

**MINISTERIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA EISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**



TESE

**ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA (*Schinus terebinthifolius* RADDI):
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E APLICAÇÃO COMO COMPONENTE
ATIVO EM FILME PARA BIOCONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS**

GUILHERME DA SILVA DANNENBERG
Bacharel em Química de Alimentos

Pelotas/RS, 2017

Guilherme da Silva Dannenberg

ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA (*Schinus terebinthifolius* RADDI):
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E APLICAÇÃO COMO COMPONENTE
ATIVO EM FILME PARA BIOCONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), como requisito final à obtenção do título de doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação:

Pr^{fa}. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini

Pr^f. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas/RS, 2017

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

D188o Dannenberg, Guilherme da Silva

Óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): atividade antimicrobiana e aplicação como componente ativo em filme para bioconservação de alimentos / Guilherme da Silva Dannenberg. – 121f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, 2017. – Orientador Ângela Maria Fiorentini; co-orientador Wladimir Padilha da Silva.

1.Óleo essencial. 2.*Schinus terebinthifolius* Raddi. 3.Atividade antibacteriana. 4.Bioconservante. 5.Mecanismo de ação. 6.Embalagem ativa. I.Fiorentini, Ângela Maria. I-I.Silva, Wladimir Padilha da. III.Título.

CDD: 633.840981

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini - DCTA/UFPeI

Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra - CCQFA/UFPeI

Prof^a. Dr^a. Mírian Ribeiro Galvão Machado - CCQFA/UFPeI

Prof^a. Dr^a. Rosane da Silva Rodrigues - CCQFA/UFPeI

Dr^a. Shanise Lisie Mello El Halal - DCTA/UFPeI

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial aos meus pais Mari Léa da Silva Dannenberg e Geraldo Dannenberg; e a minha avó Gertrude Dorow Dannenberg (Em Memória).

Agradecimentos

A Deus por me capacitar e conduzir ao longo desta caminhada, e pelas inúmeras bençãos recebidas.

A toda minha família, em especial aos meus pais Mari Léa da Silva Dannenberg e Geraldo Dannenberg, pelo constante apoio e motivação demonstrados ao longo desses anos.

À professora e amiga Dra. Ângela Maria Fiorentini, pela orientação e ensinamentos, assim como pela paciência e confiança em mim depositados, com os quais tal trabalho se tornou possível.

Ao Professor e amigo Dr. Wladimir Padilha da Silva, pela orientação, ensinamentos e confiança, assim como pelo suporte técnico que foi de crucial importância para a realização deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório de microbiologia de alimentos (Andréia, Greice, Mariana, Flávia, Juliana, Darla, Cláudio, Louise, Isabela, Helena, Tassiana, Pedro, Leticia, Camila, Graciele), pelo companheirismo, amizade e carinho sempre demonstrados ao longo destes anos de trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra, Prof^a. Dr^a. Mirian Ribeiro Galvão Machado, Prof^a. Dr^a. Rosane Rodrigues e Dr^a. Shanise Lisie Mello El Halal, pessoas que admiro já de longa data, pela disposição em participar, tornando a conclusão desta etapa ainda mais especial.

Aos demais colegas e amigos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA/UFPel).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

E a todos que de algum modo, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado.

“Qualquer um, independentemente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na sua vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias por violência se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

(José Saramago - A jangada de pedra)

Resumo

Dannenberg, Guilherme da Silva. **Óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* RADDI): atividade antimicrobiana e aplicação como componente ativo em filme para a bioconservação de alimentos**. 2017. 121f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. 2017.

A utilização de conservantes naturais bem como de embalagens ativas vêm ganhando espaço na indústria de alimentos. Neste trabalho, objetivou-se avaliar as características antimicrobianas do óleo essencial de pimenta rosa (OEPR) e, utilizá-lo como componente ativo na elaboração de filmes para aplicação no desenvolvimento de embalagens bioconservantes para alimentos. Através da análise cromatográfica (CG/MS), detectou-se 18 compostos, 4 monoterpenos e 14 sesquiterpenos, dos quais β -mirceno (41%), β -cuvabeno (12%) e Limoneno (9%) foram os majoritários. Na atividade antimicrobiana do OEPR em ágar e caldo, verificou-se ação contra cinco bactérias patogênicas. A CIM (Concentração Inibitória Mínima) para *S. aureus* e *L. monocytogenes* foi de 0,68 e 1,36 mg/mL, respectivamente e a CBM (Concentração Bactericida Mínima) foi de 2,72 mg/mL, para ambas. Em micro-atmosfera a redução foi de 100% no desenvolvimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes* e, 16 e 15% para *E. coli* e *S. Typhimurium*. O tempo de contato necessário para a CBM agir sobre bactérias Gram positivas foi inferior ao período de 12 h, e bactérias Gram negativas não foram inibidas. Além disso, foram verificadas alterações na permeabilidade e integridade da membrana citoplasmática de todas as bactérias avaliadas, indicando que o dano no envoltório celular é um dos seus mecanismos de ação. O OEPR foi aplicado como componente ativo em filmes de acetato de celulose, avaliados *in vitro* (ágar, caldo e micro-atmosfera) e *in situ* (queijo mozzarella fatiado) contra bactérias patogênicas. Foi verificado que concentrações de 2, 4 e 6% de OEPR na matriz polimérica, conferiu atividade em todos os meios avaliados contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*. *Escherichia coli* foi sensível em meio líquido e em micro-atmosfera, enquanto *S. Typhimurium* não demonstrou sensibilidade aos filmes antibacterianos. A inibição *in situ*, demonstrou que a afinidade entre as moléculas apolares do OEPR e os componentes lipídicos

do queijo permite a migração do OE do interior do polímero para a superfície facilitando sua dispersão no alimento, indicando favorável sua aplicação como embalagem ativa.

Palavras-chave: Óleo essencial; atividade antibacteriana; bioconservante; mecanismo de ação; embalagem ativa.

Abstract

Dannenberg, Guilherme da Silva. **Essential oil of pink pepper (*Schinus terebinthifolius* RADDI): antimicrobial activity and application as active component in film for food bioconservation**. 2017. 121f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. 2017.

The use of natural preservatives as well as active packaging has sparked interest in the food industry. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial characteristics of the essential oil of pink pepper (PPEO) and to use it as an active component in the elaboration of films for application in the development of bioconservant packaging for food. Through the chromatographic analysis (GC/MS) 18 compounds, 4 monoterpenes and 14 sesquiterpenes were detected, of which β -myrcene (41%), β -cuvabene (12%) and Limonene (9%) were the majority. In the antimicrobial activity of PPEO in agar and broth, action was observed against five pathogenic bacteria. The MIC for *S. aureus* and *L. monocytogenes* was 0.68 and 1.36 mg/mL, and the MBC was 2.72 mg/mL for both. In micro-atmosphere the reduction was 100% in the development of *S. aureus* and *L. monocytogenes*, and 16 and 15% for *E. coli* and *S. Typhimurium*. The contact time required for MBC to act on Gram positive bacteria was lower than the 12 h period, and Gram negative bacteria were not inhibited. In addition, changes in the permeability and integrity of the cytoplasmic membrane of all evaluated bacteria were observed, indicating that damage in the cellular envelope is one of its mechanisms of action. PPEO was applied as an active component in cellulose acetate films evaluated in vitro (agar, broth and micro-atmosphere) and in situ (sliced mozzarella cheese) against pathogenic bacteria. It was found that concentrations of 2, 4 and 6% PPEO in the polymer matrix conferred activity on all média evaluated against *L. monocytogenes* and *S. aureus*. *Escherichia coli* was sensitive in liquid medium and in micro-atmosphere, while *S. Typhimurium* showed no sensitivity to antibacterial films. In situ inhibition has demonstrated that the affinity between the OEPR apolar molecules and the lipid components of the cheese allows migration of the OE from the interior of the

polymer to the surface and facilitates its dispersion in the food, indicating its favorable application as an active packaging.

