

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS EM CONDIMENTOS INDUSTRIALIZADOS

Penélope Batista da Cruz¹

Cíntia Alessandra Matiucci Pereira¹

RESUMO

Devido à exigência dos órgãos legisladores e consumidores para retirada de aditivos químicos na produção de alimentos, surge uma nova perspectiva de conservação de alimentos utilizando o sistema antimicrobiano natural de origem nos condimentos principalmente contra os microrganismos causadores de doenças veiculadas por alimentos. O potencial antimicrobiano dos condimentos desidratados orégano, sálvia, alecrim, tomilho, manjeriço e manjerona foram avaliados pelo método de difusão em disco de papel frente à *Staphylococcus aureus*. Os diâmetros do halo de inibição (em mm) dos extratos testados foram comparados em diferentes concentrações. Os extratos que apresentaram efeito bactericida foram o orégano (concentração de 12,5%), sálvia (concentração de 12,5%) e alecrim (concentração de 10%). Dentre os extratos testados, o de alecrim foi o mais efetivo.

PALAVRAS-CHAVE: condimentos; antimicrobianos; método da difusão em disco; *Staphylococcus aureus*.

Introdução

A atual tendência adotada pelos órgãos legisladores da produção de alimentos e pelos consumidores tem exigido uma progressiva retirada de aditivos químicos na produção de alimentos. Esta tendência tem conduzido a indústria de alimentos a buscar compostos alternativos para alcançar suas metas, relacionadas à estabilidade microbiana dos seus produtos finais à ação de microrganismos causadores de deterioração e/ou de doenças. Assim surge uma nova perspectiva de conservação de alimentos utilizando o sistema, antimicrobiano natural, que seria o sinergismo de vários elementos, principalmente os dos que possuem atividade antimicrobiana de origem nos condimentos contra os microrganismos (BEDIN, et al., 1999).

Ao longo dos anos, tem-se observado que os condimentos, além de conferirem sabor aos alimentos, também possuem atividade antimicrobiana. Estudos mostram que o uso de

¹ Curso de Nutrição - Centro Universitário Central Paulista (UNICEP). Rua Miguel Petroni, 5111, 13563-470, São Carlos, SP. E-mail: cmatiucci@gmail.com

condimentos (cebola, cravo, alho, gengibre, noz moscada, entre outros) como conservantes vem aumentando com a aplicação desses itens como agentes bactericidas (SHARMA et al., 1981; OLIVEIRA, 1991).

Um dos métodos para avaliar a atividade antimicrobiana dos condimentos é o método de difusão em disco. Este método foi idealizado por Bauer et al. em 1966 (citado por SEJAS et al., 2003), e desde então é um dos métodos mais utilizados nos laboratórios de microbiologia clínica no Brasil para testar a suscetibilidade aos antimicrobianos. O princípio deste método baseia-se na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel filtro. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima. Esse método é qualitativo, ou seja, permite classificar a amostra bacteriana em suscetível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano (SEJAS et al., 2003).

Entre os vários microrganismos que podem ser testados, um dos mais importantes na área de alimentos é a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*. Sua principal via de transmissão é através de manipuladores de alimentos, os quais podem ser portadores de *S. aureus*. O manipulador pode, eventualmente, inocular o microorganismo através, por exemplo, de secreções nasais em alimentos preparados e sem refrigeração. Nesta situação *S. aureus* pode se reproduzir e produzir a toxina estafilocócica que provoca um quadro de intoxicação alimentar nos indivíduos que ingeriram o alimento contaminado (FRANCO; e LANDGRAF, 2003).

Desta forma, a procura por compostos naturais com propriedades antimicrobianas tem sido explorada (GOULD, 1996). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos de orégano, sálvia, alecrim, tomilho, manjerona e manjeriço desidratados frente à *S.aureus*.

Material e Métodos

Foram utilizados orégano (*Origanum sativum*), sálvia (*Salvia officinalis* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), tomilho (*Thymus vulgaris*), manjerona (*Origanum majorana*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*) desidratados adquiridos no comércio local.

