demonstra ação antimicrobiana *in vitro* contra bactérias Gram-negativas como *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-positivas como *S. aureus* e *L. monocytogenes*, além dos fungos *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp. e *Candida albicans* (HU, ZHOU e WEI, 2018). Assim como os OE obtidos a partir de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), gengibre (*Zenziber officinale* L.), pimenta rosa e orégano (*Origanum vulgare* L.) demonstraram ação em diferentes estudos contra bactérias Gram-negativas e positivas, dentre elas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* (BAJALAN et al., 2017; QUEDRHIRI et al., 2016; SILVA et al., 2018; DANNEBERG, 2017; KHAN, et al. 2018).

As possibilidades de aplicação desses compostos em alimentos são diversas. Em alguns estudos, busca-se avaliar sua ação quanto aplicado diretamente na matriz alimentar, entretanto a possibilidade de os compostos interagirem com a matriz e alterarem características sensoriais do produto são grandes (GHABRAIE et al., 2016). Em contrapartida, outros trabalhos buscam avaliar a ação dos mesmos quando aplicados em diferentes tipos de embalagens, uma vez que essa interação seria mínima, não levando ao desenvolvimento de características indesejáveis ao produto (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

2.2.3 Embalagens ativas

As embalagens para alimentos são projetadas para a proteção do mesmo a fatores externos que interfiram na sua qualidade, segurança e vida útil. Com os avanços da globalização, o acesso de alimentos de diferentes regiões tornou-se possível e com isso, a necessidade de preservar suas características sensoriais. Sedo assim, as indústrias de alimentos foram impulsionadas a desenvolver embalagens que atendam a essa necessidade (CAROCHO, MORALES e FERREIRA, 2015; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

Considerando as alterações que podem ocorrer em alimentos, são crescentes os estudos visando elaborar embalagens ativas, que interajam com o produto, evitando características não desejáveis (LOPES et. al, 2014; DANNENBERG et al., 2017; SANTOS et al., 2016; LIAKOS et al., 2016). Os materiais utilizados na elaboração dessas embalagens podem incorporar componentes a serem liberados no alimento ou absorver substâncias indesejáveis. Além disso, os componentes responsáveis pela sua função ativa, podem ser incorporados no material da embalagem ou estar presente em um recipiente à parte (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

Visando de reduzir ou evitar os danos causados por micro-organismos na matriz alimentar e também a possível presença de patógenos, várias pesquisas propõem o uso de substâncias antimicrobianas, uma vez que estas permitem a inibição de micro-organismos indesejáveis no produto (LOPES et. al, 2014). Em virtude da contaminação ambiental em decorrência do acúmulo de polímeros sintéticos de difícil degradação,

1 pesquisas recentes propõem estudos sobre as propriedades de polímeros vegetais,
2 explorando alternativas ecologicamente corretas.

3 As aplicações dos OE em embalagens de alimentos podem ser bastante diversas,
4 permitindo o emprego de diferentes tecnologias e polímeros para elaboração das
5 mesmas. Segundo Da Silva et al. (2018), utilizando a técnica de *electrospinnig*, foi
6 possível produzir fibras ultrafinas a partir da proteína de soja e milho com OE de
7 gengibre (*Zinziber officinale* L.) encapsulado, a qual demonstrou como uma alternativa
8 para o controle de *Listeria monocytogenes* em queijo minas frescal. Assim como Wen et
9 al. (2016), utilizaram também a técnica de *electrospinning* encapsulando OE de canela, e
10 verificaram a ação de suas nanofibras *in vitro* contra *E. coli* e *S. aureus*.

11 Chang et al. (2016) elaboraram um sachê antifúngico com OE de orégano
12 (*Origanum vulgare* L.) microencapsulado, o qual demonstrou atividade contra o fungo
13 *Dickeya chrysanthemi* quando aplicado em alface, o qual reduziu até 2 log.UFC.g⁻¹. De
14 acordo com Otoni et al. (2016), os OE mais aplicados em sachês são os de alho (*Allium*
15 *sativa* L.), canela (*Cinnamomum zeylanicum* Ness) e orégano, apresentando ação *in*
16 *vitro* contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Nessas embalagens, os
17 compostos voláteis do OE são liberados gradativamente, propiciando a sua ação
18 antibacteriana, durante o período de armazenamento do alimento.

19 Algumas dessas embalagens podem combinar também a ação absorvente
20 eliminando a umidade, como os hidrogéis incorporados com OE de alecrim, elaborados
21 a partir de amido modificado de arroz (BIDUSKI, (2017). Nesse estudo, foi relatada a
22 ação do OE que foi incorporado aos hidrogéis contra a bactérias Gram-negativas, como
23 *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 e *Pseudomonas*
24 *aeruginosa* ATCC 15442, indicando o potencial antibacteriano da embalagem contendo
25 OE, visando futuras aplicações em alimentos.

26 Estudos mais recentes vêm propodo a elaboração de filmes utilizando como
27 matriz compostos biodegradáveis, como polissacarídeos (hidroximetilcelulose,
28 lignocelulose, quitosana, alginato, amido e celulose) e proteínas (caseína, caseinato,
29 proteínas do soro e gelatina), atendendo a demanda da produção de bioplásticos.
30 Entretanto, a escolha do polímero e o processo de elaboração dos filmes podem

1 influenciar nas propriedades físicas da embalagem, como elasticidade, permeabilidade,
2 cor, transparência e brilho (ATARÉS e CHIRALT, 2016).

3 Dentre os diversos polímeros biodegradáveis que vêm sendo estudados, o
4 acetato de celulose necessita de baixas temperaturas e se destaca devido a sua
5 versatilidade, podendo ser aplicado na forma de fibras, membranas, filmes e plásticos,
6 sendo caracterizado por ser um dos mais importantes ésteres orgânicos que podem ser
7 obtidos a partir de materiais vegetais (WU, 2014). O polímero apresenta biocompostos
8 que possuem propriedades que funcionam como barreira, auxiliando a prolongar o a
9 vida útil dos alimentos e quando combinados com outras substâncias ativas, permitem a
10 proteção contra micro-organismos e a oxidação (MELO et al., 2018).

11 Estudos utilizando acetato de celulose como matriz polimérica como o realizado
12 por Melo et al. (2012), incorporando OE de alecrim, demonstra a ação *in situ* do mesmo
13 em *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes em
14 carne de frango. Assim como nos estudos conduzidos por Liakos et al. (2016),
15 incorporaram o OE de *Cymbopogon flexuosus* (Neesex Stedu) W. Watson, também
16 conhecida como *lemongrass* (cidreira) nessa mesma matriz, avaliando sua ação contra
17 *S. aureus* e *E. coli*.

18 Santos et al. (2016), constataram a ação combinada dos OE de orégano e
19 canela, incorporados em filmes de acetato, contra *S. aureus*, *E. coli* e *Penicilium* spp. *in*
20 *vitro*. Dannenberg et al. (2017), descrevem a ação antibacteriana do OE de pimenta
21 rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) quando incorporado em filmes de acetato, sendo
22 aplicado em queijo fatiado, apresentando-se ativo contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*.
23 Além disso, é importante ressaltar, que a incorporação de OE em matrizes como o
24 acetato de celulose, possibilitam a presença do agente antimicrobiano por um período
25 mais prolongado, propiciando sua liberação gradual no alimento (RIBEIRO-SANTOS,
26 2017).

CAPÍTULO II

Manuscrito formatado de acordo com as normas do *International Journal of Food Microbiology*

3. Manuscrito

Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betcher) Cheel em filme ativo para aplicação em presunto cozido fatiado

Kamila Furtado da Cunha^a, Camila Waschburger Ames^a, Wladimir Padilha da Silva^{ab},
Ângela Maria Fiorentini^{ak}

^a Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia
Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, CEP: 96010-900, RS, Brasil

^b Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Universidade
Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil, CEP: 96010-900, RS, Brasil

kamilafurtado1@hotmail.com

camilaames@hotmail.com

wladimir.padilha2011@gmail.com

angefiori@gmail.com *

*Autor correspondente: Universidade Federal de Pelotas – Departamento de Ciência e
Tecnologia Agroindustrial – Pelotas/RS, Brasil. Tel.: +55 53 3275 7284. E-mail:
angefiore@gmail.com

Resumo

Métodos alternativos visam explorar o potencial de extratos naturais, como os óleos essenciais (OE) para o controle de patógenos em alimentos. Os OE são considerados promissores para diferentes aplicações, uma vez que esses compostos apresentam diversas propriedades biológicas, como a ação antibacteriana. Dentre essas aplicações, busca-se o desenvolvimento de embalagens ativas, utilizando matrizes biodegradáveis, como acetato de celulose, visando minimizar os impactos ao meio ambiente, devido ao acúmulo de polímeros sintéticos. Dessa forma, o objetivo do estudo foi desenvolver filmes de acetato de celulose incorporados com OE de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betcher) Cheell (OETT) e avaliar seu potencial bioativo para aplicação em alimentos. A ação antibacteriana do OETT foi avaliada *in vitro* através de disco difusão, concentração inibitória e bactericida mínima contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e posteriormente foram elaborados filmes com o OETT, sendo avaliados *in vitro* contra os mesmos patógenos através dos testes de disco difusão e cinética de ação em caldo. Os filmes foram avaliados *in situ*, utilizando presunto cozido fatiado, contra *S. Typhimurium* ATCC 14028 e isolados *Salmonella* spp. de origem alimentar. O OE demonstrou ação *in vitro* contra todos patógenos avaliados, sendo preparados tratamentos com filmes de acetato de celulose, onde T1 com 2xCIM (1,56% para isolados e 3,2% para *S. Typhimurium* ATCC 14028) e T2 com 4xCIM (3,2% para isolados e 6,4% para *S. Typhimurium* ATCC 14028), e um filme sem OE. Nos ensaios *in vitro*, o isolado multirresistente de *Salmonella* spp. demonstrou-se mais sensível aos filmes com OE incorporado, quando comparado ao isolado susceptível e a cepa padrão. Na avaliação *in situ*, desde o primeiro dia de exposição da matriz alimentar contaminada aos filmes, tanto para T1 quando T2, foi observado que não houve multiplicação de nenhuma das bactérias em estudo, demonstrando ação bactericida. Dessa forma, conclui-se que o OE de *M. alternifolia* (Maiden & Betcher) Cheell apresenta ação antibacteriana frente a diferentes patógenos alimentares, e quando aplicado em filmes de acetato de celulose, são efetivos no controle de *Salmonella* spp. em presunto cozido.