Keywords: Essential oil; Antibacterial activity; biopreservative; mechanism of action; Active packaging.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1	Principais características dos óleos essenciais sob a ótica da física, da química e da biologia	32
Figura 2	Esquema simplificado da rota de produção dos terpenos, a partir do ácido mevalônico e exemplificação dos grupos de estruturas moleculares possíveis	36
Figura 3	Apresentação das diferenças entre as paredes celulares de bactérias Gram positivas e Gram negativas	38

Capítulo 2

Figura 4	Atividade antimicrobiana do OEPR em micro-atmosfera, sobre o crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas	70
Figura 5	Cinética de ação do OEPR em <i>S. aureus</i> (gráfico A), <i>L. monocytogenes</i> (gráfico B), <i>E. coli</i> (gráfico C) e <i>S. Typhimurium</i> (gráfico D)	72
Figura 6	Efeito de diferentes concentrações do OEPR na permeabilidade da membrana celular de <i>S. aureus</i> (gráfico A), <i>L. monocytogenes</i> (gráfico B), <i>E. coli</i> (gráfico C) e <i>S. Typhimurium</i> (gráfico D)	74

Capítulo 3

Figura 7	Atividade antimicrobiana de filmes com diferentes concentrações de OEPR contra <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i>	87
----------	---	----

Figura 8	Atividade antimicrobiana de filmes com diferentes concentrações de OEPR no crescimento de <i>S. aureus</i> (gráfico A), <i>L. monocytogenes</i> (gráfico B), <i>E. coli</i> (gráfico C) e <i>S. Typhimurium</i> (gráfico D) em caldo	89
Figura 9	Atividade antimicrobiana de filmes com diferentes concentrações de OEPR, por volatilização em micro-atmosfera, no desenvolvimento de bactérias patogênicas	90
Figura 10	Atividade antimicrobiana de filmes com diferentes concentrações de OEPR contra <i>S. aureus</i> (gráfico A), <i>L. monocytogenes</i> (gráfico B), <i>E. coli</i> (gráfico C) e <i>S. Typhimurium</i> (gráfico D) em queijo fatiado	92

Apêndices

Figura 11	Foto dos frutos de pimenta rosa madura utilizados para a obtenção do óleo essencial utilizado no estudo	107
Figura 12	Foto de teste de atividade antibacteriana do óleo essencial de pimenta rosa (OEPR) em ágar pela técnica de disco difusão	107
Figura 13	Foto de filme de acetato de celulose incorporado com óleo essencial de pimenta rosa	108
Figura 14	Foto do teste <i>in situ</i> (queijo mussarela fatiado) da atividade antibacteriana dos filmes de acetato de celulose incorporados com óleo essencial de pimenta rosa	108
Figura 15	Cromatograma do OEPR obtido a partir de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/MS), com a identificação dos componentes majoritários	109
Figura 16	Perfil de fragmentação do componente majoritário do OEPR (Mirceno) comparado com os dados da biblioteca NIST	110
Figura 17	Análise estatística dos halos de inibição aferidos para bactérias	111

	patogênicas e deteriorantes de relevância em alimentos mediante a ação do óleo essencial de pimenta rosa, com a respectiva análise estatística	
Figura 18	Análise estatística dos resultados da atividade antimicrobiana do OEPR contra <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. Typhimurium</i> em micro-atmosfera	112
Figura 19	Análise estatística dos resultados da análise de açúcares totais dos sobrenadantes de células de <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. Typhimurium</i> tratadas com OEPR	115
Figura 20	Análise estatística dos resultados da análise de ácidos nucléicos (substâncias absorventes a 230 nm) do sobrenadante de células de <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. Typhimurium</i> tratadas com OEPR	116
Figura 21	Análise estatística dos resultados da análise de proteínas do sobrenadante de células de <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. Typhimurium</i> tratadas com OEPR	117
Figura 22	Curva de calibração de glicose para a análise de açúcares totais em sobrenadantes de células de <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. Typhimurium</i> tratadas com OEPR	120
Figura 23	Curva de calibração de BSA (albumina de soro bovino) para a análise de proteínas dos sobrenadantes de células bacterianas tratadas com OEPR	121

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1	Composição química do óleo essencial de pimenta rosa	66
Tabela 2	Atividade antimicrobiana do OEPR por disco difusão, CIM e CBM.....	68
Tabela 3	Efeito do OEPR no extravasamento de componentes celulares de <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. Typhimurium</i>	75

Apêndices

Tabela 4	Análise estatística dos resultados da análise de cinética de ação do OEPR contra <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. Typhimurium</i>	113
Tabela 5	Análise estatística dos resultados da análise de condutividade elétrica dos sobrenadantes de células de <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. Typhimurium</i> tratadas com diferentes concentrações de OEPR	114
Tabela 6	Análise estatística dos resultados da análise de atividade antimicrobiana dos filmes contendo diferentes concentrações de OEPR contra <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. Typhimurium</i> em ágar	118
Tabela 7	Representação das diluições, e respectivas concentrações, obtidas nos poços das placas de micro-diluição para o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)	119

Lista de abreviaturas e siglas

a.C.	=	Antes de Cristo
d.C.	=	Depois de Cristo
ANOVA	=	Análise de variância
ATCC	=	American Type Culture Collection
AC	=	Acetato de Celulose
AP	=	Água Peptonada
BHI	=	Brain Heart Infusion (ágar ou caldo)
BP	=	Baird-Parker (ágar)
CIM	=	Concentração Inibitória Mínima
CBM	=	Concentração Bactericida Mínima
CR	=	Cromogênico (ágar)
EMB	=	Eosin Methyene Blue (ágar)
OE	=	Óleo essencial
OEPR	=	Óleo essencial de pimenta rosa
CG	=	Cromatografia Gasosa
g	=	Gramas
h	=	Horas
LPS	=	Lipopolissacarídeo
MLCB	=	Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant green (ágar)

MH	=	Mueller- Hinton (ágar)
min.	=	Minutos
MS	=	Detector de massas
m/v	=	Relação massa/volume
mg	=	Miligramas
mL	=	Mililitros
mm	=	Milímetros
nm	=	Nanômetros
RPM	=	Rotações por minuto
SF	=	Solução Filmogênica
UFC	=	Unidades Formadoras de Colônias
UV	=	Radiação Ultravioleta
v/v	=	Relação volume/volume
μL	=	Microlitros
Ca ²⁺	=	Íon cálcio, valência +2 (cátion)
K ⁺	=	Íon potássio, valência +1 (cátion)
Na ⁺	=	Íon sódio, valência +1 (cátion)
°C	=	Graus Celsius
%	=	Percentual

Sumário

1 Introdução	20
2 Objetivo	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 Hipóteses	27

Capítulo 1 - Manuscrito 1

Óleos essenciais: antibacterianos naturais contra patógenos alimentares (revisão)	28
--	----

1 Introdução	30
2 Definição	32
3 Aspecto histórico	33
4 Composição química	34
5 Atividade antibacteriana	36
5.1 Métodos de análise	38
5.1.1 Difusão em disco	39
5.1.2 Concentração Inibitória Mínima	40
5.1.3 Concentração Bactericida Mínima	41
5.1.4 Análise em micro-atmosfera	41
5.1.5 Análises <i>in situ</i>	43
5.2 Mecanismo de ação	44
6 Aplicações em alimentos	46
7 Perspectivas	48
8 Conclusão	50
9 Referências	50

Capítulo 2 - Manuscrito 2

Óleo essencial de pimenta rosa (<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi): Composição química, atividade antimicrobiana e mecanismo de ação	58
1 Introdução	60
2 Material e métodos	61
2.1 Material vegetal	61
2.2 Extração do óleo essencial	61
2.3 Bactérias avaliadas	61
2.4 Composição química do OEPR	62
2.5 Atividade antimicrobiana	62
2.5.1 Atividade antimicrobiana por disco difusão	62
2.5.2 Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima	62
2.5.3. Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera	63
2.6 Mecanismo de ação	63
2.6.1 Cinética de ação	63
2.6.2. Permeabilidade da membrana celular	64
2.6.3. Integridade da membrana celular	64
2.6.4. Extravasamento de ácidos nucleicos	65
2.7. Análise estatística	65
3 Resultados e discussão	65
3.1. Composição química do OEPR	65
3.2. Atividade antimicrobiana	67
3.2.1. Disco difusão, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima	67
3.2.2. Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera	69
3.3. Mecanismo de ação	71
3.3.1. Cinética de ação	71
3.3.2. Permeabilidade da membrana celular	73
3.3.3. Extravasamento de componentes celulares	75
4 Conclusão	77
5 Referências	77