Preparo dos extratos hidroalcoólicos

Para os ensaios foram preparados extratos hidroalcoólicos (75 % de etanol) na concentração de 12,5% (p/v) a partir das folhas desidratadas dos condimentos em estudo as quais foram mantidas em contato com o solvente por 24 horas. Após, os extratos foram

filtrados, estocados em vidro âmbar e etiquetados. A partir desta concentração (12,5%) foram preparados os extratos nas concentrações de 2,5% (p/v), 5,0% (p/v), 7,5% (p/v) e 10% (p/v) para posteriormente serem submetidos ao método de difusão em disco de papel frente à *Staphylococcus aureus*.

Método da Difusão em Disco de Papel

O método da difusão em disco de papel foi realizado de acordo com Kalemba e Kunicka (2003). Para o procedimento, *S.aureus* foi ativado em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), a 36°C por 18 a 24 horas de incubação. Posteriormente foi semeado em placas com ágar nutriente com auxílio de um *swab* estéril. A inoculação foi feita em forma de estrias na superfície do ágar em três direções, girando a placa em ângulo de 60° após cada estria. A seguir, sobre a superfície semeada, foram colocados com o auxílio de uma pinça estéril os discos de papel de filtro estéreis (previamente cortados no diâmetro padrão de 6 mm e esterilizados em estufa a 180°C por 2 horas) impregnados com os extratos por 15 minutos. As placas foram incubadas a 36°C por 48 horas. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas três repetições, em milímetros (mm).

Resultados e Discussão

Os diâmetros de halo de inibição dos extratos hidroalcoólicos dos condimentos estudados foram comparados nas diferentes concentrações testadas (Figura 1).

Como se observa na Figura 1 a formação do halo de inibição de crescimento celular foi maior na presença do extrato nas concentrações de 10% e 12,5%. De acordo com Sejas et al. (2003), a difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima (MIC). Esse método é qualitativo, ou seja, permite classificar a amostra bacteriana em suscetível (S) – com diâmetros acima de 18 mm; intermediária (I) – com diâmetros entre 9 e 18 mm ou resistente (R) ao antimicrobiano – com diâmetros menores que 9 mm.

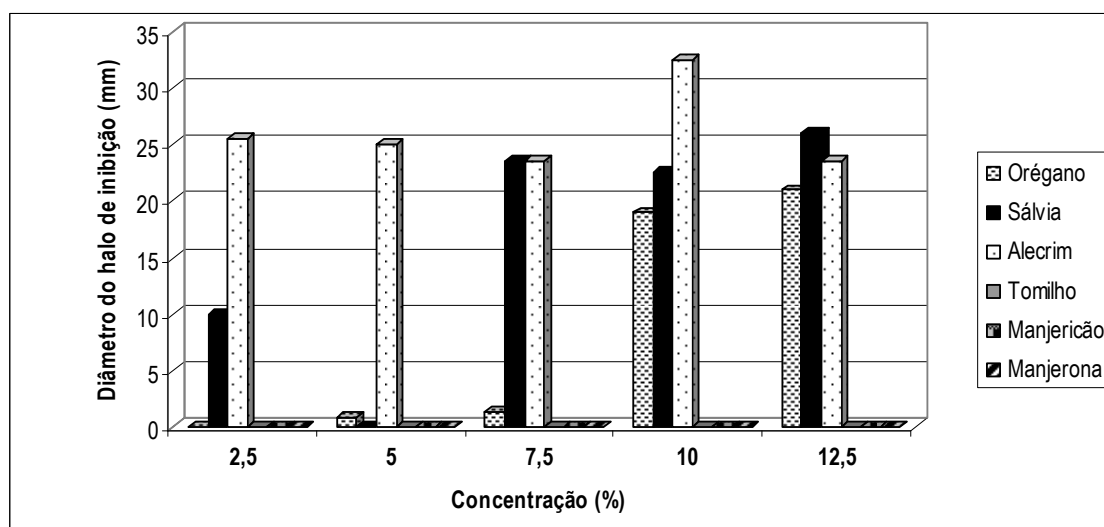


Figura 1. Comparação dos diâmetros do halo de inibição (em mm) dos extratos hidroalcoólicos de orégano, sálvia, alecrim, tomilho, manjeriço e manjerona em diferentes concentrações.

