

PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS DE *CINNAMOMUN ZEYLANICUM* E *MENTHA PIPPERITA* SOBRE MICROORGANISMOS DETERIORANTES ALIMENTARES

VOLCÃO, Lisiane Martins¹; MARQUES, Juliana de Lima¹; RIBEIRO, Gladis²

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

1 INTRODUÇÃO

O crescimento microbiano e as reações de oxidação que ocorrem nos alimentos são as duas principais causas de deterioração e perda de frescor em alimentos sólidos processados. Com o objetivo de estender a vida útil dos alimentos, os conservantes são muito usados em quantidades requeridas para o controle da degradação, como controle da microbiota e da oxidação de vitaminas nativas e corantes, entre outros, em quantidades controladas pela legislação de aditivos de alimentos (Guillard et al., 2009).

Presente no meio ambiente, *Pseudomonas aeruginosa* é ubiqüitário da água e do solo, podendo formar biofilmes em algumas superfícies ou substratos. Possui uma intensa atividade metabólica, degradando proteínas, gorduras, carboidratos e outros substratos, além de produzir pigmentos, que causam alterações nas características químicas e sensoriais, representando o grupo de microrganismos mais freqüentes em alimentos frescos. Sua presença em níveis elevados no final do processamento resulta na redução da vida de prateleira dos produtos refrigerados, devido à produção do muco superficial, além de odores e sabores desagradáveis, sendo, portanto, seu estudo de grande importância para a indústria alimentícia (Guahyba, 2003). *Bacillus cereus* é amplamente distribuído na natureza, sendo o solo seu reservatório natural, onde a presença desta bactéria ou de seus esporos em alimentos é relativamente frequente. Devido a grande resistência de seus esporos e capacidade de adesão às superfícies que contatam os alimentos, há grande dificuldade da indústria em eliminar este microrganismo do ambiente industrial (Andersson et al. 1995; Kotiranta et al., 2000). O último é capaz de utilizar vários carboidratos, hidrolisar amido, caseína e gelatina. Os compostos resultantes da hidrólise são os responsáveis pelo odor e sabor característicos de rancificação (Franco; Landgraf, 2008).

Com a difusão de técnicas modernas de preservação houve interesse acentuado e renovado sobre algumas especiarias, utilizadas principalmente como condimentos alimentares. Além de participarem como ingredientes de inúmeros alimentos, apresentam ação direta e complementar como agentes antimicrobianos devido à presença de óleos essenciais, os quais são constituídos por princípios ativos voláteis que podem ser obtidos por técnicas de extração (Wiest, 1999). Em estudos, as especiarias e seus produtos derivados (extratos, óleos essenciais, constituintes químicos) têm demonstrado resultados satisfatórios na inibição de microrganismos patogênicos oportunistas, patogênicos primários, deteriorantes, e/ou na inibição da produção de toxinas microbianas (Arora; Kaur, 1999; Al-Jedah et al., 2000; Juglal et al., 2002; Kizil; Sogut, 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cinnamomun zeylanicum* (canela) e *Mentha piperita* (hortelã-pimenta)

sobre duas espécies de bactérias deteriorantes de alimentos, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2 METODOLOGIA

Os óleos essenciais de *Cinnamomun zeylanicum* (canela) e de *Mentha piperita* foram adquiridos comercialmente pela Floriananda Ind. e Com. de Cosm. e Prod. Nat. Ltda. As bactérias testadas foram *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, todas pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da UFPel.

A avaliação primária da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi realizada através da técnica de difusão em disco, utilizando meio Ágar Muller Hinton. Os inóculos foram padronizados de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland, e semeados em superfície no meio de cultivo com auxílio de *swabs* estéreis. Sobre as placas semeadas, foram colocados discos de papel filtro estéreis, em duplicata, adicionados de 10µL do óleo essencial, e um disco controle, onde foi adicionado água destilada estéril. As placas foram incubadas a 36°C por 24h e a atividade antimicrobiana determinada pela observação de halo de inibição, com medição por régua milimetrada. Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizada a técnica de Microdiluição em caldo, utilizando-se de placas estéreis de microtitulação, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003). O meio utilizado foi o caldo Muller Hinton (Acumedia®), acrescido do emulsificante Tween 80 (T80-Vetec®) a 0,5%. Foram feitas 8 diluições dos óleos essenciais no meio obtendo-se concentrações entre 100 µl/ml⁻¹ e 0,781 µl/ml⁻¹.

Os inóculos (20µl) de cada uma das bactérias testadas foram ajustadas em solução salina à escala 0,5 de Mac Farland, logo foram feitas diluições de 1:10 em caldo Muller Hinton, e em seguida adicionados as cavidades que já continham as diluições do óleo (180µl de meio+óleo+T80), visando obter uma população bacteriana de aproximadamente 10⁴ a 10⁵ UFC/mL⁻¹. Foram realizadas tréplicas para cada cepa bacteriana analisada. Um controle negativo (meio+T80+óleo essencial) e um positivo (meio+T80+inóculo) também foram usados e as placas foram então incubadas a 36°C por 24h. Para a leitura adicionou-se 20µl de Cloreto de 2,3,5 – Trifenil Tetrazólio a 1%, que após vinte minutos a 36°C de incubação, indicou atividade celular bacteriana, com mudança na coloração. A CIM foi determinada como sendo a menor concentração do óleo a qual inibiu completamente o crescimento bacteriano no meio líquido. Já a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada de acordo com os resultados do CIM, onde alíquotas de 5µl de cada diluição que inibiu o crescimento bacteriano foram semeadas em ágar BHI e incubadas a 36°C durante 24h. A CBM foi determinada como sendo a concentração mínima que não apresentou crescimento bacteriano no meio de cultura após o período de incubação. A partir dos valores da CMI, serão calculadas as médias aritméticas para a comparação da atividade antibacteriana entre os dois óleos essenciais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 corresponde aos valores referentes ao tamanho dos halos inibitórios. Arora e Kaur (1999) relataram que o tamanho do halo de inibição indica a maior ou menor suscetibilidade dos microrganismos frente a uma substância