Capítulo 3 - Artigo publicado

Óleo essencial de pimenta rosa como componente ativo em filmes de acetato de celulose: potencial de aplicação como embalagem ativa para queijo fatiado 81

1 Introdução	83
2 Material e métodos	84
2.1 Materiais	84
2.2 Bactérias	84
2.3 Óleo essencial	84
2.4 Elaboração dos filmes ativos	84
2.5 Atividade antimicrobiana dos filmes	85
2.5.1 Atividade antimicrobiana em meio sólido	85
2.5.2 Atividade antimicrobiana em caldo	85
2.5.3 Atividade antibacteriana em micro-atmosfera	85
2.5.4 Atividade antimicrobiana <i>in situ</i>	86
2.6 Análise estatística	86
3 Resultados e discussão	86
3.1 Atividade antimicrobiana em meio solido	86
3.2 Atividade antimicrobiana em caldo	88
3.3 Atividade antibacteriana em micro-atmosfera	90
3.4 Atividade antimicrobiana <i>in situ</i>	91
4 Conclusão	93
5 Referências	94
Considerações finais	96
Referências	98
Apêndices	106

1 INTRODUÇÃO

O processo de industrialização de alimentos, de um modo geral, tem como um dos principais objetivos a conservação dos produtos. Neste contexto, a contaminação microbiana tem significativa influência sobre a qualidade dos alimentos, podendo comprometer tanto a segurança do mesmo pela presença de bactérias patogênicas ou ainda toxinas bacterianas pré-formadas, como o estado de conservação pela multiplicação de bactérias deteriorantes, que reduzem a vida útil dos produtos.

As questões sobre segurança dos alimentos são consideradas uma das principais preocupações com relação à saúde pública (BURT, 2004; MACWAN et al., 2016). Surto de doenças transmitidas por alimentos são anualmente registrados em todo o mundo (MACWAN et al., 2016). Estima-se que cerca de 30% das pessoas nos países industrializados sofram anualmente de alguma doença transmitida por alimentos (BURT, 2004).

Mediante a importância que a contaminação microbiana representa, as indústrias buscam o seu controle monitorando rigorosamente todas as etapas do processo de industrialização. A implementação de programas de controle, como por exemplo, BPF (Boas Práticas de Fabricação) e APPCC (Avaliação de Perigos e Pontos Críticos de Controle), são cruciais para a redução dos riscos de contaminação dos alimentos (MACWAN et al., 2016).

Além do rigoroso controle dos processos tecnológicos ao longo de toda cadeia produtiva, a indústria de alimentos tradicionalmente utiliza conservantes sintético/artificiais para garantir a segurança microbiológica dos seus produtos (CALO et al., 2015a; MACWAN et al., 2016). Sorbato, nitrato, nitrito, bezoato e seus respectivos sais de sódio (Na) ou potássio (K), são exemplos de aditivos largamente aplicados em alimentos com o propósito de promover a conservação através do controle microbiano.

Todas as substâncias permitidas para aplicação como aditivos alimentares, dentre elas os conservantes, têm sua segurança comprovada e o uso regulamentado por órgãos competentes, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, o *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, e a *European Food Safety Authority* na Europa (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017). No entanto, nos últimos anos tem sido evidenciada uma percepção negativa dos consumidores quanto ao uso de aditivos sintéticos, bem como uma forte busca por produtos mais naturais (CALO et al., 2015b). Neste contexto, a importância da utilização de aditivos sintéticos para garantir a segurança microbiana dos alimentos, confronta a crescente demanda mercadológica por produtos mais naturais. Este conflito tem impulsionado a busca por substâncias de origem natural capazes de substituir os aditivos sintéticos sem prejuízos à eficácia no controle microbiológico.

Em paralelo com as necessidades da indústria de alimentos, na área clínica, o crescente aparecimento de bactérias multirresistentes, tolerantes aos principais antibióticos conhecidos, é considerado um grave problema de saúde pública (RAI et al., 2017), e torna ainda mais relevante a busca por novos compostos antimicrobianos. Neste sentido, muitos estudos com extratos naturais têm verificado atividade antimicrobiana sobre bactérias multirresistentes (BENBELAÏD et al., 2014; SAKKAS et al., 2016; SIENKIEWICZ et al., 2012). Além disso, diferente dos antibióticos, os extratos naturais geralmente são constituídos por um grande número de moléculas ativas, que apresentam mecanismos de ação e alvos celulares distintos dificultando a aquisição de resistência bacteriana (BURT; REINDERS, 2003).

A capacidade antimicrobiana dos extratos vegetais se deve às características das plantas de desencadearem mecanismos naturais de defesa frente às condições adversas, como variações climáticas, ataques de micro-organismos e animais superiores, sintetizando através de seu metabolismo secundário, moléculas biologicamente ativas como terpenos, ésteres fenólicos, ácidos aromáticos e alifáticos, entre outros (BURT, 2004). Dentre os extratos naturais, com atividade antibacteriana, destacam-se os óleos essenciais (OE), misturas complexas de compostos voláteis (ASBAHANI et al., 2015), que podem apresentar mais de 60 componentes individuais bioativos (BURT, 2004). Quimicamente, os OE são compostos majoritariamente por terpenos (BAKKALI et al., 2008).

Além de sua origem natural e de, geralmente, serem extraídos de plantas comestíveis, os OE se destacam pelo processo de extração (hidrodestilação) que não envolve solventes orgânicos (ASBAHANI et al., 2015). Devido a esses fatores, muitos são reconhecidos como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos (CALO et al., 2015a), sendo aprovados como aditivos alimentares (BURT, 2004). Com relação à segurança de sua aplicação em alimentos, cabe salientar que vários OE já são utilizados há muito tempo como aromatizantes (ASBAHANI et al., 2015).

Estudos recentes têm demonstrado efeitos antimicrobianos satisfatórios ao aplicar OE em meio a matrizes alimentares, comprovando sua capacidade de atuar como antibacteriano em um sistema real (DANNENBERG et al., 2016; GUO et al., 2017; LOU et al., 2017). No entanto, o uso direto de OE em alimentos apresenta alguns problemas que comprometem a sua aplicação tecnológica como bioconservantes. Geralmente, são relatadas necessidades de maiores concentrações de OE para promover os efeitos antimicrobianos *in situ* do que as verificadas *in vitro* (BURT, 2004; DANNENBERG et al., 2016). Os compostos bioativos presentes nos OE, são altamente instáveis quando submetidos a condições ambientais adversas, como o tratamento térmico (PENG et al., 2013), presença de oxigênio e luz, assim como aos componentes dos alimentos que podem se ligar a estas moléculas anulando sua possível ação (ASSIS et al., 2012). A necessidade de maiores concentrações de OE em meio ao alimento resulta em indesejáveis interferências nas características sensoriais (DANNENBERG et al., 2016; GHABRAIE et al., 2016).

Alguns mecanismos têm sido utilizados para proteger os sensíveis componentes dos OE, como a encapsulação que tem por objetivo isolar tais substâncias das condições ambientais, proporcionando maior estabilidade (ASSIS et al., 2012). O processo de encapsulação vem sendo bastante aplicado para substâncias antimicrobianas, tais como ácidos, sais, enzimas e bacteriocinas além dos óleos essenciais (PINTADO; FERREIRA; SOUSA, 2010; ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2010).

Além de conferir estabilidade às moléculas sensíveis, a encapsulação permite uma cinética de liberação gradual, fazendo assim com que o princípio ativo não seja

totalmente liberado em um só momento, evitando a degradação do mesmo e possibilitando a presença por um período mais prolongado (JINGOU et al., 2011).