Palavras-chave: ação bactericida; acetato de celulose; multirresistente; presunto cozido; *Salmonella* spp.; tea tree.

1. Introdução

O consumo de alimentos fora dos padrões higiênicos sanitários é o principal fator responsável pela ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), causando doenças com sintomas brandos e que podem chegar a óbito em casos graves (Marchi et al., 2012; Marinho et al., 2015). Essas doenças são consideradas como importantes causas de morbidade e mortalidade, afetando cerca de um terço da população em países subdesenvolvidos (Akhtar, Sarker e Hossain, 2014).

No Brasil, os agentes bacterianos são responsáveis por 95% dos casos, onde *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* são os mais associados aos surtos (Brasil, 2017). Além disso, apesar de não ser considerado como um dos principais agentes causadores de DTA no Brasil, *Listeria monocytogenes*, é responsável por uma taxa de mortalidade de 30%, sendo associada a casos clínicos graves (Gonçalves et. al, 2016).

Para o controle de patógenos em alimentos, métodos alternativos que visam poexplorar o potencial bioativo de extratos vegetais são promissores. Desta forma, se destacam os óleos essenciais (OE) por apresentarem diferentes propriedades biológicas, como a ação antimicrobiana, baixa toxicidade, não necessitam de solventes para sua extração e podem ser obtidos de qualquer parte das plantas (Burt et al., 2004; Andrade et al., 2014). Dentre eles, o OE de *Melaleuca alternifolia* (Madon & Betcher) Cheel (OETT) é bastante conhecido e caracterizado devido a suas propriedades medicinais e bastante utilizado por apresentar ação antibacteriana e anti-inflamatória (D'auria et al., 2001; Carson, Hammer e Riley, 2006; Salvatori, et al. 2017). Entretanto, seu uso é pouco explorado na área de alimentos.

Existem diversas possibilidades de aplicação dos OE em alimentos. A sua aplicação pode ser realizada diretamente na matriz alimentar, entretanto pode alterar as características sensoriais do produto devido a interação do OE com a matriz (Ghabraie et al., 2016). Em contrapartida, se aplicados em diferentes tipos de embalagens, essa interação seria mínima, não levando ao desenvolvimento de características indesejáveis ao produto (Ribeiro-Santos et al., 2017).

Estudos recentes como desenvolvidos por Melo et al. (2012), Liakos et al. (2016) e Dannenberg et al. (2017) propõem a elaboração de filmes utilizando compostos

biodegradáveis, como o acetato de celulose, e a incorporação de diferentes OE, assim, permitindo a presença do agente antimicrobiano por mais tempo no alimento (Wu, 2014; Ribeiro-Santos, 2017). Com base no exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antibacteriana do OETT em filmes biodegradáveis de acetato de celulose e verificar seu potencial bioativo para aplicação em presunto cozido fatiado.

2. Material e Métodos

2.1. Bactérias

O potencial antibacteriano do OETT foi avaliado contra cepas padrões: *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *E.coli* O157:H7 NCTC 12900. Posteriormente, foi verificada a ação do OE contra isolados de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos e caracterizados por Haubert et al. (2018) (Anexo A). As cepas, bem como os isolados pertencem a coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas.

2.2 Óleo Essencial (OE)

O óleo essencial de *M. alternifolia* (Madon & Betcher) Cheel (OETT) ou *tea tree* avaliado no estudo foi adquirido comercialmente através da Empresa Laszlo® Aromaterapia e Aromatologia LTDA. De acordo com a empresa, o OE é originário do Brasil e extraído por destilação a vapor das folhas, sendo sua composição determinada por Cromatografia Gasosa (CG), sendo os compostos majoritários terpinen-4-ol, α -terpineno e γ -terpineno (Anexo B).

2.3 Atividade antibacteriana do OETT *in vitro*

2.3.1 Disco Difusão

O potencial antibacteriano do OE foi avaliado através da técnica de Disco difusão (CLSI, 2018) a fim de verificar se o mesmo possuía ação contra as bactérias em estudo, sendo realizado em triplicata.

Para realização dos ensaios foram preparados inóculos bacterianos conforme escala 0,5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹), os quais foram semeados em placas contendo Ágar *Mueller Hinton* (MH - Kasvi ®) e posteriormente foram adicionados discos

de papel filtro esterilizado sobre o ágar das placas e adicionou-se 10µL do OETT. Como controle negativo foi utilizado 10µL de água destilada esterilizada e como controle positivo um disco de Gentamicina (10µg). As placas foram incubadas por 24h a 36 °C. A formação de halos de inibição ao redor dos discos indicou atividade antibacteriana do OETT, sendo essa mensurada através da medida dos halos em milímetros.

2.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada através de Microdiluição em Caldo em placas de poliestireno (CLSI, 2018). Para realização dos testes foi utilizado o caldo MH (Acumedia ®) acrescido de 1% do emulsificante Tween 80 (Sigma®). Foram preparadas diluições decimais, de base dois do OETT, no meio de cultura variando de 314,6 mg/mL a 1,84mg/mL. Como controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura, para o controle positivo foi utilizado o meio de cultura acrescido do inóculo bacteriano, e foi feito ainda um controle de esterilidade do OETT. Os testes foram realizados em triplicata, com três repetições para cada cepa bacteriana, e incubados a 36 °C por 24h.

Após o período de incubação realizou-se a adição de 10µL do corante revelador Resazurina (Êxodo ®) em todas as cavidades da placa e posteriormente incubada a 36°C por 2h. A formação da coloração rosa indicou possível atividade bacteriana, possibilitando determinar a CIM.

2.3.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinação da CBM, foram utilizados os resultados obtidos a partir da CIM, dos quais foram semeadas uma alçada de cada cavidade que demonstrou inibição do crescimento bacteriano em placas contendo Ágar *Brain Hearth Infusion* (BHI - Kasvi ®), as quais foram incubados por 24h a 36 °C. Após o período de incubação foi verificado em quais concentrações o OETT teve ação bactericida, indicado pela ausência de crescimento bacteriano. O teste foi realizado em triplicata e com três repetições para cada cepa (CLSI, 2018).

2.4 Elaboração dos filmes

Os filmes foram elaborados de acordo com a técnica de *casting*, como descrito por Gouvêia et. al (2015). Foi preparada a solução filmogênica a partir de acetato de celulose em acetona (3% m/v). Os filmes foram preparados com diferentes

concentrações do OETT, sendo elas 2xCIM (1,56% e 3,2%) e 4xCIM (3,2% e 6,4%), formando os tratamentos T1 e T2 e o tratamento controle (TC), sem adição de OE. Após isso, as soluções foram homogeneizadas em ultra-turex (15.000 rpm) por 5 min e distribuídas em placas de petri de vidro, previamente ambientadas com acetona. As placas foram acondicionadas a temperatura de 25 °C até sua secagem (2h), e posteriormente, foram armazenadas a 4 °C.

2.5 Atividade antibacteriana dos filmes *in vitro*

2.5.1 Disco difusão

Para avaliar a eficácia dos filmes desenvolvidos foi realizado o teste de disco difusão como descrito na seção 2.3.1 sendo medidos os halos de inibição formados (CLSI, 2018).

2.5.2 Cinética de ação

A avaliação da cinética de ação, em caldo, seguiu protocolo descrito por Joray et al. (2011). Foram recortados filmes de 2cm², os quais foram adicionados a 4mL de Caldo BHI acrescidos dos inóculos bacterianos (10⁴ UFC. mL⁻¹). Como controle positivo foi elaborado um tratamento apenas com os inóculos no caldo, sem adição de filme (C+). Foram realizadas as contagens das células viáveis nos tempos 0, 4, 8, 12, 24, 48 e 72h a 36°C em placas contendo ágar XLD (Acumedia ®) para *Salmonella* spp., ágar MacConkey Sorbitol (Acumedia ®) para *E. coli* O157:H7 e ágar Baird Parker (Acumedia ®) para *S. aureus*.

2.5 Atividade antibacteriana dos filmes *in situ*

Foi avaliada a atividade antibacteriana dos filmes desenvolvidos utilizando como matriz alimentar presunto cozido fatiado. Primeiramente o alimento foi submetido a luz UV (Lee et al., 2015) por 15min em ambas as faces, e posteriormente as fatias foram contaminadas com cada um dos isolados de *Salmonella* spp. (S23 e S26) e *S. Typhimurium* ATCC 14028 na concentração de 10⁶ UFC. mL⁻¹, chegando a concentração final de 10⁴ UFC. g⁻¹ no alimento. As fatias contaminadas foram adicionadas entre os filmes, sendo utilizados filmes com concentrações de 1,56% (T1) e 3,2% (T2) para os isolados e 3,2% (T1) e 6,4% (T2) para a cepa padrão, posteriormente

armazenadas sob refrigeração (4-6 °C), retirando as amostras nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias de armazenamento para contagem de células viáveis (UFC.g⁻¹).

2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados através de ANOVA e teste de Bonferoni a fim de detectar as diferenças significativas entre as médias ($p \leq 0,05$), utilizando programa *Graphpad Prims* 7.02.

3. Resultados e discussão

3.1 Atividade antibacteriana do OETT *in vitro*

O OETT demonstrou atividade contra as bactérias Gram-negativa e Gram-positiva avaliadas. Maiores halos de inibição foram observados contra *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* O157:H7 NCTC 12900, quando comparados as demais bactérias em estudo. Com relação a CIM, considerada como a menor concentração do OE capaz de inibir a multiplicação bacteriana, foi verificado que foram necessárias concentrações de 14,9 mg/mL e 30,4 mg/mL do OETT para inibir a multiplicação dos patógenos avaliados. Entretanto, para a CBM, sendo a menor concentração do OE capaz de matar as células bacterianas, foi observado que apenas as maiores concentrações (134,8 e 314,6 mg/mL) avaliadas tiveram ação bactericida frente aos patógenos em estudo (Tabela 1).

