



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA E SUA APLICAÇÃO BIOFILME DE COLÁGENO

F. O. Giacomeli^{1*}, S.R. Thiel¹, A.M. Fontoura¹, M.S.R. Oliveira¹, R.C.P. Dornelles¹

1 - Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, – CEP: 97105-900 – Santa Maria – RS – Brasil, Telefone: (55) 3220-8000 – *e-mail: (felipegiacomelli95@gmail.com)

RESUMO – O aumento na busca de conservantes de alimentos de origem natural foi uma das principais motivações para este estudo que teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta rosa (OEPR) puro e quando aplicado a um biofilme elaborado a partir de fibra de colágeno. A metodologia utilizada foi o teste de disco difusão, realizado em bactérias relacionadas com o controle de qualidade de alimentos. O OEPR apresentou melhor inibição no crescimento nas bactérias Gram positivas, quando comparado as Gram negativas. No estudo de aplicação só houve diferença estatística quando comparada a adição ou não de OEPR na elaboração de filmes. A diferença de concentração de óleo não apresentou diferenças significativas

ABSTRACT – The increase in the search for natural food preservatives was one of the main motivations for this study, which aimed to assess the antimicrobial activity of pure pink pepper essential oil (OEPR) and when applied to a biofilm made from collagen fiber. The methodology used was the disk diffusion test, performed on bacteria related to food quality control. The OEPR showed better growth inhibition in Gram positive bacteria, when compared to Gram negative bacteria. In the application study, there was only statistical difference when comparing the addition or not of OEPR in the elaboration of films. The difference in oil concentration showed no significant differences.

PALAVRAS-CHAVE: microbiologia; biofilme; qualidade; segurança alimentar; aditivo natural.

KEYWORDS: microbiology; biofilm; food quality; food security; natural additive.

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos são vetores importantes de muitos microrganismos que fazem mal a saúde. *Staphylococcus sp.* e *Escherichia coli* representam 7% e 5% das infecções bacterianas de origem alimentar, respectivamente (Dussault et al., 2014). A deterioração dos alimentos e a formação de biofilmes causados por bactérias patogênicas são problemas sérios na indústria de alimentos, sendo necessário o uso de substâncias antibacterianas que possam inibir e eliminar efetivamente estes microrganismos (Cui et al., 2020) para melhorar a vida de prateleira dos produtos. Os consumidores têm rejeitados produtos com uso excessivo de conservantes sintéticos ou que fujam muito do estado natural (Calo et al., 2015). Nesse contexto, a busca de novas substâncias com atividade antimicrobiana, principalmente naturais, aparece como uma alternativa potencial (Dussault et al., 2014).

Os óleos essenciais (OEs) são líquidos aromáticos e voláteis, que contêm uma mistura de compostos orgânicos, que são extraídos de matéria vegetal. Geralmente os OEs possuem um sabor e aroma forte, dependente da fonte e extração, por este fato são compostos amplamente utilizados na indústria de alimentos. Os OEs são compostos com atividades antimicrobianas (Cui et al., 2019; Cui et al., 2020; Dannenberg et al., 2017) e antioxidantes (Kacaniova et al. 2017; Tohidi et al., 2017) comprovadas por vários estudos, e devido este fato seu estudo para utilização como aditivo alimentar tem aumentado muitos nos últimos anos (Kacaniova et al., 2017).

A pimenta rosa é muito usada, por certos grupos folclóricos, para combater infecções e apenas recentemente surgiram pesquisas científicas para provar a atividade biológica do seu OE (Dannenberg et al., 2019). Devido estes poucos estudos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antibacteriana do óleo essencial de pimenta rosa (OEPR) puro e aplicado em um biofilme de fibra de colágeno em testes microbiológicos de disco difusão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

A amostra de fibra de colágeno bovino foi fornecida pela NovaProm Food Ingredients Ltda. (Lins, SP, Brasil). A pimenta rosa foi adquirida de um o produtor na região de Turuçu – RS.

2.2 Extração do óleo essencial

O óleo essencial de pimenta rosa foi extraído através do método de arraste a vapor, utilizando o equipamento Clevenger. Para a extração foram utilizados 65 g de pimenta rosa moída previamente em liquidificador (Walita Liqfaz®) e 600 mL de água destilada.

2.3 Produção dos filmes

A solução dos filmes foi preparada com 5% (p/v) de fibra de colágeno em água destilada e glicerol a 25% (p/p) (em relação à massa de colágeno). As soluções filmogênicas foram aquecidas em banho maria à 70°C por 20 min. Os filmes foram adicionados de 1% (v/v) de óleo essencial e Tween 80 (1 g / 100 mL) de solução. As soluções foram dispostas em placas de vidro (30 x 21cm) e secas em estufa com circulação de ar a 25-30 ° C por 24h. Após a secagem, os filmes foram acondicionados em dessecadores a temperatura de 16°C. Foram preparados três tratamentos com diferentes formulações, sendo: T1(0% de OE), T2(1% OE) e T3(2% OE).

2.4 Cepas de microrganismos

Foram utilizadas amostras de bactérias da American Type Culture Collection (ATCC) recomendadas como controle de qualidade dos testes de susceptibilidade: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, CCT 4295, Lote 61.16), *Escherichia coli* (ATCC 8739, CCT 1371, Lote 44.16B).

2.5 Preparo dos Inóculos

As cepas das bactérias estavam armazenadas, sob refrigeração, em solução de glicerol. Para a ativação as bactérias foram dispostas, através de alçadas, em ágar BHI (Brain Heart Infusion, Kasvi®) e incubadas em estufa microbiológica a 37°C por aproximadamente 24 horas.