Assim como a encapsulação, a incorporação de componentes ativos em meio a matriz polimérica de filmes confere efeitos protetores e liberação controlada. Em termos de contaminação bacteriana de alimentos, é notória a maior incidência superficial, devido à maior exposição (VONASEK; LE; NITIN, 2014). Neste sentido, mostra-se uma alternativa interessante a incorporação de OE em matrizes poliméricas de filmes, que permitem a incorporação de substâncias ativas e assim o desenvolvimento de embalagens bioativas (MARCUZZO et al., 2010).

A aplicação de filmes antibacterianos como embalagens primárias (em contato direto com o alimento) é uma alternativa interessante à aplicação direta do OE no alimento, pois além de reduzir as indesejáveis interferências sensoriais e proteger os componentes sensíveis, permite a liberação dos componentes ativos justamente na parte externa do alimento onde geralmente, ocorrem as maiores contaminações (VONASEK; LE; NITIN, 2014).

Na última década, as embalagens ativas com propriedades antimicrobianas ganharam significativo interesse tanto no campo da pesquisa científica como na indústria de alimentos (VONASEK; LE; NITIN, 2014). Estes materiais podem ser polímeros intrinsecamente antimicrobianos, como a quitosana, ou estruturas poliméricas inertes contendo em sua formulação, agentes antimicrobianos encapsulados (ROYO; FERNÁNDEZ-PAN; MATÉ, 2010).

Embora existam muitos polímeros capazes de formar filmes com boas propriedades para aplicação em alimentos, na sua grande maioria o processo de formação envolve altas temperaturas e/ou tempos de secagem prolongados, características desfavoráveis a aplicação de OE uma vez que seus compostos voláteis podem ser precocemente liberados ou mesmo degradados (FABRA; LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2016).

Dentre os materiais capazes de formar filmes, encontra-se o acetato de celulose, composto biodegradável, amorfo, não tóxico, inodoro, estável em óleos minerais, permeável a vapor de água e dependendo do grau de substituição, solúvel em acetona (CERQUEIRA et al., 2010). Devido as suas características, os filmes de acetato celulose são largamente utilizados para aplicação em alimentos, sendo utilizado para encapsular OE de alecrim, cravo, canela, orégano, noz-moscada,

manjeriço, dentre outros condimentos (COMA, 2008). O principal fator que justifica a sua aplicação para encapsular OE é a capacidade de formação em baixas temperaturas, evitando assim a volatilização ou degradação de compostos.

O mecanismo de liberação do conteúdo das cápsulas depende da natureza do agente encapsulante, podendo ocorrer por variações de temperatura ou pH, ruptura mecânica, solubilidade do meio, permeabilidade seletiva e difusão (ASSIS et al., 2012). No caso dos filmes de acetato celulose, a liberação do princípio ativo se dá em função da difusão, ocorrendo uma passagem gradual do agente encapsulado do interior do polímero até a superfície do alimento, de modo que a atividade antimicrobiana ocorra com maior intensidade onde se faz mais necessária (COMA, 2008).

Frete aos riscos da contaminação microbiana de alimentos, e a demanda por produtos mais naturais, a potencialidade apresentada pelos OE como antibacterianos naturais os qualificam como candidatos potenciais a substituição dos conservantes sintéticos. No entanto, para prospectar uma real aplicação tecnológica dos OE como bioconservantes para alimentos, faz-se necessário um maior detalhamento sobre sua atividade antimicrobiana. Para isso, é importante o rastreamento de seus resultados desde a aplicação em diferentes meios *in vitro*, até sua aplicação de fato em um alimento (*in situ*).

Para a realização deste experimento, selecionou-se como objeto de estudo o OE de pimenta rosa (OEPR) (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em função da escassa disponibilidade de estudos sobre este extrato, que contrasta com a expressiva ação antimicrobiana contra patógenos de relevância na área de alimentos apresentada em estudos anteriores (DANNENBERG, 2013; DOURADO, 2012). Outro ponto relevante da planta pimenta rosa, pensando na possibilidade de sua aplicação industrial, é a ampla distribuição da espécie no continente americano, além da facilidade de adaptação, fatores que sugerem boa disponibilidade da matéria-prima.

Além disso, a aplicação de OE como componente ativo de filmes antimicrobianos, permite disponibilizar um modo alternativo de utilização dos OE, em embalagens bioativas. Ampliando e diversificando as possibilidades e modos de aplicação industrial dos OE como bioconservantes para alimentos.

A fim de testar a potencialidade de filmes contendo OEPR como bioconservante para alimentos, idealizou-se aplicá-lo em queijo fatiado, tendo em

vista a incidência de bactérias patogênicas neste tipo de produto, em função de sua origem e do processo de fatiamento (YDE et al. 2012). Além disso, a possibilidade física de aplicar os filmes entre as fatias do produto mostra-se uma alternativa interessante para a aplicação e avaliação experimental.

Neste sentido, objetivou-se determinar a composição química, a atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação do óleo essencial de pimenta rosa (OEPR), bem como produzir filmes bioativos (antibacterianos) de acetato de celulose contendo OEPR como componente ativo.

Em suma, este trabalho apresenta-se de modo inédito e relevante para a área de ciência e tecnologia de alimentos, assim como para setor de saúde pública, pois, no que tange à ciência, esclarecerá questionamentos ainda pendentes sobre a ação do óleo essencial de pimenta brasileira. Tecnicamente, gera inovação com o desenvolvimento de um filme bioativo com OEPR e disponibiliza alternativa inovadora para o combate de patógenos de origem alimentar, atendendo a necessidades técnico-científicas atuais, na busca da bioconservação de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as características antibacterianas do óleo essencial de pimenta rosa, e utilizá-lo como componente ativo na elaboração de filmes antibacterianos para aplicação no desenvolvimento de embalagens bioconservantes para alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição química do óleo essencial de pimenta rosa;
- Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de pimenta rosa contra patógenos e deteriorantes alimentares;
- Determinar as concentrações mínimas do óleo essencial de pimenta rosa para a inibição e morte dos patógenos e deteriorantes;
- Avaliar a ação antibacteriana do óleo essencial de pimenta rosa por volatilização;
- Evidenciar a cinética da atividade antibacteriana do óleo essencial de pimenta rosa contra as bactérias;
- Detectar possíveis mecanismos de ação do óleo essencial de pimenta rosa nas células microbianas.
- Desenvolver filmes bioativos utilizando óleo essencial como componente antibacteriano;
- Testar *in vitro* em diferentes meios (sólido líquido e fase de vapor) a ação antibacteriana dos filmes bioativos;
- Avaliar *in situ* (queijo fatiado) a atividade antibacteriana de filmes com óleo essencial de pimenta rosa.

3 HIPÓTESES

- O óleo essencial de pimenta rosa apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas de relevância em alimentos.
- A atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta rosa se deve a degradação da parede celular bacteriana.
- A incorporação de óleo essencial de pimenta rosa em meio à matriz polimérica de filmes de acetato de celulose os torna ativos (antibacterianos).
- Filmes de acetato de celulose incorporados com óleo essencial de pimenta rosa atuam como embalagens ativas em queijo mozzarella fatiado, reduzindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas.

Capítulo 1 - Manuscrito 1

(Revisão da literatura)

Óleos essenciais: antibacterianos naturais contra patógenos alimentares

Manuscrito elaborado para o periódico *LWT - Food Science and Technology*

Qualis 2015 em ciência de alimentos: A1

Fator de Impacto: 2.711

ISSN: 0023-6438

Óleos essenciais: antibacterianos naturais contra patógenos alimentares

Guilherme da Silva Dannenberg¹; Wladimir Padilha da Silva¹; Ângela Maria Fiorentini^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), Universidade Federal de Pelotas (UFPeL). Campus Capão do Leão CEP 96010-900, Pelotas/RS, Brasil.