Tabela 1: Ação antibacteriana do óleo essencial de *M. alternifolia* (Madon & Betcher) Cheel) frente a patógenos alimentares

Bactérias	Disco difusão (mm ± DP)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	19,6 ± 0,4	4,68	75,0
<i>E. coli</i> O157:H7 NCTC 12900	26,3 ± 0,5	4,68	37,5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	31,3 ± 0,5	4,68	37,5
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	24,3 ± 0,5	9,37	75,0

DP: desvio padrão; CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima; n=3; S12, S14, S23 e S26: isolados de *Salmonella* spp.

Alguns estudos demonstram que o OETT apresenta ação bacteriostática para concentrações variando de 1 a 2% em diferentes micro-organismos. Seu mecanismo de ação já foi parcialmente elucidado, onde até o momento, sabe-se que o mesmo é

responsável por causar perda da integridade da membrana celular, levando ao extravasamento do conteúdo celular, porém não foi estabelecido se é capaz de causar lise em bactérias Gram-positiva. Por outro lado, em bactérias Gram-negativas, é responsável por causar alterações na morfologia celular, respiração aeróbica e lise celular (Carson, Hammer Riley, 2006).

Ciu, Bai e Lin (2018) relatam a ação do OETT contra a *E. coli* O157:H7, semelhante ao descrito por Li et al. (2016), onde o potencial antimicrobiano desse OE foi observado em concentrações de até 2,15mg. mL⁻¹ contra *S. aureus* e *E. coli*, além da ação contra os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Brunn et al. (2018) demonstram ação inibitória do OETT em concentrações de 2% contra *Pseudomonas aeruginosa*, importante bactéria deteriorante em alimentos e também para MRSA (*Methicilin-resistance S. aureus*). Dessa forma, corroboram com os resultados encontrados no presente estudo e indicam que o mesmo é um composto natural promissor a ser explorado contra micro-organismos de interesse alimentar (Shi et al., 2016).

Thomsen et al. (2011) também observaram ação antibacteriana do OETT contra a cepas padrões de bactérias patogênicas em alimentos. Nesse estudo é descrito que o OE apresentou CIM 0,37%, 0,75% e 1,5% para *E. coli* NCTC 10418, *S. aureus* NCTC 6571 e *S. Typhimurium* ATCC 13311, respectivamente.

Liu et al. (2016) também relatam a ação inibitória do OETT em baixas concentrações frente a isolados de *L. monocytogenes*, onde a CIM variou de 0,1-0,2%, e além disso, verificaram que doses subinibitórias (1/2 CIM, 1/4 CIM e 1/6 CIM do OE são capazes de inibir a expressão de importantes fatores de virulência que auxiliam na sua patogenicidade como a listeriolisina O. Apesar de ter sido observado no presente estudo que concentrações de 30,4 mg/mL do OETT inibiram a multiplicação de *L. monocytogenes* ATCC 7644, para as demais bactérias avaliadas no estudo foram necessárias concentrações de 14,9 mg/mL para exercer a ação bacteriostática. Desta forma, essas bactérias foram selecionadas para dar continuidade nos demais testes.

Dentre as cepas padrão avaliadas no estudo, *S Typhimurium* ATCC 14028 demonstrou-se mais susceptível aos filmes com as diferentes concentrações de OETT. Desta forma foram elencados isolados oriundos de alimentos previamente caracterizados por Haubert et al. (2018), para que fosse avaliada a ação antibacteriana

in situ do filme com OETT incorporado, a fim de simular condições mais próximas possíveis do alimento.

3.2 Atividade antibacteriana dos filmes *in vitro*

A ação dos filmes TC, T1 e T2 foi determinada contra a *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 e *S. Typhimurium* ATCC 14028, por disco difusão. De acordo com os resultados obtidos é possível observar que não ocorreu a formação de halo de inibição dos filmes TC e T1. Entretanto, para o filme T2, elaborado com 4xCIM (6,4%), foram observados halos de inibição contra os patógenos em estudo, variando de 11 a 15,3mm (Tabela 2).

Na tabela 2 estão descritos os resultados obtidos a partir da disco difusão com os filmes ativos contra aos isolados de *Salmonella* spp. Nota-se que para os filmes TC, sem OE, não foram observados halos de inibição. Mas para o T1, filme com 2xCIM (1,56%) e para os filmes elaborados com 4xCIM (3,2%) foram observados halos de inibição para os dois isolados que variaram de 15,6 a 23,7mm, sendo formado maiores halos para o isolado multirresistente (S23).

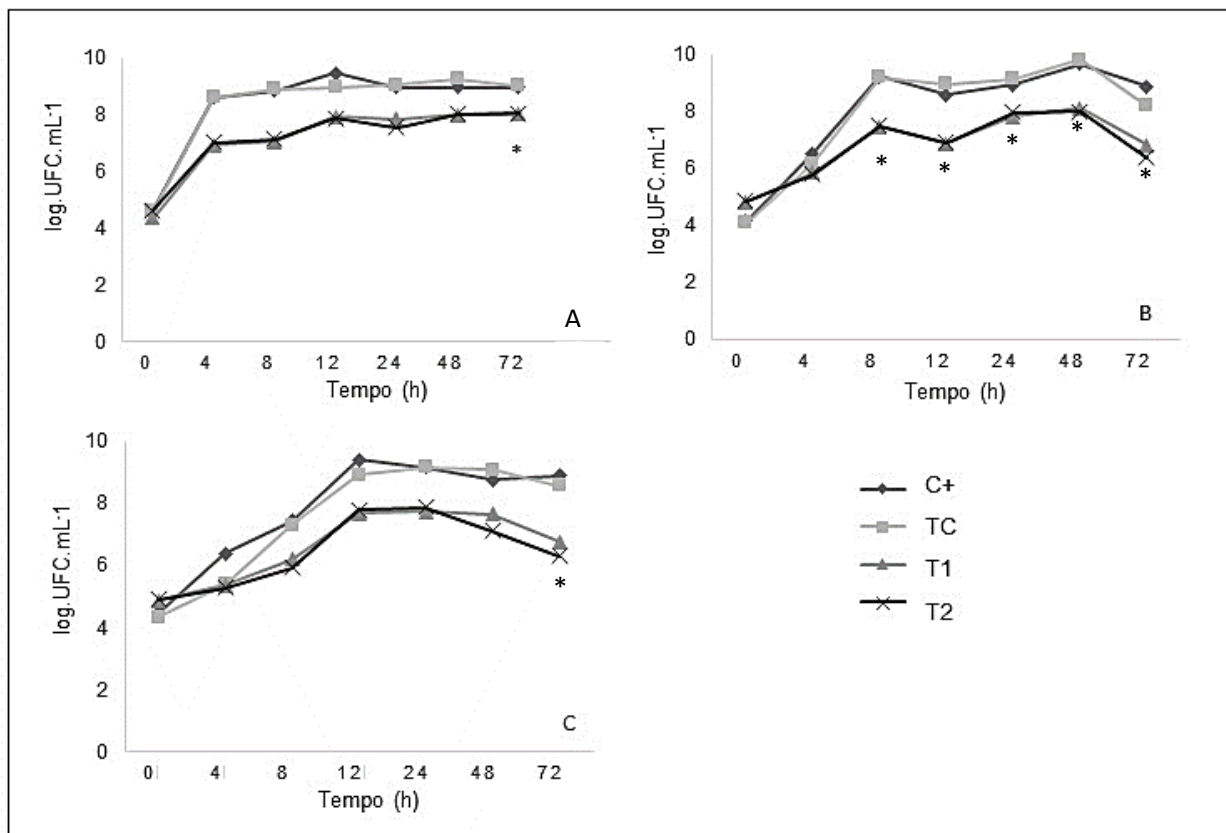
Tabela 2: Valores dos halos de inibição formados (disco-difusão) pela ação de filmes com diferentes concentrações do óleo essencial de *M. alternifolia* (Madon & Bettle) Cheel frente a patógenos alimentares

Bactérias	TC	T1	T2
Halo de inibição (mm $\pm$ DP)			
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	ND	ND	11 $\pm$ 0,1
<i>E. coli</i> O157:H7 NCTC 12900	ND	ND	13 $\pm$ 0,3
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	ND	ND	15,3 $\pm$ 0,18
S26	ND	17,7 $\pm$ 0,5	20,7 $\pm$ 0,4
S23	ND	15,6 $\pm$ 0,5	23,7 $\pm$ 0,5

DP: desvio padrão; ND: não detectado; TC: tratamento controle; T1: concentração do óleo essencial de *tea tree* 3,2% para cepas padrão e 1,56% para isolados; T2: concentração do óleo essencial de *tea tree* de 6,4% para cepas padrão e 3,2% para isolados; S26 e S23: isolados de *Salmonella* spp.

Com relação a cinética de ação em caldo dos filmes elaborados, os resultados obtidos foram analisados comparando as concentrações de OETT utilizadas nos filmes com os intervalos de tempo em que foram realizadas as contagens de células viáveis. Para todas as bactérias avaliadas, foi observado que houve diferenças entre os tratamentos dos filmes com as concentrações de OE quando comparados aos

1 tratamentos controle. Entretanto, não foram observadas diferenças entre as
2 concentrações de OE avaliadas nos tratamentos (Figura 3).



3
4 Figura 3: Cinética de ação em caldo de filmes com diferentes concentrações do óleo essencial de *M.*
6 *alternifolia* (Madon & Betcher) Cheel frente a bactérias patogênicas em alimentos
7 A: *E. coli* O157:H7 NCTC 12900; B: *S. Typhimurium* ATCC 14028; C: *S. aureus* ATCC 25923; C+:
8 controle de crescimento bacteriano; TC: filme sem óleo essencial; TC1: filme com 3,2% de óleo
9 essencial de *tea tree*; T2: filme com 6,4% de óleo essencial de *tea tree*; * : diferença significativa.

