

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA-DOCE (*Pimpinella anisum* L.)

CAROLINE PEREIRA DAS NEVES¹; TATIANE KUKA VALENTE GANDRA²;
ELIEZER AVILA GANDRA³

¹Laboratório de Ciências dos Alimentos e Biologia Molecular (LACABIM), Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos (PPGNA), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – neves_caroline@ymail.com

²LACABIM, Faculdade de Nutrição, UFPEL – tkvgandra@yahoo.com.br

³LACABIM, PPGNA, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), UFPEL – gandraea@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A erva-doce (*Pimpinella anisum* L.) é uma especiaria utilizada tradicionalmente para agregar sabor ou aroma a alimentos e bebidas. Seus extratos são fontes acessíveis de antioxidantes naturais, além de possuir atividade antimicrobiana (BRASIL, 2005; GÜLÇİN et al., 2003). A utilização de óleos essenciais para extensão da vida útil de alimentos devido a suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas tem recebido cada vez mais atenção. Isso ocorre devido a preocupações de consumidores em relação a possíveis efeitos negativos à saúde decorrentes do consumo de alimentos que utilizem conservantes químicos sintéticos e a promoção da cultura de consumo de alimentos orgânicos, em que o uso de aditivos sintéticos não são autorizados (FERNÁNDEZ-LÓPEZ & VIUDA-MARTOS, 2018). A eficácia da ação antimicrobiana dos óleos essenciais em relação a micro-organismos que podem causar adversidades à saúde e prejuízos financeiros aos setores agroindustriais vem sendo comprovados cientificamente e, por isso, se tornam alternativas de interesse para indústrias farmacêuticas, cosméticas, sanitárias e agrícolas (ALMEIDA et al., 2020).

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de óleo essencial extraído de amostras de erva-doce (*Pimpinella anisum* L.).

2. METODOLOGIA

As amostras de erva-doce (*Pimpinella anisum* L.) foram adquiridas no mercado local da cidade de Pelotas, RS, e moídas com um moinho de facas (Marconi). Os óleos essenciais foram extraídos de acordo com a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010) por hidrodestilação durante 3 horas, utilizando o equipamento Clevenger, e foram armazenados em frascos âmbar a uma temperatura de -18°C.

A avaliação do efeito antimicrobiano foi realizada por meio de três metodologias fenotípicas: Disco Difusão (DD), Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Foram testados os efeitos antimicrobianos do composto de óleo essencial sobre as cepas padrão das espécies de bactérias *Escherichia coli* (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832). As bactérias utilizadas no experimento estavam 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) ou BHI e

incubadas em estufa durante 24 h a 37°C. Após uma alçada desse crescimento foi estriada em placas de Petri com ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli* e ágar Baird-Parker 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 ressuspensa 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.

A análise de Disco Difusão (DD) foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2015a) com pequenas modificações. A solução salina contendo o inóculo foi semeada com auxílio de um swab estéril na superfície de placas com ágar Muller-Hinton. Em seguida foram adicionados discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de 6 mm. Após 10 µL do composto de óleo essencial foram impregnados sobre os discos de papel e as placas incubadas por 24 h a 37°C. Logo após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição, sendo os resultados expressos em milímetros.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2015b) com pequenas modificações. Para isto foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde foram acrescentadas em cada poço 100 µL de caldo BHI, 100 µL de inóculo (80 µL de caldo BHI e 20 µL de água salina com crescimento bacteriano) e o composto em cinco diferentes concentrações de composto (100 µL de composto puro); 1:5 (20 µL de composto e 80 µL de dimetilsulfóxido (DMSO)); 1:10 (10 µL de composto e 90 µL de DMSO); 1:100 (1 µL de composto e 99 µL de DMSO) e 1:1000 (0,1 µL de composto e 99,9 µL de DMSO). Após o preparo da amostra, as placas de microtitulação foram lidas em espectrofotômetro (Biochrom EZ Read 400) entre 620nm e 630nm. Em seguida, procedeu-se a incubação por 24 h a 37°C, e após, foi realizada nova leitura em espectrofotômetro. A CIM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

Após a realização da CIM, foram retirados 15 µL dos poços das amostras que tiveram inibição e estriados em placas de Petri com ágar TSA ou BHA (*Brain Heart Infusion Agar*) e incubados por 24 h a 37 °C. Foi considerada a mínima concentração bactericida as placas onde não houve crescimento bacteriano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 traz os resultados das análises de DD, CIM e CBM do óleo essencial de erva-doce (*Pimpinella asnisum* L.)

Tabela 1. Análise em Disco Difusão (DD), Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de erva-doce (*Pimpinella asnisum* L.)

Bactérias	Potencial Antimicrobiano		
	DD (mm)	CIM (mg mL ⁻¹)	CBM (mg mL ⁻¹)
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	0.4	4
<i>Escherichia coli</i>	7	ND	ND

DD – Disco difusão, CIM – Concentração Inibitória Mínima, CBM – Concentração Bactericida Mínima, ND – ação não detectada

Verificou-se a sensibilidade de bactérias *S. aureus* e *E. coli* frente ao óleo essencial de erva-doce (*Pimpinella asnisum* L.) devido a formação de halos de inibição de 11 e 7 mm, respectivamente, na análise de DD.