* E-mail: angefiore@gmail.com

Resumo

A contaminação bacteriana em alimentos é um grave problema de saúde pública. Seu controle na indústria de alimentos tradicionalmente envolve a utilização de conservantes sintéticos. No entanto, atualmente, grande parte do mercado consumidor tem buscado alimentos mais naturais, com redução ou mesmo sem aplicação de aditivos sintéticos. Neste cenário, os compostos naturais com atividade antibacteriana ganham espaço. Dentre eles, destacam-se os óleos essenciais (OE), extratos vegetais obtidos sem a utilização de solventes orgânicos, e constituídos por substâncias muitas vezes produzidas com o propósito de atuar como antimicrobiano no próprio organismo produtor. Com a potencialidade apresentada pelos OE para atuarem como antibacterianos em alimentos justificam-se estudos que caracterizem adequadamente a atividade antibacteriana de diferentes OE, visando uma real aplicação tecnológica destes como substitutos aos conservantes sintéticos tradicionais. Muitos estudos recentes vêm comprovando a eficácia dos OE como bioconservantes para alimentos, tanto *in vitro* como *in situ*. É notório ainda, os bons resultados verificados com a utilização de OE como componentes ativos para embalagens de alimentos. Esta revisão objetiva compilar os principais pontos relacionados aos OE, apresentando e discutindo os trabalhos mais relevantes e atuais que avaliam OE como potenciais antibacterianos para alimentos.

Palavras-chave: Óleos essenciais; atividade antimicrobiana; bioconservação; alimentos.

1. Introdução

O processo de industrialização de alimentos, historicamente surge com o propósito de conservar os alimentos por um período mais prolongado. E até os dias atuais, a conservação dos alimentos é um ponto de extrema relevância para os diversos setores da indústria de alimentos. No que tange à conservação de alimentos, a multiplicação bacteriana tem grande influência, uma vez que a presença de bactérias patogênicas representa um grande risco à saúde dos consumidores e bactérias deteriorantes implicam em grandes perdas econômicas.

O controle do desenvolvimento bacteriano em alimentos tradicionalmente envolve a aplicação de conservantes sintéticos, largamente utilizados pela indústria (CALO et al., 2015a), tais como sorbatos, nitritos, bezoatos e seus respectivos sais de sódio ou potássio, dentre outros. No entanto, o destino final da industrialização de alimentos, o consumidor, vem apresentando um perfil de consumo cada vez mais voltado aos alimentos naturais com redução ou eliminação de aditivos sintéticos (BURT, 2004). Neste sentido, as atenções voltam-se para os extratos naturais com potencial de atividade bioconservante, que possam substituir parcialmente ou completamente os conservantes sintéticos tradicionalmente empregados (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012). Além disso, a área clínica também tem impulsionado a busca por novas substâncias naturais com atividade antibacteriana, visto que o crescente aparecimento de bactérias multirresistentes, tolerantes aos principais antibióticos conhecidos, é considerado um grave problema de saúde pública (RAI et al., 2017).

A capacidade antimicrobiana dos extratos vegetais, se deve às características das plantas de desencadear mecanismos naturais de defesa frente às condições adversas, como variações climáticas, ataques de micro-organismos e animais superiores, sintetizando através de seu metabolismo secundário, moléculas biologicamente ativas como terpenos, ésteres fenólicos, ácidos aromáticos e alifáticos, entre outros (BURT, 2004). Dentre os extratos naturais com atividade antibacteriana destacam-se os óleos essenciais (OE), misturas complexas de compostos voláteis (ASBAHANI et al., 2015), que

podem apresentar mais de 60 componentes individuais bioativos (BURT, 2004).

Quimicamente, os OE são compostos majoritariamente por terpenos (BAKKALI et al., 2008). Além de sua origem natural e, de geralmente serem extraídos de plantas comestíveis, os OE se destacam pelo processo de extração que não envolve solventes orgânicos (ASBAHANI et al., 2015). Devido a esses fatores, muitos são reconhecidos como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos (CALO et al., 2015a), sendo aprovados como aditivos alimentares (BURT, 2004). Com relação à segurança de sua aplicação em alimentos, cabe salientar que vários OE já são utilizados há muito tempo como aromatizantes (ASBAHANI et al., 2015).

Estudos recentes têm avaliado a utilização de OE como bioconservantes naturais para alimentos, seja aplicando diretamente na matriz alimentícia (DANNENBERG et al., 2016) ou, indiretamente em embalagens (DANNENBERG et al., 2017), os OE têm demonstrado bom potencial para aplicação tecnológica. A aplicação direta em meio à matriz alimentar traz como desvantagem uma maior interferência nas características sensoriais (GHABRAIE et al., 2016), enquanto a aplicação em filmes/embalagens reduz tal inconveniente, além de concentrar a ação na parte externa do alimento, onde geralmente encontra-se a maior contaminação (DANNENBERG et al., 2017) e, propicia ainda uma liberação gradual dos componentes ativos ao longo do período de armazenamento, estendendo o período de ação/proteção (ASBAHANI et al., 2015).

A utilização de OE como antibacterianos tem ainda como vantagem a dificuldade de aquisição de resistência bacteriana, visto que são formados por um grande número de moléculas ativas diferentes, podem atacar diferentes alvos celulares com mecanismos de ação igualmente distintos, dificultando a capacidade da bactéria adquirir resistência (BURT, 2004).

A presente revisão tem como objetivo compilar os principais pontos relacionados aos OE. Apresentando e discutindo trabalhos relevantes e atuais que avaliam OE como potenciais antibacterianos para alimentos, fornecendo um panorama dos rumos que estas pesquisas estão seguindo, bem como, das perspectivas futuras nesta área.

2. Definições

Na literatura científica, os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências (BURT, 2004; SIMÕES et al., 2010) são descritos/definidos sob diferentes óticas. Na Fig.1, são resumidas as principais características que qualificam os OE, quanto às propriedades físicas, químicas e biológicas.

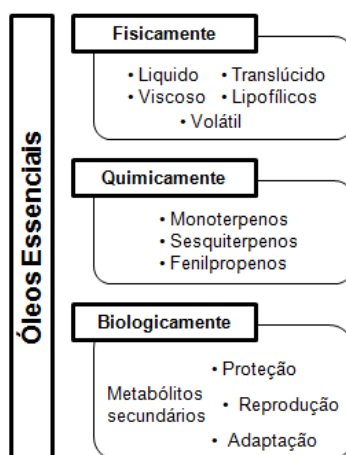


Fig. 1 - Principais características dos óleos essenciais sob a ótica da física, da química e da biologia.

Os óleos essenciais, de acordo com suas propriedades físicas, são definidos como líquidos viscosos, voláteis, lipofílicos e geralmente translúcidos (BURT, 2004). Sua classificação como óleo refere-se somente a tais propriedades físicas desta classe de compostos, não devendo ser confundidos com os lipídeos presentes nos óleos e gorduras, tradicionalmente extraídos de fontes vegetais e animais. Isto porque os constituintes dos óleos essenciais apresentam estruturas distintas dos glicerídeos, presentes em lipídeos (SIMÕES et al., 2010).

Quimicamente, embora a composição apresente grande variação entre espécies, são definidos de um modo geral, como misturas complexas de substâncias voláteis, sendo majoritariamente compostos por terpenóides de baixo peso molecular, como monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}) e fenilpropenos, variando mais expressivamente em consequência das funções

orgânicas presentes nestas cadeias, tais como alcoóis, ácidos, ésteres, cetonas, aldeídos, epóxidos, aminas e sulfatos (CALO et al., 2015b). Uma abordagem mais detalhada sobre a composição química dos OE é apresentada na sequência desta (item 4, composição química).

Biologicamente, os OE são definidos como metabólitos secundários. Uma mistura complexa de moléculas produzidas nos vegetais com o propósito de conferir funções ecológicas ao organismo produtor, tais como proteção ao ataque de pragas e micro-organismos, reprodução agindo como quimio atrativo de polinizadores e, adaptação protegendo a planta do calor ou frio (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012; BURT, 2004; PAVELA, 2015). São substâncias aromáticas geralmente, produzidas por plantas pertencentes às famílias de Angiospermas (PAVELA, 2015; RIBEIRO -SANTOS et al., 2017), podendo ser extraídas de diferentes partes, tais como flores, gemas, sementes, folhas, galhos, cascas, frutos e raízes (BURT, 2004).