10

11 Para *S. aureus* ATCC 25923 foi verificado que as contagens nos tratamentos sem
12 OETT (C+ e TC) aumentaram de 4,3 para 8,7 log.UFC.mL⁻¹, enquanto que nos
13 tratamentos com OETT (T1 e T2), as contagens finais foram de 6,8 e 6,5 log.UFC.mL⁻¹,
14 respectivamente. Padrão semelhante foi observado para *E. coli* NCTC 12900, onde os
15 tratamentos sem OETT (C+ e TC) aumentaram de 4,4 para 8,5 log.UFC.mL⁻¹ e para os
16 tratamentos com OETT, T1 e T2, encontraram-se em 6,8 e 6,3 log.UFC.mL⁻¹. As
17 contagens de *S. Typhimurium* ATCC 14028 para os tratamentos C+ e TC, aumentaram
18 de 4,6 para 8,4 log.UFC.mL⁻¹ e com os tratamentos com OETT, mantiveram-se em 6
19 log.UFC.mL⁻¹ para T1 e T2 (Figura 3).

Conforme os resultados obtidos, para *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 e *S. aureus* ATCC 25923 foi observado que ao longo do tempo analisado houve diferença significativa dos tratamentos dos filmes com OE, apenas após 72h de exposição aos mesmos, quando comparado aos tratamentos controles (sem adição OE). Entretanto, para *S. Typhimurium* ATCC 14028 houve diferença significativa a partir de 8h de exposição aos filmes com o OETT, sendo mantida até o período final de avaliação (Figura 3).

Li et al. (2016) ao avaliarem a cinética de ação do OETT observaram que para *S. aureus* e *E. coli*, houve uma tendência quanto as concentrações do OE e tempo de exposição, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo, visto que aplicando concentrações de 2xCIM (3,2%) e 4xCIM (6,4%) para *E. coli* NCTC 120900 e *S. aureus* ATCC 25923 foram observadas diferenças significativas nas contagens de células viáveis após 72h, e para *S. Typhimurium* ATCC 14028, a partir de 8h de exposição.

Através da cinética de ação em caldo, foi possível observar que houve diferença significativa entre T1 e T2, quando comparados aos tratamentos controles (C+ e TC), sendo o T2 mais eficiente em inibir a multiplicação bacteriana *in vitro*. Com relação ao isolado S23, nota-se que o filme T2 passou a causar o efeito inibitório após 24h de contato. Já para o isolado S26, foi observado diferença significativa na multiplicação celular apenas em 4h e 72h, indicando que frente a esse isolado, seria necessário um maior tempo de exposição para ação do OETT.

Para o isolado S26 foi observado que as contagens nos tratamentos sem OETT (C+ e TC) aumentaram de 4,4 para 10,7 log.UFC.mL⁻¹, enquanto que nos tratamentos com OETT (T1 e T2), sendo 2xCIM e 4xCIM, as contagens finais foram de 7,8 e 6,7 log.UFC.mL⁻¹, respectivamente. Para o isolado S23, a multiplicação nos tratamentos sem OETT (C+ e TC) aumentaram de 4,4 para 8,5 log.UFC.mL⁻¹ e para os tratamentos com OETT, T1 e T2, encontraram-se em 7,9 e 6,7 log. log.UFC.mL⁻¹ (Figura 4).

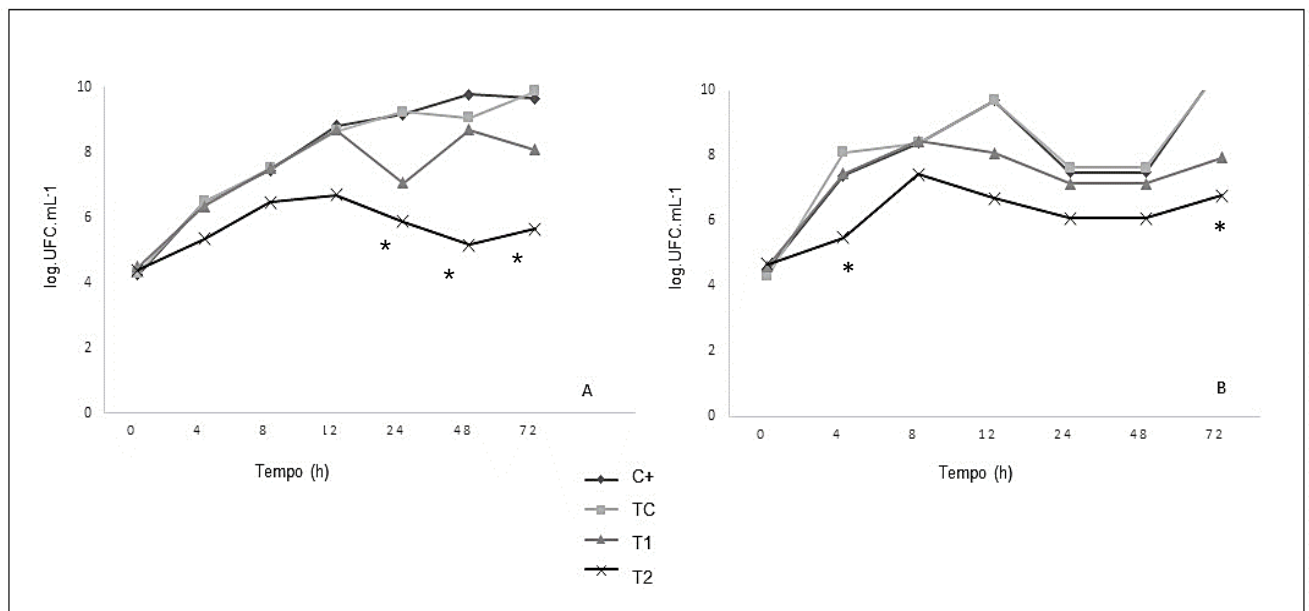


Figura 4: Cinética de ação em caldo do óleo essencial de *M. alternifolia* (Madon & Betché) Cheel frente a isolados de *Salmonella* spp.

A: Isolado S23; B: Isolado S26; C+: controle de crescimento bacteriano; TC: filme sem óleo essencial; TC1: filme com 1,56% de óleo essencial de *tea tree*; T2: filme com 3,2% de óleo essencial de *tea tree*; *: diferença significativa.

Assim como nos resultados obtidos, Messenger et al. (2005) relatam a ação antibacteriana do OETT frente a bactérias multirresistentes, dentre elas MRSA apresentando CIM variando de 0,25-0,5%, sendo esse considerado como um dos patógenos nosocomiais mais importantes. Entretanto, não foram observadas diferenças quanto ao perfil de sensibilidade ao OE, de isolados multirresistentes e susceptíveis.

É importante destacar que dentre os isolados avaliados, o multirresistente (S23) demonstrou maior sensibilidade nos testes de disco difusão e cinética de ação em caldo. Assim como em nosso estudo, Oliva et al. (2018) relatam que o OETT apresentou ação contra bactérias multirresistentes, dentre elas MRSA, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* produtores de carbapenemase, e quando combinados com antibacterianos de uso convencional, demonstrou-se sinérgico, potencializando a ação dos fármacos. Desta forma, de acordo com esses resultados *in vitro*, pode-se sugerir que esse OE pode ser uma alternativa viável e natural no controle de bactérias multirresistentes.

3.3 Ação antibacteriana do filme *in situ*

No experimento *in situ*, conforme resultados demonstrados na Figura 5, verificou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos controles, C+ e TC com relação aos tratamentos avaliados dos filmes com OETT incorporado. Como pode ser observado, para as três bactérias avaliadas, desde o primeiro dia em que a matriz alimentar contaminada foi exposta aos filmes com OE (T1 e T2), não houve contagem de células viáveis, demonstrando que os filmes com OETT *in situ* apresentaram ação bactericida.

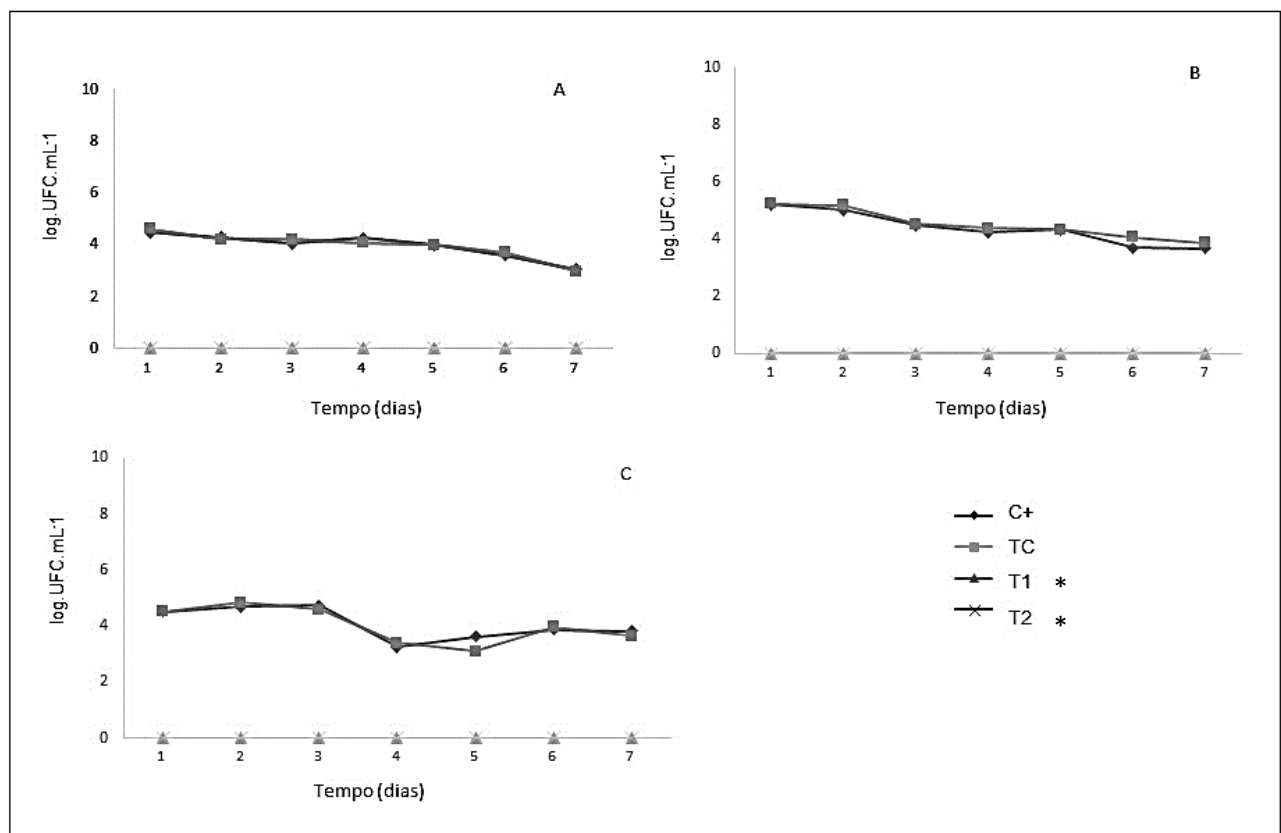


Figura 5: Ação antibacteriana de filmes com diferentes concentrações de óleo essencial de *M. alternifolia* (Madon & Betché) Cheel contra isolados *Salmonella* spp. em presunto cozido durante período de armazenamento

A: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; B: Isolado S23; C: Isolado 26; C+: controle de crescimento bacteriano; TC: filme sem óleo essencial; T1: filme com 2xCIM do óleo essencial de *tea tree*; T2: filme com 4xCIM do óleo essencial de *tea tree*; *: diferença significativa.

