

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CÁPSULAS DE MUCILAGEM DE CHIA COM ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO (*Thymus vulgaris*) FRENTE A *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*.

ANDRESSA SALIES SOUZA¹; DIEGO ARAUJO DA COSTA²; CAROLINE DELLINGHAUSEN BORGES²; MARJANA RADÜNZ²; TATIANA KUKA VALENTE GANDRA²; ELIEZER ÁVILA GANDRA³

¹ Universidade Federal de Pelotas – dedesalies@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – diegoacostalpel@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – caroldellin@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – marjanaradunz@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – tkvgandra@yahoo.com.br

³ Universidade Federal de Pelotas – gandraea@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de conservantes na indústria de alimentos está relacionada a produção de alimentos seguros aos consumidores, evitando a ação de agentes biológicos como fungos e bactérias. Entre as classes de conservantes, um dos mais utilizados são os sais de cura a base de nitratos e nitritos, principalmente em produtos cárneos. Entretanto, múltiplos estudos indicam reações adversas a esses aditivos, quer seja aguda ou crônica, como reações tóxicas no metabolismo que desencadeiam alergias e potencial carcinogênico, que pode ser observado a longo prazo (SILVEIRA, 2019). Existe uma crescente preocupação devido ao excesso desses conservantes na dieta da população em geral, devido a formação endógena de composto n-nitrosos como a N-nitrosodimetilamina e monometilnitrosamina, que apresentam efeitos mutagênicos, carcinógenos e teratogênicos (MARTINS; MÍDIO, 2000)

O tomilho conhecido cientificamente como *Thymus vulgaris* L. é uma planta medicinal, aromática e condimentar, pertencente à família Lamiaceae, originária da Europa e cultivada no sul e sudeste do Brasil. Dentre os gêneros cultivados dessa família destacam-se várias espécies usadas como condimentos, tais como: sálvia (*Salvia officinalis*), manjericão (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum vulgare* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), entre outras. Caracterizam-se por um odor forte e penetrante e, por vezes, um sabor muito pronunciado balsâmico e picante. O óleo essencial de tomilho possui atividades antimicrobianas (contra bactérias e fungos), carminativa e expectorante, isso se deve a diversidade de componentes químicos presentes na sua composição, principalmente o carvacrol e o timol. Entretanto, os mesmos são substâncias instáveis à oxidação, a luz e além disso, são altamente voláteis liberando um forte odor e sabor, fazendo com que seu uso fique restrito e dificulte a aplicação nos alimentos (ROCHA, 2013).

Como solução para esses problemas, pode-se utilizar uma técnica denominada de encapsulação. Esse processo se dá quando uma substância ativa é acondicionada dentro de um invólucro ou revestimento microscópico para proteção e/ou posterior liberação gradual. A escolha desse invólucro é considerada uma etapa crítica, uma vez que ele irá influenciar na estabilidade da emulsão que será formada com a presença do mesmo antes da secagem, na capacidade de reter as substâncias voláteis durante a secagem e na vida útil após a secagem (JAFARI et al., 2008).

A mucilagem de chia vem sendo estudada como um promissor material de parede na encapsulação de compostos ativos diversos, graças a sua estrutura que

determina a sua excelente capacidade de reter a água e óleo, além da boa propriedade emulsificante e estabilizante (TIMILSENA *et al.*, 2015).

Desta forma, torna-se interessante o desenvolvimento e aplicação de cápsulas de mucilagem de chia com óleo essencial de tomilho, tendo como objetivo neste trabalho a avaliação destas frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

2. METODOLOGIA

Foi utilizado o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), obtido comercialmente da empresa Ferquima, Indústria e Comércio de Óleos Essenciais, acondicionado em frasco âmbar, lacrado, com volume de total de 100 mL. A semente de chia foi obtida no comércio local da cidade de Pelotas - RS.

A extração da mucilagem da chia foi realizada pelo método proposto por Dick *et al.* (2015) com modificações.

A encapsulação do óleo essencial de tomilho foi realizada seguindo a metodologia de Siow e Ong (2013), com algumas modificações.

As bactérias utilizadas no experimento foram mantidas sob congelamento em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v:v). Para realizar a reativação, uma alçada dessas bactérias foi transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB) e incubadas em estufa durante 24 h a 37 °C. Após uma alçada desse crescimento foi estriada em placas de Petri com meios seletivos, sendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli* e ágar Baird-Paker para *S. aureus*, e incubadas por 24 h a 37°C, para o isolamento das colônias. Do crescimento bacteriano nas placas de Petri, foi extraída uma alçada e re-suspendida em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

O teste de dispersão em ágar foi realizado de acordo com protocolo proposto pelo Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (CLSI, 2005), a substância antimicrobiana foi adicionada ao ágar Muller-Hinton antes que este seja colocados nas placas de petri, a concentração final foi de 1 µg de substância antimicrobiana por mL de ágar. Após isso verteu-se o ágar nas placas de petri e deixou-se solidificar. Após a água salina contendo o inóculo de *S. aureus* e *E. coli* foi semeada separadamente com auxílio de um *swab* estéril na superfície das placas com ágar Muller-Hinton. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Logo após este período foi efetuada a contagem de colônias, sendo os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL⁻¹).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *E. coli* das cápsulas de mucilagem de chia com óleo essencial de tomilho estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana *in vitro* de cápsulas de mucilagem de chia com óleo essencial de tomilho frente a *S. aureus* e *E. coli*.