Considerando o seu processo de obtenção, os OE são ainda definidos como produtos obtidos a partir de uma matéria prima natural, de origem vegetal, por destilação a vapor ou prensagem dos pericarpos de frutos cítricos, segundo a *International Standard Organization* (ISO 9235, 2013) (SIMÕES et al., 2010).

3. Aspecto Histórico

Os extratos de plantas e essências têm sido utilizados há milhares de anos para fins litúrgicos e terapêuticos. Existem registros de sua utilização em várias culturas primitivas. Os Egípcios (2800 a.C.) utilizavam várias preparações a base de plantas com diversos fins, dentre elas algumas se denominavam “óleos finos” os quais eram utilizados até mesmo no processo de mumificação. Nas culturas indiana e chinesa documentos datados de 2000 a.C. também relatam a utilização de extratos vegetais (LAWLESS, 2013). No entanto, o primeiro relato autêntico escrito da destilação de OE é atribuído a um médico catalão chamado Villanova (aproximadamente 1235 - 1311 d.C) (BURT, 2004). Já o termo “óleo essencial” remonta do século XVI e é atribuído ao médico e alquimista suíço Paracelsus von Hohenheim, que o utilizou para designar o componente ativo de uma droga a *Quinta essentia* (GUENTHER,

1948), seria a essência da planta, o quinto elemento além dos quatro que se acreditavam compor todas as coisas (terra, água, fogo e ar). No entanto, antes mesmo de sua denominação atualmente utilizada, no século XIII, as farmácias já produziam os OE e descreviam seus efeitos farmacológicos em farmacopeias (BURT, 2004). Quanto aos primeiros experimentos de atividade antibacteriana de OE acredita-se que tenham sido desenvolvidos em 1881 por De La Croix (BOYLE, 1955). O equipamento clássico de obtenção de OE por destilação de arraste a vapor, o clevenger, foi desenvolvido em 1928 e, é até hoje utilizado para a produção industrial, com algumas adaptações (PAVELA, 2015). No entanto, entre os séculos XIX e XX, com o advento de novos medicamentos, o uso medicinal dos OE tornou-se secundário, passando a ter sua principal aplicação como aromatizante e saborizante (BURT, 2004). Já nas últimas décadas, com a crescente demanda do mercado consumidor por produtos mais naturais, com redução dos aditivos sintéticos tradicionalmente aplicados (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012), a atividade antibacteriana dos OE volta a se destacar dentre suas características, sendo alvo de diversos estudos que visam sua aplicação como bioconservante para alimentos. Estudos que tratam desde sua aplicação direta no alimento (ABDOLLAHZADEH; REZAEI; HOSSEINI, 2014; DANNENBERG et al., 2016; GHABRAIE et al., 2016) até sua utilização como componente ativo para a produção de embalagens bioativas (DANNENBERG et al., 2017; KASHIRI et al., 2017; KWON; CHANG; HAN, 2017; MULLA et al., 2017).

4. Composição química

Preliminarmente, cabe destacar que embora os óleos essenciais sejam extratos vegetais líquidos, oleosos, apolares e com a denominação de óleo, estes não têm relação com os óleos fixos de composição lipídica. Inclusive, a principal característica dos óleos essenciais é a sua volatilidade, o que por si só já permite diferenciá-los dos lipídeos, que em geral são macromoléculas com maior peso molecular e elevado ponto de ebulição. Além disso, as vias metabólicas de síntese dos óleos essenciais e dos lipídeos são completamente distintas. Os lipídios derivam do metabolismo primário, enquanto os componentes dos OE são provenientes do metabolismo secundário dos

vegetais. A designação de óleo para OE se deve exclusivamente por suas características físico-químicas, visto que são líquidos e de aparência oleosa a temperatura ambiente (SIMÕES et al., 2010).

Óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis (ASBAHANI et al., 2015), podendo apresentar em um mesmo OE mais de 60 componentes individuais em sua composição (BURT, 2004). Além disso, atualmente são conhecidas aproximadamente 3.000 espécies de plantas produtoras de OE (BAKKALI et al., 2008), sendo que em cada uma delas a composição pode variar em função de fatores bióticos e abióticos (BURT, 2004). No entanto, mesmo com a grande diversidade de organismos produtores e com o elevado número de componentes que podem estar presente em um mesmo OE, os constituintes em geral são provenientes de dois grupos de origem Biosintética distintos, sendo quimicamente enquadrados como terpenos ou aromáticos (BAKKALI et al., 2008). Dentre estes dois grupos, os terpenos são a classe de moléculas mais representativa, constituindo mais de 90% da composição química dos OE (BAKKALI et al., 2008).

Os terpenos são sintetizados através da rota do ácido mevalônico. Deste precursor é formado o isopreno, molécula com 5 átomos de carbono (C5) que por sua vez representa a unidade básica (monômero) dos terpenos. A partir de ligações do tipo cauda-cabeça unidades de isopreno se unem formando as diferentes estruturas de terpenos. Dentre eles, os principais presentes nos OE são os monoterpenos, formados pela ligação de duas moléculas de isopreno (C10) e os sesquiterpenos gerados pela ligação de três moléculas de isopreno (C15). Os monoterpenos podem ser acíclicos, cíclicos ou bicíclicos, enquanto os sesquiterpenos podem ser cíclicos ou ramificados. Além disso, podem estar presentes nessas estruturas grupos orgânicos como alcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, éteres e ésteres, que conferem funções biológicas distintas às moléculas (BAKKALI et al., 2008). A figura 2 apresenta de um modo simplificado o processo de formação dos terpenos bem como as principais diferenças estruturais que podem ser encontradas.

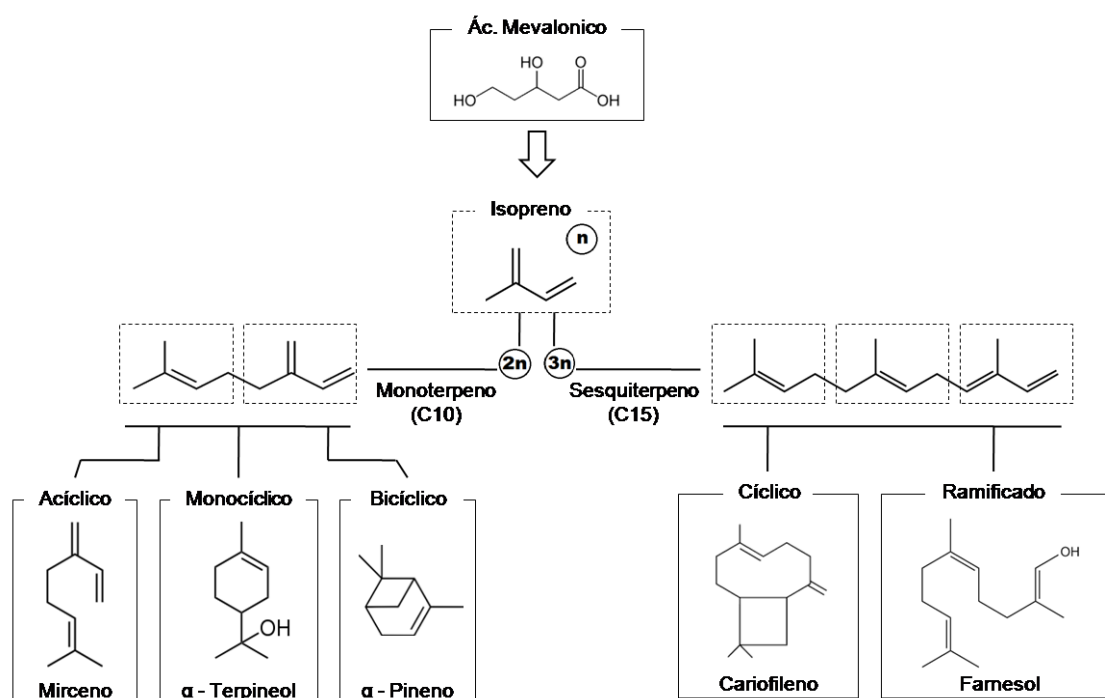


Fig. 2 - Esquema simplificado da rota de produção dos terpenos, a partir do ácido mevalônico e exemplificação dos grupos de estruturas moleculares possíveis.