inibidora. Classificaram os halos de inibição com base no tamanho de seu diâmetro (incluindo o diâmetro do disco de papel filtro), sendo os valores menores que 7 mm considerados não ativos contra os microrganismos testados, assim como ocorreu neste trabalho quando considerado a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* frente ao óleo essencial de hortelã-pimenta. No trabalho dos mesmos autores, aqueles halos de inibição de 12 mm ou mais, foram considerados como os de melhor efeito inibitório. No teste de difusão em disco, *Bacillus cereus* apresentou resultados favoráveis tanto quando testado frente ao óleo essencial de canela como para o óleo de hortelã-pimenta.

Tabela 1 – Valores dos halos inibitórios do teste de difusão em disco apresentados por *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* frente aos óleos essenciais de *Cinnamomun zeilanicum* e *Mentha piperita*

Microrganismo	Gram	Halo de inibição	
		<i>C. zeilanicum</i>	<i>M. piperita</i>
<i>Bacillus cereus</i>	+	18,5	19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	9,5	6,5

+: gram positiva; -: gram negativa

A concentração mínima inibitória do óleo essencial de canela para *B. cereus* foi de $6,25\mu\text{l}/\text{mL}^{-1}$ e para o de hortelã-pimenta foi de $12,5\mu\text{l}/\text{mL}^{-1}$. O óleo essencial de canela apresentou CMI frente *P. aeruginosa* de $12,5\mu\text{l}/\text{mL}^{-1}$, já o hortelã-pimenta não demonstrou atividade sobre esse microrganismo. Resultados obtidos neste trabalho para o óleo essencial de canela corroboram com dados obtidos por Ernandes e Cruz (2007), onde avaliaram a atividade de alguns óleos essenciais em vários microrganismos e obtiveram resultados ótimos para a canela, principalmente contra bactérias gram positivas. No trabalho de Hammer, Carson e Riley (1999) pela CMI, *M. piperita* inibiu todos os microrganismos testados exceto *P. aeruginosa*, assim como no presente estudo. O óleo de *M. piperita* não obteve atividade bactericida sobre *P. aeruginosa*, e somente na máxima concentração testada ($100\mu\text{l}/\text{mL}^{-1}$) sobre *B. cereus*, já o de *C. zeilanicum* não obteve ação bactericida sobre a *P. aeruginosa*, e para o *B. cereus* a CBM foi de $50\mu\text{l}/\text{mL}$. Os valores obtidos conforme a Tabela 2 indicam que o óleo essencial que apresentou média aritmética na CMI mais baixa, indicando maior sensibilidade, tanto para *B. cereus* quanto para *P. aeruginosa* foi o óleo essencial de *C. zeilanicum* (canela).

Tabela 2 – Médias aritméticas da concentração inibitória mínima (CMI) apresentadas pelas cepas bacterianas frente aos óleos essenciais de *Cinnamomun zeilanicum* e *Mentha piperita*

Óleo Essencial	CMI		Média Aritmética
	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
<i>C. zeilanicum</i>	6,25	12,5	9,37
<i>M. piperita</i>	12,5	> 100	56,25

4 CONCLUSÃO

Apartir dos resultados obtidos e dentro das limitações deste estudo, observa-se o potencial dos óleos essenciais testados para utilização como inibidores do crescimento bacteriano e com potencial para substituir aditivos químicos nos alimentos, após maiores estudos sobre toxicidade e aceitação dos mesmos.

5 REFERÊNCIAS

AL-JEDAH, J. H., ALI, M. Z, ROBINSON, R. K. The inhibitory action of spices against pathogens that might be capable of growth in a fish sauce (mehiawah) from the Middle East. **International Journal of Food Microbiology**. v. 57: p.: 129-133, 2000.

ANDERSSON, A. et al. What problems does the food industry have the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n.2, p.145-155, 1995.

ARORA, D., KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 12: 257-262, 1999.

ERNANDES, F. M. P. G. & GARCIA-CRUZ, C. H. – Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. **BCPPA**. v. 25, n. 2, p.: 193-206, 2007.

GUAHYBA, A. S. **Microrganismos Deteriorantes**. Centro Universitário - UNIVATES, Lajedo, RS. 2003. (Apostila Técnico em Química).

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.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spices oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection**. v. 65, p.: 638-687, 2002.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**. v. 86, p.: 985–990, 1999.

KIZIL, S.; SOGUT, T. Investigation of antibacterial effects of spices. **Crop Research**. v. 3, p.: 86-90, 2003.

KOTIRANTA, A. et al. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, v.2, n.2, p.189-198, 2000.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A6, 2003.

WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana das especiarias. **Higiene Alimentar**, v.12, p.26-29, 1999.