Concentração (%)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
3,5	$>1,5 \times 10^8$ UFC mL ⁻¹	$>1,5 \times 10^8$ UFC mL ⁻¹
7,5	$>1,5 \times 10^8$ UFC mL ⁻¹	$>1,5 \times 10^8$ UFC mL ⁻¹
10	0 UFC mL ⁻¹	$>1,5 \times 10^8$ UFC mL ⁻¹

As cápsulas contendo 3,5 e 7,5% do óleo essencial de tomilho não impediram o crescimento microbiano tanto de *S. aureus* como de *E. coli* apresentando uma contagem superior a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Quando a concentração de óleo foi aumentada para 10% não houve crescimento de *S. aureus*, entretanto o mesmo efeito inibitório não foi observado para *E. coli*. Isso pode ser explicado pelo fato relatado em estudos anteriores que as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos óleos essenciais do que as bactérias Gram-negativas. Resultado similar foi obtido por Rosa (2016), onde foram analisadas nanopartículas carregadas com os óleos essenciais na presença das bactérias *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Gram-positivas) apresentando uma maior inibição quando comparado com as demais Gram-negativas (*E. coli* e *Salmonella enterica*).

Guarda (2011) e seus colaboradores analisaram a atividade antimicrobiana de filmes plásticos flexíveis adicionados de antimicrobianos como timol e carvacrol microencapsulados frente aos microrganismos *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva) e *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa), sendo mais efetiva a inibição contra as bactérias Gram-positivas.

Os microrganismos Gram-negativos apresentam na sua membrana, uma camada externa lipopolissacarídica (LPS) que limita a difusão dos compostos hidrofóbicos. Estudos mostram que os óleos essenciais possuem a capacidade de desintegrar essa membrana externa, liberando o LPS, e por sua vez aumentando a permeabilidade da adenosina trifosfato (ATP), na membrana citoplasmática, e modificando a permeabilidade passiva da célula, porém isto não foi verificado neste estudo. Uma provável explicação para essa diferença de resultados pode estar na concentração de óleo essencial utilizada. Em um estudo utilizando diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho adicionado em um filme de amido e quitosana foi observado que, conforme foi aumentado a quantidade de óleo essencial de tomilho ao filme, maior foi a atividade inibitória em cepas de *E. coli*. A concentração de 50% foi a mais eficaz em comparação com as de menor porcentagem, as quais também tiveram ação contra as cepas patogênicas (CAVALCANTE, 2018).

Dessa forma, é necessária provavelmente uma maior concentração de agente antimicrobiano para obter contra *E. coli* o mesmo efeito obtido nas bactérias Gram-positivas (SMITH-PALMER et al., 1997; GUARDA et al., 2011).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a melhor concentração de óleo essencial de tomilho nas cápsulas de mucilagem de chia foi a de 10%, onde não obteve-se nenhum crescimento microbiano para *S. aureus*. Entretanto, seria necessário provavelmente mais estudos para estimar uma maior concentração de óleo para

ter o mesmo resultado satisfatório para microrganismos Gram-negativos como a *E. coli*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAVALCANTE, P. **Desenvolvimento e caracterização de filme ativo antimicrobiano de amido de araruta/quitosana incorporado com óleo essencial de *Thymus Vulgaris***. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco.
- CLSI – Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**, v. 5, n.1, 2005. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modupdf. Acesso em: 18 ago. 2022.
- DICK, M.; COSTA, T. M. H.; GOMAA, A.; SUBIRADE, M.; RIOS, A. O.; FLÔRES S. H. Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 198–205, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.040>.
- GUARDA, A.; RUBILAR, J. F.; MILTZ, J.; GALOTTO, M. J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 144–150, 2011.
- JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; BHANDARI, B.; HE, Y. Nano particle encapsulation of fish oil by spray drying. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p.172– 183, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.11.002>.
- ROCHA, B. **Extração e caracterização do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência em Engenharia Química) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- ROSA, C. **Síntese e caracterização de nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais para aplicação em filmes nanocompósitos de poli (óxido etileno)**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
- SILVEIRA, Mônica Adriana. **Nitrosaminas e câncer: efeitos biológicos da carne curada**. 2019. 29f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Farmácia Bioquímica) – Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2019.
- MARTINS, D. I.; MIDIO, A. F. **Toxicologia dos alimentos**. 2ed. São Paulo: Varela, 2000. 295p.
- TIMILSENA, Y.; ADHIKARI, R.; KASAPIS, S.; ADHIKARI, B. Molecular and functional characteristics of purified gum from Australian chia seeds. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p.128-136, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.035>.
- SLOW, L.; ONG, C. Effect of pH on garlic oil encapsulation by complex coacervation. **Journal of Food Process Technology**, v. 4, n. 1, p. 199, 2013.
- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118– 122, 1997.