Extratos vegetais e OE quando avaliados em matrizes alimentares geralmente necessitam de maiores concentrações do que as determinadas em testes *in vitro* para que seja alcançado o efeito desejado (Aminzare et al., 2015). Porém a elaboração de filmes de acetato de celulose incorporados com OE garante a estabilidade e liberação

gradual do mesmo no alimento, conferindo ação antibacteriana. Contudo, como filmes são preparados sem utilização de elevadas temperaturas, não alteram a composição dos OE, garantindo seu potencial bioativo (Gouvêa et al., 2015).

Entretanto, de acordo com os resultados obtidos *in situ*, os filmes com as menores concentrações avaliadas, 3,2% e 1,56% (2xCIM), contra a cepa padrão de *S. Typhimurium* ATCC 14028 e os isolados (S23 e S26), respectivamente, demonstraram ação bactericida quando aplicados em presunto cozido fatiado. Além disso, foram necessárias baixas concentrações dentre as avaliadas nos testes *in vitro* anteriores, não sendo preciso aplicar concentrações maiores como 4xCIM.

Dentre os métodos de controle de micro-organismos, a refrigeração e o congelamento, são uns dos mais utilizados, uma vez que inibem a multiplicação celular (Aminzare, et al., 2016). Entretanto, bactérias como *Salmonella* spp. possuem a capacidade de manter sua viabilidade em baixas temperaturas (4-7 °C) (Murray et al., 2017), e quando presentes em alimentos prontos para o consumo, como presunto, podem levar ao desenvolvimento de DTA.

De acordo com os resultados obtidos, a combinação da temperatura de refrigeração, simulando as condições de armazenamento de presunto cozido fatiado, junto do uso dos filmes bioativos com o OETT, demonstraram-se eficientes no controle de *Salmonella* spp. Além disso, é atendida uma das tendências atuais dos consumidores em utilizar produtos naturais em alimentos, reduzindo o uso de conservantes sintéticos e também levando ao uso de embalagens biodegradáveis (AMINZARE, et al., 2016).

Até o presente momento, poucos estudos foram feitos sobre a aplicabilidade do OETT em alimentos. Dentre eles, o estudo realizado Shi, Zhang e Guo (2018) os quais avaliaram a ação antibacteriana do OETT contra *E. coli* e *L. monocytogenes* em suco de pepino em temperatura ambiente e de refrigeração, e verificaram ação antibacteriana contra esses patógenos.

Cui, Bai e Lin (2018) avaliaram a aplicação do OETT na elaboração de nano fibras, as quais foram aplicadas em carne bovina contra *E. coli* O157:H7, onde relataram redução de mais 99% da população bacteriana inoculada inicialmente. Baldissera et al. (2018) propõem a nanoencapsulação do OETT como alternativa para evitar a oxidação em peixes contaminados com *P. aeruginosa*. Lin et al. (2018), descrevem que a

microencapsulação do OETT potencializou a ação contra *E. coli* O157:H7 após 13h de exposição, quando comparado ao tratamento apenas com OE.

Vasile et al. (2017) avaliaram o potencial antibacteriano do OETT e suas possíveis aplicações em alimentos, onde concluem que uma das possibilidades promissoras, seria a aplicação em embalagens. O estudo realizado por Cui et al. (2018) demonstra a aplicação do OETT contra *Salmonella* spp. em frango, a qual causou pouca interferência na matriz alimentar e redução bacteriana de até 5 log UFC.g⁻¹, sendo semelhante ao demonstrado no presente estudo. Assim, aplicação do OE em filmes de acetato de celulose demonstra-se vantajosa, uma vez que permite a estabilidade do mesmo por mais tempo, possibilitando sua liberação gradual e efeito protetor no alimento (Jingou et al., 2011).

Além disso, levando em consideração que *Salmonella* spp. é um dos principais agentes causadores de DTA no Brasil, estando associado principalmente a alimentos de origem animal, como presunto, os resultados obtidos nos testes *in situ* sobre a ação antibacteriana demonstram-se bastante satisfatórios, até mesmo contra isolados alimentares multirresistentes. Assim, a aplicabilidade dos filmes com OETT na área de alimentos demonstra-se promissora, uma vez que o mesmo foi pouco explorado até o momento e apresenta bom potencial antibacteriano *in vitro* e *in situ*.

4. Conclusão

O óleo essencial de *Melaleuca alterinfolia* (Maiden & Betche) Cheel apresentou ação contra diferentes patógenos alimentares. Sua aplicação em filmes de acetato de celulose demonstrou-se como uma alternativa viável para o controle de *Salmonella* spp. *in vitro* e *in situ* quando avaliado em presunto cozido fatiado, garantindo a segurança microbiológica do produto.

Referências

Akhtar, S., Sarker, M.R., Hossain, A. 2014. Microbiological food safety: a dilemma of developing societies. Crit. Rev. Microbiol., 40, 348–359, doi: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.742036>.

- Aminzare, M., Hashemi, M., Azar, H. H., Hejazi, J. 2016. The use of herbal extracts and essential oils as a potential antimicrobial in meat and meat products: a review. *J. Hum. Environ. Health Promot*, 1, 63-74, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.014>.
- Andrade, B. F. M., Barbosa, L. N., Probst, I. S., Junior, A. F. 2014. Antimicrobial activity of essential oils, *JEOR*, 26, 34-40, <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.860409>.
- Baldissera, M. D., Souza, C. F., Doleski, P. H., Santos, R. C.V., Raffin, R. P., Baldisserotto, B. 2018. Involvement of xanthine oxidase inhibition with the antioxidant property of nanoencapsulated *Melaleuca alternifolia* essential oil in fish experimentally infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Fish Dis.*, 41, 791-796, <https://doi.org/10.1111/jfd.12779>.
- BRASIL: Ministério da Saúde. 2017. Secretaria de Vigilância em Saúde. Surto de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf> (Accessed 26 Jul 2017).
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *Internat. Food Microb.*, 94, 223-253, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
- Brunn, P., Bernabè, G., Filippini, R., Piovan, A. 2018. In vitro antimicrobial activities of commercially available tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oils. *Ant. Agents. And Chemo.*, p.1-9, <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002>.
- Carson, C. F., Hammer, K. A., Riley, T. V. 2006. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of its antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.*, 50-62, <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006>.
- CLSI, 2018. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; M100. Approved Standard —28th Edition.
- CLSI, 2018. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; M07 Approved Standard — 13th Edition.
- Colla, F. L., Mion, L., Parizotto, L., Santos, L. A., Pilotto, F., Rodrigues, L. B., Nascimento, W. P., Santos, L. R. 2014. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e eficácia de sanitizantes aos isolados de *Salmonella* spp. oriundos de carcaças suínas

no Rio Grande do Sul. Rev. Vet. Brasil., 34, 320-324, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2014000400003>.

Cui, H, Bai, M., Lin, L. 2018. Plasm-treated poly (ethylene oxide) nanofibers containing tea tree oil/beta-cyclodextrin inclusion complex for antibacterial packaging. Carbohydr. Polym., 179, 360-369, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.011>.

Cui, H., Bai, M., Li, C.; Liu, R., Lin, L. 2018. Fabrication of chitosan nanofibers containing tea tree oil liposomes against *Salmonella* spp. in chicken. LWT, 96, 671-678, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.026>.

Dannenberg, G. S., Funck, G. D., Cruxen, C. E. S., Marques, J. L. Silva, W. P., Fiorentini, A. M. 2017. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. LWT, 81, 314-318, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.002>.

D'auria, F. D., L. Laino, V. Strippoli, M. Tecca, G. Salvatore, L. Battinelli, G. Mazzanti. 2001. *In vitro* activity of tea tree oil against *Candida albicans* mycelial conversion and other pathogenic fungi. J. of Chemo., 13, 377-383, <https://doi.org/10.1179/joc.2001.13.4.377>.

Ghabraie, M., Vu, K.D., Tata, L., Salmieri, S., Lacroix, M. 2016. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. LWT, 66; 332-339, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.055>.

Gonçalves, R. C., Faleiro, J. H., Santos, M. N. G., Carvalho, S. A., Malafaia, G. 2016. Micro-organismos emergentes de importância em alimentos: uma revisão de literatura. SaBios. 11, 71-83 .

Gouvêia, D. M., Mendonça, R. C. S., Soto, M. L., Cruz, R. S. 2015. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. LWT, 63, 85-91, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.014>.

Haubert, L., Zehetmeyr, M. L., Pereira, Y. M. N., Kroning, I. S., Maia, D. S. V., Sehn, C. P., Lopes, G. V., De Lima, A. S., Da Silva, W. P. 2018. Tolerance to benzalkonium chloride and antimicrobial activity of *Butia odorata* Barb. Rodr. extract in *Salmonella* spp. isolates with biofilm forming ability. Food Res. Int. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.092>.