A desidratação de condimentos é realizada em estufas com circulação de ar, procedimento realizado com cuidado para se evitar a perda dos óleos essenciais. O calor artificial é empregado, cuidadosamente controlado e efetivamente circulado. A temperatura deve ser moderada e gradualmente aumenta até alcançar um máximo. Para o mercado consumidor, geralmente os condimentos são moídos. Desta forma, optou-se por trabalhar com amostras comerciais, pois além da praticidade na obtenção das amostras, também foi avaliado se os condimentos comercializados apresentam atividade antimicrobiana.

Como o teste da difusão em disco é um método prático, de fácil execução e idealizado para bactérias de crescimento rápido, o presente estudo procurou adaptar a metodologia de suscetibilidade aos antimicrobianos como um método qualitativo para verificar o potencial antimicrobiano de condimentos. Desta forma, foi utilizado papel de filtro comum e ágar nutriente como meio de cultura por ser de fácil obtenção e baixo custo. Assim, os reagentes são relativamente econômicos, não há a necessidade de equipamentos especiais, além de apresentar grande flexibilidade na escolha e número de condimentos a serem testados.

Observa-se que dentre os extratos estudados (Figura 1), o mais efetivo contra a bactéria *S. aureus* foi o extrato de alecrim. O halo de inibição formado apresentou valores superiores a 20 mm em todas as concentrações (2,5%; 5%; 7,5%; 10% e 12,5%), confirmando a sensibilidade do microrganismo. Valores superiores a 20 mm foram encontrados para o extrato de sálvia, nas concentrações de 7,5%, 10% e 12,5% , confirmando os resultados obtidos por Shelef; Naglik e Bogen (1980). Bons resultados também foram encontrados para

o extrato de orégano, a concentrações de 10% e 12,5% acarretaram a formação do halo de inibição com diâmetros superiores a 15 mm e 20 mm, respectivamente.

No presente experimento não houve formação de halo de inibição (em mm) dos extratos hidroalcoólicos de tomilho, manjerona e manjeriço nas diferentes concentrações testadas frente ao *S. aureus*. A hipótese para esta divergência pode estar nas diferenças na composição que estes condimentos poderiam vir a ter devido a fatores climáticos, ambientais e sazonais (SOUZA et al., 2005)

Busatta (2006) encontrou atividade antimicrobiana pelo método de difusão em placas frente a *S.aureus* para o óleo essencial de duas espécies correlatas, orégano e manjerona, *Origanum vulgare* e *Origanum manjerona*, respectivamente. A formação do halo de inibição de crescimento celular foi maior na presença do óleo essencial de orégano do que o óleo, essencial de manjerona, confirmando a eficiência do orégano. Sivropoulou et al. (1996) verificaram que a manjerona apresenta menor atividade antimicrobiana por apresentar baixo índice de carvacrol e ausência de timol, compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana do orégano. Entretanto, carvacrol e timol também são substâncias presentes no tomilho. Mas, no presente estudo, o extrato de tomilho nas concentrações testadas não apresentou atividade antimicrobiana.

Carvalho et al. (2005) estudaram a atividade antimicrobiana de condimentos na cidade de Porto Alegre/RS. Os autores encontraram, nas condições do experimento, tênue inibição por parte dos extratos de manjerona e tomilho, porém somente frente à *Salmonella*.

Cechinel Filho (1999) ao analisar várias plantas concluiu que extratos mais polares apresentaram eficácia contra bactérias patogênicas como *S.aureus*. De acordo com Porte e Godoy (2001), as bactérias Gram positivas, como *S.aureus*, são mais sensíveis aos condimentos que as Gram negativas. De acordo com Shelef, Naglik e Bogen (1980), a sálvia e o alecrim estão entre os antimicrobianos mais eficazes.

