

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA BRASILEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

GUILHERME DA SILVA DANNENBERG¹; GRACIELA DAIANA FUNCK²; JÚLIANA DE LIMA MARQUES³; ANA RITA CARBONI RITTER⁴; WLADMIR PADILHA DA SILVA⁵; ÂNGELA MARIA FIORENTINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas - gui.dannenberg@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - gracifunck@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas - ju_marques@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - arcarboni@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas - wladimir.padilha2011@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O controle do desenvolvimento microbiano em alimentos, tradicionalmente envolve a aplicação de conservantes sintéticos, (AL-REZA et al., 2010 e BAJPAI et al., 2012), no entanto alguns problemas relevantes tem sido relatados pela literatura científica, como a capacidade apresentada por algumas bactérias de adquirir resistência a estes antimicrobianos convencionais, quando submetidas a doses subletais destes (HAWSER et al., 2011), e ainda a existência de riscos toxicológicos e carcinogênicos ligados à ingestão de concentrações elevadas e/ou frequentes destes compostos sintéticos (MPOUNTOUKAS et al., 2008; GUILLARD et al., 2009).

Estes fatores demonstram a necessidade de encontrar novas substâncias com atividade antimicrobiana, que possam substituir ou reduzir as concentrações dos conservantes convencionais (ROBY et al., 2013).

Como alternativa aos compostos sintéticos vem crescendo as pesquisas com extratos naturais, que apresentam propriedades similares, porém com moléculas ativas diferentes, e atendem a crescente demanda mercadológica por produtos naturais, com diminuição e/ou redução de aditivos sintéticos (ALZOREKY & NAKAHARA, 2003), impulsionada, atualmente, pela contestação aos conservantes sintéticos.

Dentre os extratos naturais encontram-se os óleos essenciais, substâncias provenientes do metabolismo secundário de vegetais, sintetizadas com o propósito de conferir resistência aos vegetais condições adversas como variações climáticas, ataques de insetos e micro-organismos. Para tal, são constituídos por um grande número de moléculas biologicamente ativas (KAVOOSI et al., 2013), tais características conferem a estas substâncias propriedades diversas dentre as quais destaca-se a atividade antimicrobiana (SALGUEIRO, 2010).

Mesmo possuindo características interessantes os óleos essenciais são pouco aplicados industrialmente como bioconservantes, sendo um dos fatores que limita sua aplicação o baixo rendimento obtido na sua extração, no entanto uma boa disponibilidade da matéria prima pode contrapor e amenizar tal empecilho.

A pimenta brasileira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), também conhecida como pimenta rosa ou falsa aroeira (AGRA, et al., 2008), é um vegetal que se encontra amplamente difundido na América do Sul, em especial no litoral brasileiro, apresentando boa disponibilidade e facilidade de cultivo para a obtenção de óleo essencial.

Este trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana do OE de pimenta brasileira frente a bactérias patogênicas de relevância em alimentos, visando inferir seu potencial de aplicação tecnológica como antimicrobiano em alimentos.

2. METODOLOGIA

Os óleos essenciais utilizados neste estudo foram extraídos de frutos verdes (OEV) e maduros (OEM) de pimenta brasileira pelo método de hidrodestilação em clevenger (DOURADO, 2012), sendo os frutos congelados em nitrogênio líquido e posteriormente moídos em moinho de bola para aumentar a superfície de contato e assim o rendimento da subsequente extração.

Foram testadas quatro bactérias patogênicas de relevância em alimentos, presentes na coleção de cepas do laboratório de microbiologia de alimentos (DCTA/UFPEL). Duas Gram positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778), e duas Gram negativas *Shigella dysenteriae* (ATCC 13313) e *Escherichia coli* (ATCC 8739).

A atividade antimicrobiana dos OE sobre os patógenos em questão foi avaliada pela técnica de disco difusão (CLSI, 2012a), inoculando cada patógeno ($1,5 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹) em placas com ágar Brain Heart Infusion (BHI-Oxoid®), e dispendo ao centro de cada placa discos de papel estéreis adicionados de 10µL dos extratos a serem testados. Após 24 horas encubados em BOD a 36°C foi visualmente verificada a existência de halo de inibição, e quando presentes quantificados com paquímetro digital.

As bactérias que apresentaram sensibilidade aos compostos foram submetidas a análises de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) pela metodologia de microdiluição em placa (CLSI, 2012b), diluindo os óleos essenciais em caldo BHI acrescido de 3% de *tween* 80 (VETEC®) para promover a emulsão do sistema, obtendo concentrações entre 218 mg.mL⁻¹ e 0,10 mg.mL⁻¹.

O experimento foi feito com triplicatas técnicas de cada análise e uma repetição biológica, e os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$), com o auxílio do *softwar* STATISTICA versão 6.1 (StatSoft, França), adotando um intervalo de confiança de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sensibilidade dos patógenos a ambos os OE está listada na tabela 1 e ocorreu na seguinte ordem: *B. cereus*, *S. aureus*, *S. dysenteriae* e *E. coli*, sendo que este último não foi inibido e o primeiro foi o mais sensível.