- Haubert, L., Mendonça, M., Lopes, G. V., Cardoso, M. R. D. I., & Silva, W. P. 2016. *Listeria monocytogenes* isolates from food and food environment harbouring tetM and ermB resistance genes. Lett Appl. Microbiol., 62, 23–29. <https://doi.org/10.1111/lam.12516>.
- Jingou, J., Shilei, H., Danjun, W., Tengfei, W., Yi, X. 2011. Preparation, characterization of hydrophilic and hydrophobic drug in combine loaded chitosan/cyclodextrin nanoparticles and *in vitro* release study. Colloids Surf. B: Biointerfaces, 83, 103–107, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.11.005>.
- Joray, M. B., Rollán, M. R., Rutz, G. M., Palacios, S. M., Carpinella, M. C. 2011. Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina-Isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*. Planta Med., 77, 95-100, <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250133>.
- Lee, J.-H., Lee, J., Song, K. Bin. 2015. Development of a chicken feet protein film containing essential oils. Food Hydrocol. 46, 208–215, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.020>.
- Li, W.; Li, H., Shi, Q., Sun, T., Xie, X., Song, B., Huang, X. 2016. The dynamics and mechanism of the antimicrobial activity of tea tree oil against bacteria and fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol., 100, 8865-8875, <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7692-4>.
- Lopes, G. V., Michael, G. B., Cardoso, M., Schwarz, S. 2014. Identification and characterization of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* Derby isolates carryibg a new aadA26 gene cassette in a class 1 integron obtained at pig slaughterhouses, FEMS, 356, 71-78, <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12473>.
- Marchi, D. M., Baggio, N., Teo, C. R. P. A., Bussato, M. A. 2011. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995-2007. Epidemiol. Serv. Saúde, 23, 401-407, <https://doi.org/10.5123/s1679-49742011000300015>.
- Marinho, G. A., Oliveira, G. S., Lima, J. L., Lopes, W. M. A., Nunes, G. A., Nunes, M. G. A. 2015. Perfil Epidemiológico das Doenças Transmitidas por alimentos e seus fatores casuais na Região da Zona da Mata Sul de Pernambuco. Cienc. Biol. Saude, 17, 238-244, <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2013v34n1p97>.

1 Messenger, S., Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. 2005. Assessment of the
2 antibacterial activity of tea tree oil using the European EN 1276
3 and EN 12054 standard suspension tests. J. Hosp. Infect., v. 59, p. 113–125,
4 <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.07.015>.

5
6
7 Murray, P. R., Rosenthal, Ken S.; Pfaller, Michel. A. 2017. Enterobacteriaceae In:
8 Microbiologia Médica. (8ed.) Elsevier, Rio de Janeiro, pp.251-264.

9
10
11 Oliva, A., Costantini, S., Angelis, M., Garzoli, S., Bozovic, M., Mascellino, M. T., Vullo, V.;
12 Ragno, R. 2018. High potency of *Melaleuca alternifolia* essential oil against multi-drug
13 resistant gram-negative bacteria and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
14 Molecules, 23, 1-14, <https://doi.org/10.3390/molecules23102584>.

15
16
17 Ribeiro -Santos, R., Andrade, M., Melo, N. R. DE, & Sanches- Silva, A. 2017. Use of
18 essential oils in active food packaging: recent advances and future trends. Trends Food
19 Sci. Technol., 61, 132–140, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.021>.

20
21
22 Sarvatori, C., Barchi, L., Guzzo, F., Garcari, M. 2017. A comparative study of
23 antibacterial and anti-inflammatoru effects of mouthrinse containing tea tree oil. Oral &
24 Imlantol., 1, 59-70, <https://doi.org/10.11138/orl/2017.10.1.059>.

25
26
27 Shi, C., Zhang, X., Guo, N. 2018. The antimicrobial activities and action-mechanism of tea
28 tree oil against food-borne bacteria in fresh cucumber juice. Mic. Path., 17, 1-40,
29 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.036>.

30
31
32 Thomsen, P. S., Jensen, T. M., Hammer, K. A., Carson, C. F., Molgaard, P., Riley, T. V.
33 2011. Survey of the antimicrobial activity of commercially available Australian tea tree
34 (*Melaleuca alternifolia*) essential oil products in vitro. J. Altern. Complement. Med., 9, 835-
35 841, <https://doi.org/10.1089/acm.2010.0508>.

36
37
38 Vasile, C., Sivertsvik, M., Mitelut, A. C., Brebu, M. A., Stoleru, E., Rosnes, J. T., Tânase,
39 E. E., Khan, W., Pamfil, D., Cornea, C. P., Irimia, A., Popa, M. E. 2017. Comparative
40 analysis of the composition and activity property evaluation of certain essential oil:
41 assess their potential applications in active food packaging. Materials, 10, 2
42 <https://doi.org/10.3390/ma10010045>.

43
44
45 Wu, C.S. Mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of cross-linked
46 cellulose acetate reinforced polyester composites. 2014. Carbohydr. Polym., 105, 41–48,
47 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.062>.

4. Considerações finais

Foi verificado que óleo essencial de *Melaleuca alterinfolia* (Maiden & Betcher) Cheel (*tea tree*) apresentou ação *in vitro* contra diferentes patógenos alimentares, sendo eles *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* e *S. Typhimurium*. Além disso, filmes biodegradáveis preparados com acetato de celulose com concentrações de 6,4% de OE demonstraram-se eficazes *in vitro* contra *E. coli* O157:H7, *S. aureus* e *S. Typhimurium*.

Levando em consideração os patógenos avaliados, *S. Typhimurium* demonstrou maior sensibilidade frente ao OE, sendo assim foi avaliada a ação do mesmo *in vitro* e aplicação contra isolados de origem alimentar de *Salmonella* spp., a qual é considerada como a principal causadora de DTA no Brasil.

É importante ressaltar que dentre os isolados avaliados, para o que apresentou fenótipo e genótipo de multirresistência, foram necessárias menores concentrações do óleo essencial para inibi-lo *in vitro* e *in situ*, indicando ser uma alternativa viável para o controle desse patógeno.

Assim, a aplicação do óleo essencial de *tea tree* em filmes biodegradáveis de acetato de celulose demonstrou-se como uma alternativa viável para o controle de *Salmonella* spp. *in vitro* e *in situ* quando avaliado em presunto cozido fatiado, conferindo o efeito conservante ao mesmo e garantindo a segurança microbiológica do produto.

Porém, considera-se relevante a avaliação dos filmes com OETT contra outros patógenos de importância em alimentos, bem como em outras matrizes alimentares a fim de estabelecer um maior espectro de ação e possibilidade de aplicações na área de alimentos. Além disso, é necessário determinar a citotoxicidade do OE, garantindo quais concentrações podem ser utilizadas de forma segura, não oferecendo riscos à saúde humana.

Referências

- AKHTAR, S.; SARKER, M.R.; HOSSAIN, A. Microbiological food safety: a dilemma of developing societies. **Critical Review Microbiology**, v.40, p.348–359, 2014.
- ALONZO, V. P. P. **Biofilmes monoespécie e multiespécie de patógenos gram-positivos de origem láctea em diferentes substratos**. 100f. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2015.
- AMINZARE, M. HASHEMI, M.; AZAR, H. H.; HEJAZI, J. The use of herbal extracts and essential oils as a potential antimicrobial in meat and meat products: a review. **Journal of Human, Environment and Health Promotion**, v.1, n.2, p. 63-74, 2016.
- ANDRADE, B. F. M.; BARBOSA, L. N.; PROBST, I. S.; JUNIOR, A. R. Antimicrobial activity of essential oils, **Journal of Essential Oil Research**, v.26, n.1, p.34-40, 2014.
- ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v.48, p. 51-62, 2016.
- BAJALAN, I.; ROUZBAHANI, R.; PIRBALOUTI, A. G.; MAGGI, F. Antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. **Industrial Crops and Products**, v.107, p. 305-311, 2017.
- BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; DOLESKI, P. H.; SANTOS, R. C.V.; RAFFIN, R. P.; BALDISSEROTTO, B. Involvement of xanthine oxidase inhibition with the antioxidant property of nanoencapsulated *Melaleuca alternifolia* essential oil in fish experimentally infected with *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Fish Disease**, v.41, p. 791-796, 2018.
- BALDISSERA, M. D.; DA SILVA, A.; OLIVEIRA, C. B.; SANTOS, R. C. V.; VAUCHER, R. A.; RAFFIN, R. P.; GOMES, P.; DAMBROS, M. G. C.; MILETTIM L. C.; BOLIGON, A.; ATHAYDE, M. L.; MONTEIRO, S. G. Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. **Experimental Parasitology**, v.141, p.21-27, 2014.
- BRASIL– SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE - SUS. SVS - **Doenças transmitidas por alimentos**, disponível

em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta>>. Acesso em: 22 abri 2017.

BRASIL- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surto de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, disponível em <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>> Acesso em 26 jul 2017.

BIDUSKI, B. **Desenvolvimento de hidrogéis bioativos de amido de arroz com óleo essencial de alecrim**. 2017, 117f. Tese (Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

BOZIK, M.; CEJNAR, P.; SASKOVA, M.; NOVÝ, P.; MARSIK, P.; KLOUCEK, P. Stress response of *Escherichia coli* to essential oil components- insights on low-molecular-weight proteins from MALDI-TOF. **Scientif reports**, v. 13042, n.2, p.1-9, 2018.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods- a review. **International of Food Microbiology**, v.94, .223-253, 2004.

BRUNN, P.; BERNABÈ, G.; FILIPPINI, R.; PIOVAN, A. In vitro antimicrobial activities of commercially available tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oils. **Current Microbiology**, p.1-9, 2018.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of a antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 50-62, 2006.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. Natural food additives: Quo vadis? **Trends in Food Science & Technology**, v.45, n.2, p284-295, 2015.

CENTER OF CONTROL DISEASES. Food Safety. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/cdc-and-food-safety.html>> Acesso em: 20 nov. 2018.

CENTER OF CONTROL DISEASES. General Information *Escherichia coli*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>> Acesso em: 22 nov. 2018.