Os compostos aromáticos ocorrem nos OE com frequência bastante inferior a dos terpenos. Esta classe de compostos deriva do fenilpropano e, assim como os terpenos podem apresentar diferentes funções orgânicas em sua molécula (alcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, éteres e ésteres) (PAVELA, 2015)

5. Atividade antibacteriana

O crescente aparecimento de bactérias multirresistentes, capazes de resistir aos principais antibióticos utilizados, é um grave problema de saúde pública (AUMEERUDDY-ELALFI; GURIB-FAKIM; MAHOMOODALLY, 2015). Já na indústria de alimentos, os conservantes sintéticos tradicionalmente empregados para o controle microbiano, vêm encontrando crescente rejeição por parte dos consumidores, que tem buscado alimentos mais próximos ao natural (CALO et al., 2015a). Ambos fatores, têm impulsionado nos últimos anos pesquisas com antimicrobianos naturais, dentre os quais é notória a relevância dos OE. Os componentes dos OE, em grande parte são produzidos

pelo metabolismo vegetal com o objetivo de conferir resistência ao organismo produtor contra adversidades, tais como o ataque de micro-organismos (ASBAHANI et al., 2015). Diante disso, surgiu assim a intenção de extrair compostos com tais funções biológicas e aplicá-los em sistemas diferentes, como em fármacos ou como conservantes para alimentos, por exemplo.

Com relação ao problema da resistência bacteriana, os OE apresentam uma característica bastante interessante, visto que são compostos por um grande número de moléculas ativas diferentes, podem atacar diferentes alvos celulares com mecanismos de ação igualmente distintos, dificultando a capacidade da bactéria adquirir resistência (BURT, 2004). Estudos já comprovaram a eficácia de OE frente a bactérias multirresistentes (MAYAUD et al., 2008).

Dentre os estudos que vêm sendo desenvolvidos com OE contra bactérias patogênicas, nota-se, na sua grande maioria, a maior sensibilidade das bactérias Gram positivas quando comparadas com as Gram negativas (BURT, 2004). Embora os mecanismos de ação dos OE ainda não tenham sido plenamente elucidados, tal fenômeno é explicado em função das diferenças entre as paredes celulares desses dois grupos de bactérias, em relação às características apolares dos componentes dos OE. As bactérias Gram negativas seriam mais resistentes em função de sua membrana externa, que é mais complexa e rígida (Fig. 3), enquanto a espessa camada de peptidoglicano das bactérias Gram positivas não seria suficientemente densa, para impedir a passagem de pequenas moléculas antimicrobianas (RAI et al., 2017). Além disso, a camada externa das bactérias Gram negativas é composta por uma bicamada lipídica constituída por lipopolissacarídeos (LPS), logo apresenta caráter apolar restringindo assim a passagem para o interior da célula dos componentes também apolares, como os OE. Já as bactérias Gram positivas possuem em sua parede celular moléculas de ácido lipoteicoico, com extremidades lipofílicas que facilitariam a infiltração de compostos hidrofóbicos (COX et al., 2000).

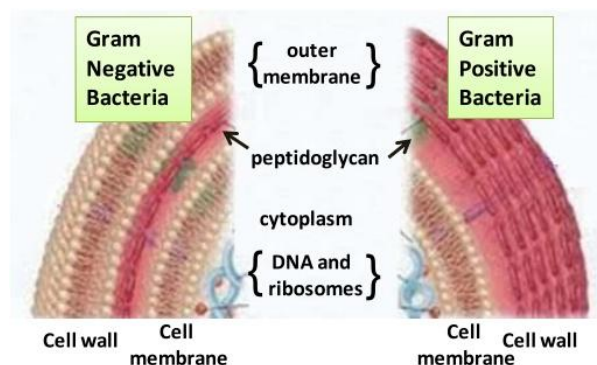


Fig. 3 - Apresentação das diferenças entre as paredes celulares de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Fonte: Nazzaro et al, 2013.

5.1 Métodos de análise

Os métodos de análise mais utilizados para determinar a atividade antibacteriana de OE normalmente classificam-se como difusão ou diluição (BURT, 2004), sendo realizados em ágar ou caldo, respectivamente. Em estudos recentes, a atividade antibacteriana de OE foi avaliada também em micro-atmosfera, verificando sua ação por volatilização (CLEMENTE et al., 2016; DANNENBERG et al., 2017; GHABRAIE et al., 2016; GOÑI et al., 2009), e *in situ* avaliando a ação antibacteriana em matrizes alimentares (DANNENBERG et al., 2016, 2017; GUO et al., 2017; LOU et al., 2017). Deste modo, os métodos de análise de atividade antibacteriana podem ser classificados em função do meio em que o OE se propaga para desempenhar a ação:

- I) Meio sólido, por difusão em ágar;
- II) Meio líquido, por dispersão em caldo;
- III) Fase de vapor, por ação em micro-atmosfera;
- IV) *in situ*, em meio a matriz alimentar.

Alguns estudos avaliam ainda a atividade antibacteriana de OE *in vivo*, administrando o OE na alimentação animal (GOIS et al., 2016). No entanto, neste caso o alimento (ração) é estudado como um veículo para o OE que irá desempenhar o efeito antibacteriano em um organismo vivo. Diferentes dos

demais meios citados que avaliam a ação do OE como antibacteriano no alimento.

5.1.1 Difusão em disco

Normalmente, os estudos de atividade antibacteriana de OE realizam inicialmente o teste de difusão em disco para determinar o espectro de ação do extrato (BURT, 2004), identificando quais bactérias são sensíveis e, para quais, são válidos estudos mais detalhados. A técnica de difusão em disco para OE é adaptada de protocolos internacionais originalmente concebidos para análise de antibióticos (CLSI, 2015a). Basicamente, culturas novas (24h de cultivo) de bactérias a serem testadas são suspensas em um diluente (normalmente água salina ou peptonada), para obter a concentração celular de 10^8 UFC/mL, utilizando como parâmetro para as suspensões bacterianas os padrões de *McFarland* ou, avaliando através da densidade ótica em espectrofotômetro ($\lambda = 625$ nm). Esta suspensão celular é inoculada na superfície de placas com ágar (normalmente ágar Muller & Hinton ou ágar Brain Heart Infusion) com o auxílio de *swabs* estéreis. Após secar o inóculo, são dispostos discos de papel filtro estéreis (geralmente com 6 mm de diâmetro) sobre a superfície do ágar, nos quais são aplicados o OE que se deseja testar (na maioria das vezes 10 μ L). Após um período de repouso, para que o OE se difunda no meio, o sistema é incubado nas condições de tempo e temperatura ideais para a bactéria avaliada (37°C / 24h na grande maioria). Após a incubação, é verificada a existência de halos de inibição ao redor dos discos, os quais indicam a sensibilidade da bactéria ao OE testado. Esses halos podem ser quantificados e expressos em função do seu diâmetro, no entanto, servem apenas para comparação entre diferentes OE, já que muitos fatores podem afetar o tamanho do halo obtido, não sendo viável a comparação entre diferentes trabalhos ou mesmo diferentes bactérias. De um modo geral, a análise de disco difusão é útil para uma verificação preliminar da atividade antibacteriana antes de estudos mais detalhados (BURT, 2004).

5.1.2 Concentração Inibitória Mínima

Geralmente, após a análise de disco difusão, as bactérias sensíveis ao OE são submetidas ao teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Existem diferentes definições para o conceito de CIM (BURT, 2004). No entanto, de um modo geral, a CIM pode ser descrita como a menor concentração de um agente antibacteriano capaz de promover a inibição da multiplicação celular (BURT, 2004; DANNENBERG et al., 2016; GHABRAIE et al., 2016). Basicamente, a análise da CIM envolve submeter uma determinada bactéria a diferentes concentrações do agente antimicrobiano, avaliando em qual concentração a multiplicação celular será inibida. Assim como a análise de difusão em disco, o teste da CIM para OE é adaptado de protocolos internacionais, originalmente concebidos para análises de antibióticos (CLSI, 2015b).