As duas bactérias Gram negativas testadas apresentaram menor sensibilidade aos compostos do que as Gram positivas, sendo que *E. coli* não foi inibida e *S. dysenteriae* foi inibida com as maiores concentrações dos OE. Este resultado confirma a premissa de que micro-organismos Gram negativos são mais resistentes a ação de antimicrobianos em função de uma parede celular mais espessa (HYLDGAARD, M. et al., 2012).

No entanto, pode-se constatar ainda, que o mecanismo de ação destes extratos não se restringe apenas ação na parede celular, visto que uma das Gram negativas foi inibida, demonstrando um maior espectro de ação deste antimicrobiano com ação sobre os dois grupos de bactérias, possivelmente em virtude da grande

quantidade de moléculas ativas com mecanismos de ação distintos que frequentemente são encontradas em OE (DJENANE et al., 2011)

Com relação ao estágio de maturação, o OEM foi mais eficaz, mostrando que o processo de maturação altera a concentração dos compostos ativos e/ou produz novas moléculas bioativas como já relatado em outros trabalhos (TELICI, et. al., 2009).

Tabela 1 – Resultados dos testes de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de pimenta brasileira verde (OEV) e madura (OEM) frente a bactérias patogênicas.

Bactéria	Disco difusão (mm)		CIM (mg.mL ⁻¹)		CBM (mg.mL ⁻¹)	
	OEV	OEM	OEV	OEM	OEV	OEM
<i>S. aureus</i>	41,23 ± 0,09 a	42,70 ± 0,19 b	6,8 a	1,7 b	13,6 a	1,7 b
<i>B. cereus</i>	31,39 ± 0,77 a	39,97 ± 0,81 b	0,9 a	0,9 b	0,9 a	0,9 b
<i>S. dysenteriae</i>	35,44 ± 0,76 a	38,80 ± 0,03 b	27,2 a	6,8 b	27,2 a	6,8 b
<i>E. coli</i>	00,00 ± 0,00 a	00,00 ± 0,00 a	-	-	-	-

Letras diferentes na linha, em um mesmo teste, apresentam diferença significativa (p<005) entre os resultados.

4. CONCLUSÕES

OEs de pimenta brasileira em ambos os estádios de maturação possuem atividade antimicrobiana sobre bactérias patogênicas Gram positivas e Gram negativas, no entanto, o OEM mostrou-se mais eficaz promovendo o mesmo efeito em concentrações menores. Tais resultados permitem inicialmente qualificar estes extratos como possíveis substituintes aos conservantes sintéticos sem perda no efeito antimicrobiano, apontando uma alternativa importante para a indústria de alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; Survey of medicinal plants use in the region northeast of Brazil. *Ver. Bras. Farmacogn*, n. 18, p. 472-508, 2008.

AL-REZA, S. M.; RAHMAN, A.; LEE, J. H.; KANG, S. C. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujube* in inhibiting food-borne pathogens. *Food Chemistry*, n. 119, p. 981-986, 2010.

ALZOREKY, N. S.; NAKAHARA, K. Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, n. 80, p. 223-230, 2003.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. *Food Research International*, n. 45, p. 722-734, 2012.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved standard - Eleventh Edition*. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2012a.

CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012b.

DOURADO, M. T., **Óleos essenciais e oleorresina da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): propriedades químicas e biológicas**. Tese de Doutorado (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

DJENANE, D.; YANGÜELA, J.; MONTAÑÉS, L.; DJERBAL, M.; ANDRONCALÉS, P. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: efficacy and synergistic potential in minced beef. **Food Control**. v.22, p.1046–1053, 2011.

GUILLARD, V.; ISSOUPOV, V.; REDL, A.; GONTARD, N.; Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficial coating. **Innovative food science and emerging technologies**. v.10, p.108-115, 2009.

HAWSER, S. P.; BOUCHILLON, S. K.; HOBAN, D. J.; DOWZICKY, M.; BABINCHAK, T. Rising incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin and susceptibility to antibiotics: a global analysis 2004–2009. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 219–224, 2011.

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

KAVOOSI, G.; ROWSHAN, V. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time. **Food Chemistry**, n. 138, p. 2180-2187, 2013.

MPOUNTOUKAS, P.; VANTARAKIS, A.; SIVRIDIS, E.; LIALIARIS, T. Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. **Food Chemistry Toxicol**, v. 46, p. 2390–2393, 2008.

ROBY, M. H. H.; SARHAN, M. A.; SELIM, K. A.; KHALEL, K. L. Antioxidant and Antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). **Industrial Crops and Products**, n. 44, p. 437–445, 2013.

SALGUEIRO, L.; MARTINS, A. P.; CORREIA, H. Raw materials: the importance of quality and safety. A review. **Flavour Fragrance Journal**, n. 25, p. 253-271, 2010.

TELICI, I.; DEMIRTAS, I.; SAHIN, A. Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 1, p. 126–130, jul. 2009.