CENTER OF CONTROL DISEASES. Surveillance for Foodborn Disease Outbreaks United States, 2016: Annual Report. <<https://www.cdc.gov/fdoss/annual-reports/index.html> > Acesso em 18 jan. 2019.

CHANG, Y.; CHOI, I.; CHO, A. R.; JAEJOON, H. Reduction of *Dickeya chrysanthemi* on Fresh-cut Iceberg Lettuce using antimicrobial sachet containing microencapsulated oregano essential oil. **LWT- Food Science and Technology**. v.82, n.1, p. 361-368, 2016.

CLSI, 2018. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; M100**. Approved Standard —28th Edition.

CLSI, 2018. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; M07** Approved Standard — 13th Edition.

COLLA, F. L.; MION, L.; PARIZOTTO, L.; SANTOS, L. A.; PILOTTO, F.; RODRIGUES, L. B.; NASCIMENTO, W.; P.; SANTOS, L. R. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e eficácia de sanitizantes aos isolados de *Salmonella* spp. oriundos de carcaças suínas no Rio Grande do Sul. **Revista Veterinária Brasileira**, v.34, n.4, p.320-324, 2014.

COSTA, E. F. **Validação de estratégias a campo para o controle de *Salmonella* spp. Na cadeia de produção de suínos**. 2014, 63f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande, 2014.

COSTERTON, J. W.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. **The International Journal of artificial organism**. n. 11, v. 28, p. 1062- 1068, 2005.

CUI, H; BAI, M.; LIN, L. Plasm-treated poly (ethylene oxide) nanofibers containing tea tree oil/beta-cyclodextrin inclusion complex for antibacterial packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, n.1, p.360-369, 2018.

CUI, H.; BAI, M.; LI, C.; LIU, R.; LIN, L. Fabrication of chitosan nanofibers containing tea tree oil liposomes against *Salmonella* spp. in chicken. **LWT – Food and Science Technology**, v. 96, p. 671-678, 2018.

DANNENBERG, G. S.; FUNCK, G. D.; CRUXEN, C. E. S.; MARQUES, J. L. SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT Food Science and Technology**. v.81, p. 314-318, 2017.

Dannenberg, G. da S. **Óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* RADDI): atividade antimicrobiana e aplicação como componente ativo em filme para a bioconservação de alimentos**. 2017. 121f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de PósGraduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. 2017.

D'AURIA, F. D., L. LAINO, V. STRIPPOLI, M. TECCA, G. SALVATORE, L. BATTINELLI, G. MAZZANTI. *In vitro* activity of tea tree oil against *Candida albicans* mycelial conversion and other pathogenic fungi. **Journal of Chemotherapy**, v.13, p.377–383, 2001.

DA SILVA, F. T.; CUNHA, K. F.; FONSECA, L. M.; ANTUNES, M. D.; EL HALAL, S. L. M.; FIORENTINI, A. M.; DA ROSA ZAVAREZE, E.; DIAS, A. R. G. Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control *in situ*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.118, p. 107-115, 2018.

FENALTI, J. M.; BACCEGA, B.; SANTOS, T. M.; SANTOS, P. C.; SCAINI, C. J. Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. **Vitalle- Revista de Ciências da Saúde**. v.28, p. 39-48, 2016.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Chapter I food and drug administration, department of health and human services, subchapter B food for human consumption (continued), Part 182 substances generally recognized as safe (GRAS), subpart a general provisions, subpart 182.20 essential oils, oleoresins, and natural extractives. In: **Code of federal regulations (CFR)**. Office of the Federal Register, Washington, 2016.

GHABRAIE, M., VU, K.D., TATA, L., SALMIERI, S., LACROIX, M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **LWT - Food and Science Technology**. v. 66; p. 332–339. 2016.

GONÇALVES, R. C.; FALEIRO, J. H.; SANTOS, M. N. G.; CARVALHO, S. A.; MALAFAIA, G. Micro-organismos emergentes de importância em alimentos: uma revisão de literatura. **Revista de Saúde e Biologia**. v.11, n.2, p.71-83, 2016.

GOUVÊIA, D. M.; MENDONÇA, R. C. S.; SOTO, M. L.; CRUZ, R. S. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. **Food Science Technology**. v.63, p. 85-91, 2015.

GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono-and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**. v.14, p.1-6, 2015.

HAUBERT, L.; ZEHETMEYR, M. L.; PEREIRA, Y. M. N.; KRONING, I. S.; MAIA, D. S. V.; SEHN, C. P.; LOPES, G. V.; DE LIMA, A. S.; DA SILVA, W. P. Tolerance to benzalkonium chloride and antimicrobial activity of *Butia odorata* Barb. Rodr. extract in *Salmonella* spp. isolates with biofilm forming ability. **Food Research International**, 2018. doi: [10.1016/j.foodres.2018.08.092](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.092).

HAUBERT, L.; MENDONÇA, M.; LOPES, G. V.; CARDOSO, M. R. D.; SILVA, W. P. *Listeria monocytogenes* isolates from food and food environment harbouring *tetM* and *ermB* resistance genes. **Letters in Applied Microbiology**, v.62, p. 23-29, 2016.

HERRERO-FRESNO, A.; OLSEN, J. E. *Salmonella* Typhimurium metabolism affects virulence in the host- A mini review. **Food Microbiology**, v. 71, p. 98-100, 2018.
HOMER, L. E.; LEACH, D. N.; LEA, D.; LEE, L. S.; HENRY, R. J.; BAVERSTOCK, P. R. Natural variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.28, p.367–382, 2000.

HOELZER, K.; SWITT, A. I. M.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Emerging needs and opportunities in foodborne disease detection and prevention: From tools to people. **Food Microbiology**, v.75, p.65-71, 2018.

HU, Q.; ZHO, M.; WEI, S. Progress on the antimicrobial activite of Clove oil and Eugenol in the food field. **Journal of Food Science**, v.83, n.6, p. 1476- 1482, 2018.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. T. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v.25, n.3, p.1-24, 2012.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL, F. X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526-530, 2014.

ISO 4730. Essential oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (tea tree oil). **International Standard**, Third edition, 2017.

JINGOU, J.; SHILEI, H.; DANJUN, W.; TENGFEI, W.; YI, X. Preparation, characterization of hydrophilic and hydrophobic drug in combine loaded chitosan/cyclodextrin nanoparticles and *in vitro* release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 1, p. 103–107, 2011.

JORAY, M. B.; ROLLÁN, M. R.; RUTZ, G. M.; PALACIOS, S. M.; CARPINELLA, M. C. Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina-Isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*. **Planta Medica**, v.77, p. 95-100, 2011.

KARACA, H. C.; NEWMAN, M. C. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Food Biocience**, v.11, p. 8-16, 2015.

KHAN, M.; KHAN, S. T.; KHAN, N. A.; MAHMOOD, A.; AL-KEDHAIRY, A. A; ALKHATHLAN, H. Z. The composition of the essential oil and aqueous distillate of *Origanum vulgare* L. growing in Saudi Arabia and evaluation of their antibacterial activity. **Arabian Journal of Chemistry**, v.11, n. 8, p. 1189-1200, 2018.

LEE, J.-H., LEE, J., SONG, K. BIN. Development of a chicken feet protein film containing essential oils. **Food Hydrocolloids**. v. 46, p. 208–215, 2015.

LI, W.; LI, H.; SHI, Q.; SUN, T.; XIE, X.; SONG, B.; HUANG, X. The dynamics and mechanism of the antimicrobial activity of tea tree oil against bacteria and fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, p. 8865-8875, 2016.

LIAKOS, I. L.; D'AUTILIA, F.; GARZONI, A.; BONFERONI, C.; SCARPENELLINI, A.; BRUNETTI, V.; CARZINO, R.; BIANCHINI, P.; POMPA, P. P.; ATHANASSIOU, A. Al natural cellulose acetate-lemongrass essential oil antimicrobial nanocapsules. **International Journal of Pharmacology**, v.30, n.1. p. 508-515, 2016.

LIU, Z.; MENG, R.; ZHAO, X.; SHI, C.; ZHANG, X.; GUO, N. Inhibition effect of tea tree oil in *Listeria monocytogenes* growth and exotoxin proteins listeriolysin O and p60

secretion. **Applied Microbiology**, v.63, p.450-457, 2016.

LIN, G.; CHEN, H.; ZHOU, X.; XU, H. Preparation of tea tree oil/poly (styrene-butyl methacrylate) microspheres with sustained release and anti-bacterial properties. **Materials**, v.11, n.710, p. 1-12, 2018.

LOPES, F. A.; SOARES, N. F. F.; LOPES, C. C. P.; SILVA, W. A. Desenvolvimento e caracterização de filmes de base celulósica incorporados com aldeído cinâmico. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.17, n.1, p. 33-40, 2014.

LOPES, G. V. **Caracterização de determinantes de resistência a antimicrobianos em isolados de *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* provenientes da cadeia produtiva de suínos no sul do Brasil**. 2014, 181f. Dissertação (Doutor em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande, 2014.

MADSEN, J. S.; BURMOLLE, M.; HANSEN, L. H.; SORENSEN, S. J. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. **Immunology and Medical Microbiology**, Copenhagen, v. 65, n.2, p. 183- 195, 2012.

MARCHI, D. M.; BAGGIO, N.; TEO, C. R. P. A.; BUSSATO, M. A. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995-2007. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.23, n.3, p.401-407, 2011.

MARINHO, G. A.; OLIVEIRA, G. S.; LIMA, J. L.; LOPES, W. M. A.; NUNES, G. A.; NUNES, M. G. A. Perfil Epidemiológico das Doenças Transmitidas por alimentos e seus fatores casuais na Região da Zona da Mata Sul de Pernambuco. **UNOPAR, Ciências Biológicas e Saúde**. v.17, n.4, p. 238-244, 2015.

MARTINS, F. C. O. L.; SENTANIN, M. A.; SOUZA, D. Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. **Food Chemistry**, v.272, p. 723-750, 2019.

MELO, A. A. M.; GERALDINE, R. M.; SILVEIRA, M. F. A.; LOPES, M. C.; SILVA, C.; FERNANDES, T. H.; OLIVEIRA, A. N. Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with Rosemary essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.1419-1427, 2012.