Os resultados referentes a CIM e CBM do óleo essencial de erva-doce (*Pimpinella asnisum* L.) demonstraram um efeito inibitório até a concentração de 0.4 mg mL⁻¹ frente a bactéria *S. aureus*. O óleo essencial apresentou efeito bactericida na contração de 4 mg mL⁻¹ para *S. aureus*. Não foi detectada ação referente a CIM e CBM frente a bactéria *E. coli*.

A ação dos óleos essenciais sobre bactérias ocorre pela degradação da parede celular e, a partir do rompimento desta barreira, são comprometidas suas funções celulares. Bactérias gram-positivas, como *S. aureus*, possuem uma parede celular composta de 90-95% de peptidoglicanos e sua estrutura permite a penetração de moléculas hidrofóbicas mais facilmente na célula, agindo assim na parede celular e dentro do citoplasma. Em comparação, bactérias gram-negativas, como *E. coli*, possuem dupla camada de fosfolipídios ligada a membrana interna da célula por lipopolissacarídeos tornando esse tipo de bactéria mais resistente a ação de óleos essenciais (NAZARRO et al., 2013).

Em estudo realizado por Gülçin et al. (2003) testou a atividade antimicrobiana de extrato de *Pimpinella asnisum* L. a base de água e etanol. Todos os extratos mostraram forte atividade contra a bactéria *S. aureus*., entretanto o extrato a base de água não teve atividade antimicrobiana detectada contra bactérias *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Binatti et al. (2016) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos a base de água de *Pimpinella asnisum* L. a partir da análise de DD. Verificou-se a formação de halos de inibição de 6 mm para *S. aureus*, 8 mm para *Bacillus subtilis* e *Salmonella Typhimurium*, e 10 mm para *Salmonella Enteritidis*.

E. coli e *Staphylococcus* spp. estão entre os cinco agentes etiológicos mais identificados como causadores de surtos de DTA no Brasil entre os anos de 2016 e 2019, sendo *E. coli* responsável por 35,7% dos surtos e *Staphylococcus* spp. por 11,5% (BRASIL, 2020). Destaca-se que existe uma subnotificação dos casos de DTA, isso porque somente uma pequena quantidade de pessoas procura ajuda médica e nem todos os casos são investigados (FORYSTHE, 2013).

A ação antimicrobiana do óleo essencial de erva-doce (*Pimpinella asnisum* L.) tem potencial para ser utilizada pela indústria para aumentar a vida útil de alimentos. Almeida et al. (2020) destacam que o uso de óleos essenciais pode ser uma alternativa de interesse a indústria de alimentos em relação a micro-organismos que causem adversidades à saúde, como micro-organismos patogênicos que causam DTA. Estudos futuros devem verificar a aplicação de óleo essencial de erva-doce (*Pimpinella asnisum* L.) em alimentos e a aceitabilidade pelos consumidores.

4. CONCLUSÕES

Analisando os resultados, verificou-se sensibilidade das bactérias *S. aureus* e *E. coli* ao óleo essencial de erva-doce (*Pimpinella asnisum* L.), pela formação de halos de inibição de 11 e 7 mm, respectivamente, na análise de DD. O óleo apresentou efeito inibitório a *S. aureus* até a concentração de 0.4 mg mL⁻¹ e efeito bactericida a *S. aureus* na concentração de 4 mg mL⁻¹. Novos estudos devem ser realizados para aprofundar os conhecimentos sobre a aplicação do óleo essencial de erva-doce (*Pimpinella asnisum* L.) com o objetivo de aumentar a vida de prateleira dos alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.C de.; ALMEIDA, P.P de.; GHERARDI, S.R.M. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. **Nutritime Revista Eletrônica**, v.17, n.01, p.8623-8633, 2020.

BINATTI, T.T.; GEROMAL, M.R.; FAZIO, M.L.S. Ação antimicrobiana de especiarias sobre o desenvolvimento bacteriano. *Higiene Alimentar*, v.30, n.206/261, p.105-108, 2016.

BRASIL. **Resolução RDC n. 276, de 22 de setembro de 2005**. Aprovar o “REGULAMENTO TÉCNICO PARA ESPECIARIAS, TEMPEROS E MOLHOS”. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe sobre surtos notificados de doenças transmitidas por água e alimentos – Brasil, 2016 – 2019. **Boletim Epidemiológico** 32, v. 51, n.32, p. 27-31, 2020.

CLINICAL LAB STAND INSTITUTE - CLSI. **M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard—Twelfth Edition. 2015a.

CLINICAL LAB STAND INSTITUTE - CLSI. **M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Approved Standard—Tenth Edition. 2015b.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; VIUDA-MARTOS, M. Introduction to the Special Issue: Application of Essential Oils in Food Systems. **Foods**, v.7, n.4, p.56, 2018.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Aritmed, 2013.

GÜLÇİN, İ., OKTAY, M., KIREÇCI, E., & KÜFREVIÖĞLU, Ö. İ. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. **Food Chemistry**, v.83, n.3, p. 371–382, 2003.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., DE MARTINO, L., COPPOLA, R., DE FEO, V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, v.6, n.12, p. 1451–1474, 2013.