Os meios pelos quais os microrganismos são inibidos por extratos hidroalcoólicos parecem incluir diferentes modos de ação. As inibições mais frequentes envolvem componentes fenólicos, os quais sensibilizam a bicamada lipídica da membrana celular e alteram a atividade dos canais de cálcio, causando aumento da permeabilidade e liberação dos constituintes intracelulares vitais. Também podem ocorrer danos ao sistema enzimático do microrganismo envolvido na produção de energia e na síntese de componentes estruturais, bem como a destruição ou inativação do material genético (PORTE e GODOY, 2001).

Concluiu-se que o método da difusão em disco é de fácil aplicação e por utilizar pequena quantidade de amostra, pode ser utilizado como um teste qualitativo o qual pode

indicar rapidamente se condimentos exibem algum tipo de atividade antimicrobiana. Os extratos hidroalcoólicos de orégano, alecrim e sálvia foram efetivos na inibição do crescimento de *S. aureus*, sendo o extrato de alecrim o mais efetivo. Devido ao diâmetro de halo de inibição formado, pode-se concluir que os extratos estudados de sálvia na concentração de 12,5%, de alecrim, na concentração de 10%, e de orégano na concentração de 12,5% apresentaram efeito bactericida. Concluiu-se também que a desidratação aplicada industrialmente aos condimentos não destrói os constituintes que exercem efeito antimicrobiano nos condimentos estudados.

Referências

- BEDIN, C.; GUTKOSKI, S. B.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana das especiarias. **Higiene Alimentar**, v. 13, n.65, p. 26-29, 1999.
- BUSATTA, C. **Caracterização Química e Atividade Antimicrobiana in vitro e em Alimentos de Extratos de Orégano e Manjerona**. 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2006.
- CARVALHO, H.H.C., CRUZ, F.T., WIEST, J.M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.25-32, 2005.
- CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v. 23, n.5, p. 680-685, 1999.
- FRANCO, B.D.G; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2003.
- GOULD, G.W. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of Food Protection**, Suppl. v.59, p.82-86. 1996.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p. 813-819, 2003.
- OIYE, S.O.; MUROKI, N.M. Use of Spices in Foods. **The Journal of Food Technology in Africa**, v.7, p. 39-44, 2002.
- OLIVEIRA, S.R. **Ação antioxidante de extratos de alho (*Allium sativum* L.) e de cebola (*Allium cepa* L.) in vitro e em gordura de frango**. 1991. Tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa – UFV, 1991.
- PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **Boletim do Ceppa**, v. 19, n. 2, p. 193-210, jul./dez. 2001.

SEJAS, L.M.; SILBERT, S.; REIS, A.O.; SADER, H.S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.1, p.27-35, 2003.

SHARMA, A.; PADWALL-DESAI, S. R.; TEWARI, G. W.; BANDYOPADHYAY, C. Factors affecting antifungal activity of onion extractives against aflatoxin producing fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 46, n. 3, p. 741-744, 1981.

SHELEF, L.A.; NAGLIK, O.A.; BOGEN, D.W. Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. **Journal of Food Science**, v.45, n.4, p.1042-1044, 1980.

SIVROPOULOU, A.; et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202-1205, 1996.

SOUZA, E.L.; et al. Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v.19, n. 132, p.40-45, 2005.

EVALUATION OF NATURAL ANTIMICROBIALS IN INDUSTRIALIZED CONDIMENTS

Abstract

Due to the requirement of legislators and consumers for removal of chemical additives in food production, a new perspective has emerged on food conservation using natural antibacterial spices against the pathogens that causes foodborne diseases. The antimicrobial potential of dried seasonings - oregano, sage, rosemary, thyme, basil and marjoram - were assessed by a paper disk diffusion method, against *Staphylococcus aureus*. The diameter of inhibition region (mm) of the extracts were compared at different concentrations. The extracts of oregano (concentration of 12.5%), salvia (concentration of 12.5%) and rosemary (concentration of 10%) showed bactericidal effect. Rosemary extract was the most effective.

Key Words: condiments; antimicrobial; disk diffusion; *Staphylococcus aureus*.

Agradecimentos

Ao PIBIC/CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica da aluna (Processo nº 800021/06-1).