- MESSAGER, S.; HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Assessment of the antibacterial activity of tea tree oil using the European EN 1276 and EN 12054 standard suspension tests. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, p. 113–125, 2005.
- MIAO, L.; ZHU, L.; LIU, B.; DU, L.; JIA, X.; HAN, L.; JIN, Y. Tea tree oil nanoemulsions for inhalation therapies of bacterial and fungal pneumonia. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.141, p. 408-416, 2016.
- MIR, S. A.; DAR, B. N.; WANI, A. A.; SHAH, M. A. Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packing films. **Trends in Food and Science Technology**, v.80, p.141-154, 2018.
- MURRAY, PATRICK R.; ROSENTHAL, KEN S.; PFALLER, MICHEL A. Enterobacteriaceae In: **Microbiologia Médica**. 8° edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2017, p.251-264.
- OLIVA, A.; COSTANTINI, S.; ANGELIS, M.; GARZOLI, S.; BOZOVIC, M.; MASCELLINO, M. T.; VULLO, V.; RAGNO, R. High potency of *Melaleuca alternifolia* essential oil against multi-drug resistant gram-negative bacteria and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v.23, p.1-14, 2018.
- OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo. v.69, n.3, p. 277-284, 2010.
- OTONI, C. G.; ESPITIA, P. J. P.; BUSTILLOS, R. J. A.; McHUGH, T. H. Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. **Food Research International**, v. 83, p. 60-73, 2016.
- PAZYAR, N.; YAGHOUBI, R.; BAGHERANI, N.; KAZEROONI, A. A review of applications of tea tree oil in dermatology. **International Journal of Dermatology**, v.57, n.7, p.784-790, 2013.
- QUEDRHIRI, W.; BALOUIRI, M.; BOUHDID, S.; MOJA, S.; CHAHDI, F. Q.; TALEB, M.; GRECHE, H. Mixture desing of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: optimization of their antibacterial effect. **Industrial Crops and Products**, v.89, p.1-9, 2016.

RIBEIRO -SANTOS, R., ANDRADE, M., MELO, N. R. DE, & SANCHES- SILVA, A. Use of essential oils in active food packaging: recent advances and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v.61, p.132–140, 2017.

SARVATORI, C.; BARCHI, L.; GUZZO, F.; GARCARI, M. A comparative study of antibacterial and anti-inflammatoru effects of mouthrinse containing tea tree oil. **Oral & Imlantology**, n.1, p. 59-70, 2017.

SHAFIRI, A.; MOHAMMADZADEH, A.; SALEHI, Z.; MAHMOODI, P. Antibacterial, antibiofilm and antiquorum sensing effects of *Thymus daennsis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v.122, n.2, p.379-388, 2018.

SHEMESH, A.; MAYO, W. L. Australian tea tree oil: a natural antiseptic and fungicidal agent. **Australian Journal of Pharmacy**, v.72, p.802–803, 1991.

SHI C.; ZHAO, X.; YAN, H.; MENG, R.; ZHANG, Y.; LI, W.; LIU, ZONGHUI, L.; GUO, N. Effect of tea tree oil in *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production. **Food Control**, v.62, p.257-263, 2016.

SILVA, R. M. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de condimentos portugueses e óleos essenciais de plantas aromáticas frente a bactérias patogênicas e/ou deteriorantes de alimentos**. 2014. 124f. Dissertação (Mestre em Segurança Alimentar) – Faculdade de Farmácia – Universidade do Porto, Porto – Portugal, 2014.

SHI, C.; ZHANG, X.; GUO, N. The antimicrobial activities and action-mechanism of tea tree oil against food-borne bacteria in fresh cucumber juice. **Microbial Pathogenesis**, v.17, p.1-40, 2018.

RAMADAN, M. A.; SHAWKEY, A. E.; RABEH, M. A.; ABDELLATIF, A. Q. Expression of P53, BAX and BCL-2 in human malignant melanoma and squamous cell carcinoma ater tea tree oil treatment *in vitro*. **Cytotechnology**, v.1, p. 1-13, 2019.

RIPOLLES-AVILA, C.; HASCOET, A. S.; GUERRERO-NAVARO, A. E.; RODRIGUEZ-JEREZ, Establishment of incubation conditions to optimize the *in vitro* formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact sufaces, **Food control**, v.92, p.240-248, 2018.

RUBAB, M.; SHANBAZ, H. M.; OLAIMAT, A. N.; OH, D. H. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 105, p. 49-57, 2018.

TANNER, J. R.; KINGSLEY, R. A. Evolution of *Salmonella* within hosts. **Trends in Microbiology**, v.26, n. 12, p. 986-998, 2018.

THOMSEN, P. S.; JENSEN, T. M.; HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; MOLGAARD, P.; RILEY, T. V. Survey of the antimicrobial activity of commercially available Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil products in vitro. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.17, n. 9, p.835-841, 2011.

TURCHI, B.; MANCINI, S.; PISTELLI, L.; NAJAR, B.; CERRI, D.; FRATINI, F. Sub-inhibitory stress with essential oil affects enterotoxins production and essential oil susceptibility in *Staphylococcus aureus*. **Natural Products Research**, v.32, n.6, p. 682-688, 2018.

VASCONCELOS, N. G.; CRODA, J.; SIMIONATTO, S. Antibacterial mechanisms of cinnamom and its constituents: A review. **Microbial Pathogenesis**. v.120, p. 198-203, 2018.

VASILE, C.; SIVERTSVIK, M.; MITELUT, A. C.; BREBU, M. A.; STOLERU, E.; ROSNES, J. T.; TÂNASE, E. E.; KHAN, W.; PAMFIL, D.; CORNEA, C. P.; IRIMIA, A.; POPA, M. E. Comparative analysis of the composition and activity property evaluation of certain essential oils to assess their potential applications in active food packaging. **Materials**, v.10, n.45, p. 2-24, 2017.

WEN, P.; ZHU, D.H.; WU, H.; ZONG, M. H.; JING, Y.R.; HAN, S Y. Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofiber film for active food packing. **Food Control**, v. 59, p. 366-376, 2016.

WU, C.S. Mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of cross-linked cellulose acetate reinforced polyester composites. **Carbohydrate Polymers**, v.105, p. 41–48, 2014.

YONGHUA, L.; SHAO, X.; XU, J.; WEI, Y.; XU, F.; WANG, H. Tea tree oil exhibits antifungal activity against *Botrytis cinerea* by affecting mitochondria. **Food Chemistry**, v.234, n.1, p. 62-67, 2017.

1
2
3 ZANDI-SOHANI, N.; RAMEZANI, L. Evaluation of five essential oils as botanical
4 acaricides against the strawberry spider mite *Tetranychus turkestani* Ugarov and
5 Nikolskii. **International Biodeterioration e Biodegradation.**, v.98, p.101-106, 2017.

6
7
8 ZHANG, X.; GUO, Y.; GUO, L.; JIANG, H.; JI, Q. *In vitro* evaluation of antioxidant and
9 antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Biomed Research**
10 **International**, v.6, p.1-8, 2018.

11
12 ZHAO, X.; LIU, Z.; LIU, Z.; MENG, R.; SHI, C.; CHEN, C.; BRU, X.; GUO, N. Phenotype
13 and RNA-seq-based transcriptome profiling os *Staphylococcus aureus* biofilm
14 responde to tea tree oil. **Microbiology Pathogens**, v.123, p. 304-313, 2018.

Apêndices

Apêndice A

Tabela 3: Ação antibacteriana do óleo essencial de *M. alternifolia* (Madon & Betcher) Cheel frente a isolados de *Salmonella* spp.

Isolado	Halos de inibição em mm ± DP (n=3)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
S12	16,6 ± 0,3	7,4	30,4
S14	19,3 ± 0,5	14,9	30,4
S23	17 ± 0,5	7,4	14,9
S26	28 ± 0,5	7,4	30,4

DP: desvio padrão; CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima.

Anexos

Anexo A

Caracterização fenotípica, molecular e sorotipagem desenvolvida por Haubert et al. (2018), dos isolados de *Salmonella* spp. avaliados no presente estudo (Tabela 5).

Tabela 4: Características de *Salmonella* spp. isolados de alimentos e ambientes alimentares no sul do Brasil

Isolado	Alimento de origem	Sorotipo	Fenótipo de resistência	Genótipo de resistência
S12 S14	Linguiça suína Linguiça calabresa frescal	Derby Give	STR, SUL, TET, NAL Susceptível	<i>aadA</i> , <i>int1</i> , <i>sul1</i> , <i>tetA</i> , -
S23	Bacon	Typhimurium	AMP, CHL, GEN, NAL, STR, SUL, SUT, TET, TRI	<i>bla</i> _{TEM} , <i>aadA</i> , <i>int1</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul1</i> , <i>tetA</i> , <i>catA1</i> , <i>floR</i> , <i>qacEΔ1</i>
S26	Linguiça suína com queijo parmesão	Derby	Susceptível	-

STR: estreptomicina; SUL: sulfonamida; TET: tetraciclina; NAL: Ácido Nalidíxico; AMP: ampicilina; CHL: Cloranfenicol; GEN: gentamicina; SUT: trimetoprim/sulfametaxolona; TRI: trimetopim; gene de resistência aos β-lactamâmicos: *bla*_{TEM}; genes de resistência aos aminoglicosídeos: *aadA*, *strA* e *strB*; gene da integrase: *int1*; gene de inibidores de folato: *sul1*; gene de resistência a tetraciclinas: *tetA*; genes de resistência a compostos fenólicos: *catA1* e *floR*; gene de resistência a quaternários de amônia: *qacEΔ1*.

Anexo B

Caracterização química do óleo essencial de *M. alternifolia* (Madon & Bettle) Cheel obtida por Cromatografia Gasosa, disponibilizada pela empresa Lazlo Aromaterapia e Aromatologia LTDA.

Tabela 5: Composição química do óleo essencia de *Melaleuca alternifolia* (Madon & Bettle Cheel)

Composto	Quantidade (%)
Terpinen-4-ol	37
γ -terpineno	20
α -terpineno	16
1,8 cineol	1
Terpineol	5
Limoneno	4
Pineno	3
Terpinoleno	5
Outros	9