2.6 Teste de disco difusão

Inicialmente determinou-se a atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta rosa pela técnica de disco-difusão (CLSI, 2015a). As culturas bacterianas foram suspensas em solução salina (0,85%) para ajustar a concentração de 108 UFC/mL (0,5 McFarland), verificada com o auxílio do espectrofotômetro. Foi adicionado 0,1 mL de cultura em placas com ágar BHI (Kasvi®) e espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski. Para o teste do óleo puro cada placa recebeu um disco estéril com adição posterior de 10 µL do óleo essencial. Para o segundo teste cada placa recebeu um disco de biofilme de fibra de colágeno com diferentes concentrações de óleo essencial (0, 1 e 2%) dispostos nas placas de ágar BHI com a cultura bacteriana. Ambos tratamentos foram

incubados a 37 ° C durante 24 horas. Após o período de incubação analisou-se a existência de halos de inibição que foram medidos com paquímetro.

2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$), foi realizada a comparação de médias pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa Statistic 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores dos tamanhos das zonas de inibição, medidas em milímetros, referentes aos testes de disco difusão são apresentados nas Tabelas 1 e 2. A Tabela 1 apresenta a inibição do óleo puro e a Tabela 2 os resultados da inibição do óleo aplicado no biofilme de fibra de colágeno.

Tabela 1: Resultados do teste de disco difusão de óleo essencial de pimenta

Bactéria	Zona de inibição(mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,14 ± 1,44 ^a
<i>Escherichia coli</i>	1,75 ± 0,76 ^b

Letras minúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente ($p < 0,05$)

Pode observar-se uma maior zona de inibição do óleo essencial de pimenta rosa nas culturas de *S. aureus*, comprovado pela diferença estatística significativa entre as duas bactérias. Isto está de acordo com os resultados apresentados por Dannenberg et al. (2019) que encontraram em seus estudos maiores zonas de inibição para bactérias Gram positivas quando comparadas a Gram negativas. Este fato é evidenciado em grande parte dos estudos com OE e pode ser justificado devido a diferença das estruturas das bactérias. As Gram positivas apresentam camada simples, enquanto as negativas possuem uma membrana extra com camada de lipopolissacarídeos (Nazzaro et al., 2013). Esta camada extra das Gram negativas dificulta a ação dos OE (Silva et al., 2009; Rai et al., 2017).

Tabela 2: Resultados do teste de disco difusão do OE aplicado em biofilme

	Tratamento	Zona de inibição (mm)
<i>Staphylococcus Aureus</i>	T1	ND ^b
	T2	1,05 ± 0,07 ^a
	T3	0,90 ± 0,14 ^a

Letras minúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente ($p < 0,05$). T1: filme controle. T2: filme com 1% de OE. T3: filme com 2% de OE. ND: não detectado

Como é visualizado na Tabela 2, a adição de OE foi benéfica para a inibição de crescimento bacteriano. O filme controle (T1) não apresentou halo de inibição de crescimento de *Staphylococcus aureus*. A incorporação de 1% (T2) e 2% (T3) de OE nos filmes demonstrou atividade antibacteriana, mas a variação da concentração não apresentou diferença estatisticamente significativa. Este fato está em desacordo com estudos de Dannenberg et al, 2017, Cui et al., 2020, e Devi et al., 2017, onde é apresentado que a maior concentração de óleo essencial apresenta maior nível de inibição de crescimento.



4 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais possuem propriedades biológicas de grande valor para as indústrias, principalmente em relação a atividade antimicrobiana. Os resultados do presente estudo sugerem que o OE de pimenta rosa é uma fonte potencial de conservação alimentar natural para ser usado pela indústria de alimentos, buscando assim atender as demandas dos consumidores por produtos mais “verdes”. Necessita-se mais estudos, com diferentes concentrações de OE para definir o melhor nível de adição nos produtos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C.A.; RICKE, S.C. Essential oils as antimicrobials in food systems - a review. **Food Control**, v. 54, p.111–119, 2015.
- CLSI a. M02–A12: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard—Twelfth Edition. **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)**, 35(1), 2015.
- CUI, H.; ZHANG, C.; LI, C.; LIN, L. Inhibition mechanism of cardamom essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. **LWT**, v. 122, p. 109057, 2020.
- CUI, H.; ZHANG, C.; LI, C.; LIN, L. Antibacterial mechanism of oregano essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111498, 2019.
- DANNENBERG, G.S.; FUNCK, G.D.; CRUXEN, C.E.S.; MARQUE, 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. S.; FUNK, G. D.; DA SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M. Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control**, v. 95, p. 115-120, 2019.
- DEVI, V. D.; KALPANA, G.; SARANRAJ, P. Antibacterial activity of Essential oils against human pathogenic bacteria. **Advances in Biological Research**, v. 11, n. 6, p. 357-364, 2017.
- DUSSAULT, D.; VU, K.D.; LACROIX, M. In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 514-520, 2014.
- KACANIOVA, M.; TERENTJEVA, M.; VUKOVIC, N.; PUCHALSKI, C.; ROYCHOUDHURY, S.; KUNOVA, S.; KLUGA, A.; TOKAR, M.; KLUZ, M.; IVANISOVA, E. The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 8, p. 1108-1116, 2017.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.
- RAI, M.; PARALIKAR, P.; JOGEE, P.; AGARKAR, G.; INGLE, A.P.; DERITA, M. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1-2, p. 67-78, 2017.
- SILVA, M.T.N.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; CUNHA, M.L.R.S.; JUNIOR, A.F. Antibacterial activity of plant essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains isolated from human specimens. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 257-262, 2009.
- TOHIDI, B.; RAHIMMALEK, M.; ARZANI, A. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. **Food Chemistry**, v. 220, p. 153-161, 2017.