O meio mais utilizado para esta análise são caldos, seja no método de macro-diluição em tubos ou micro-diluição em placas, além de ágar na técnica de diluição em ágar (CLSI, 2015b). A concentração bacteriana mais utilizada é de 10^4 UFC/mL, obtida através de DO ($\lambda = 625$ nm) ou a partir de diluições seriadas após obtenção de uma suspensão inicial de 10^8 UFC/mL por comparação com os padrões de *McFarland*. As condições de temperatura e tempo de incubação utilizadas são as mais favoráveis ao desenvolvimento da bactéria testada. Já a detecção da inibição da multiplicação celular pode ser avaliada de diferentes modos, seja visualmente pela ausência de turbidez e/ou precipitados (BAÇZEK et al., 2017; JESUS et al., 2016), em espectrofotômetro através da variação da Densidade Ótica ($\lambda = 625$ nm) (DANNENBERG et al., 2016), ou ainda através da reação com agentes colorimétricos como a resazurina (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide sodium salt), TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride), INT (2-p-iodophenyl-3-p- nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride) e XTT (3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate) (KLAN; JER; SMOLE, 2010).

5.1.3 Concentração Bactericida Mínima

A análise de Concentração Bactericida Mínima (CBM) é realizada de modo complementar e sequencial à análise de CIM. Após a determinação da CIM, alíquotas de todas as diluições mais concentradas que a CIM (todas as diluições onde não houve multiplicação celular) são plaqueadas em ágar. O propósito de semear amostras dessas diluições é verificar em quais delas as células bacterianas foram apenas inibidas, situação na qual haverá multiplicação em um novo meio de cultivo sem o antimicrobiano e, em quais diluições as células bacterianas foram realmente mortas, onde não haverá crescimento mesmo após inoculação em um novo meio sem o antimicrobiano. A menor diluição onde não ocorre multiplicação celular após inoculação no novo meio é considerada a CBM, menor concentração do OE onde ainda ocorre o efeito bactericida (BĄCZEK et al., 2017; BASSANETTI et al., 2017; BURT, 2004; DANNENBERG et al., 2016).

5.1.4 Análises em micro-atmosfera

A análise da atividade antibacteriana de OE em micro-atmosfera, também denominada de fase de vapor, diferente das demais análises não promove um contato direto do OE com a bactéria, ou mesmo com o meio de cultura. Nesta técnica, a ação antibacteriana ocorre em função dos compostos volatilizados do OE que em fase de vapor entram em contato com a bactéria, sem a necessidade de se difundir ou se dispersar no meio de cultura (GOÑI et al., 2009). Essa peculiaridade da análise mostra-se interessante visto que o desempenho antibacteriano dos OE é afetado por sua capacidade de dispersão/difusão no meio e que tanto ágares quanto caldos são compostos por base aquosa, enquanto os OE são hidrofóbicos. Tais características propiciam que esta técnica apresente resultados completamente diferentes dos encontrados na aplicação de outros métodos de análise (GHABRAIE et al., 2016).

O método consiste basicamente em inocular as bactérias na superfície de placas contendo ágar, dispondo na tampa das placas discos estéreis de papel filtro, onde são aplicadas as concentrações de OE a serem testadas. As

placas são fechadas e invertidas (tampa para baixo) evitando o contato direto do OE com o ágar e, lacradas com filme tipo *parafilm* para evitar a perda de OE para o meio externo (GHABRAIE et al., 2016). A detecção da atividade antibacteriana pode ser expressa como percentual de redução do crescimento bacteriano, comparando nas contagens das placas com OE com as placas controles (DANNENBERG et al., 2017).

A análise em micro-atmosfera vem apresentando bons resultados em diferentes trabalhos. As inibições verificadas em fase de vapor (micro-atmosfera) para os OE de cravo e canela foram maiores que as verificadas por contato direto (ágar) contra *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *S. choleraesuis*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis* e *S. aureus* (GOÑI et al., 2009). Foram verificadas reduções de 100% do crescimento bacteriano de *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* e *Pectobacterium carotovorum* pelo efeito antibacteriano de OE de canela e mostarda, em fase de vapor (CLEMENTE et al., 2016). Ghabraie et al (2016) utilizaram a técnica de micro-diluição para avaliar a atividade antibacteriana de 32 OE contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*, verificando inibições totais para vários dos OE testados. Reduções significativas no crescimento de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium* foram verificadas ao avaliar em micro-atmosfera a ação de OE de pimenta rosa incorporado em filmes ativos de acetato de celulose (DANNENBERG et al., 2017)

Além de propiciar a verificação da atividade antibacteriana dos OE de um modo diferente, a análise em micro-atmosfera permite prospectar o potencial de aplicação tecnológico do OE por volatilização, como em sachês no interior de embalagens de alimentos, ou mesmo como componente ativo da embalagem (DANNENBERG et al., 2017). Estes modos de aplicação têm ganhado destaque visto que não necessitam de uma aplicação direta do OE com os ingredientes da formulação do alimento e, assim reduzem as indesejáveis interferências nas características sensoriais (DANNENBERG et al., 2016; GHABRAIE et al., 2016).

5.1.5 Análises *in situ*

Após as análises *in vitro* para comprovação da atividade antibacteriana (análise de disco difusão) e a quantificação das concentrações mínimas para inibir e matar a bactéria alvo (CIM e CBM), a atividade antibacteriana dos OE pode ser avaliada em sistemas alimentares reais com análises *in situ*. Este tipo de análise é importante para prospectar a aplicação de OE como antibacteriano em alimentos, uma vez que sua ação será avaliada em meio a fatores reais que poderão afetar seu desempenho (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010). Normalmente, as avaliações *in situ* envolvem aplicar o OE em alimentos experimentalmente contaminados (DANNENBERG et al., 2016, 2017; GUO et al., 2017) ou avaliam sua ação sobre bactérias nativas presentes no alimento (ALFONZO et al., 2016). Diferente dos testes *in vitro* normalmente utilizados, onde as condições de incubação (tempo e temperatura) são as mais favoráveis ao desenvolvimento da bactéria, nos testes *in situ* as condições de temperatura e tempo utilizadas são baseadas nas condições usuais de armazenamento do alimento, simulando de fato uma aplicação real do OE. Geralmente, os resultados *in situ*, demonstram que as concentrações de OE necessárias para um efeito antibacteriano satisfatório no alimento são superiores as encontradas *in vitro* (DANNENBERG et al., 2016). Possivelmente, os ingredientes dos alimentos atuam protegendo as bactérias do contato com o antibacteriano, seja por envolver a célula bacteriana (MEJLHOLM; DALGAARD, 2002) ou por reagir com o componente neutralizando-o (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010).

Dannenberg et al (2016), utilizaram queijo tipo minas frescal experimentalmente contaminado com *L. monocytogenes* para avaliar a atividade antibacteriana do OE de pimenta rosa, *in situ*. Queijo mozzarella fatiado foi utilizado como matriz alimentar para avaliação da atividade antibacteriana de filmes de acetato de celulose contendo OE de pimenta rosa contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium* (DANNENBERG et al., 2017). Carne de peixe em pedaços, foi utilizada como matriz alimentar para avaliar *in situ* a atividade antibacteriana de OE de tomilho contra *L. monocytogenes* (ABDOLLAHZADEH; REZAEI; HOSSEINI, 2014). Guo et al (2017), utilizaram sopa de carne de porco para avaliar a atividade

antibacteriana de OE de *Amomum tsaoko* (erva popular chinesa) contra *E. coli*. Sardinha salgada foi utilizada como matriz alimentar para avaliar a atividade antibacteriana de OE de limão nas contagens de bactérias aeróbias mesófilas, lácticas, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococaceae* e bactérias *Archaea* extremamente halofílicas (ALFONZO et al., 2016). Amostras de tofu foram utilizadas para avaliar a atividade antibacteriana do OE de *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Popularmente chamada na China de cidra da mão de Buda) contra *S. aureus* (LOU et al., 2017).

5.2 Mecanismo de ação

A atividade antibacteriana de OE é conhecida e estudada há muito tempo, no entanto, os mecanismos pelos quais desempenham esta ação ainda não são completamente conhecidos (CALO et al., 2015a). A dificuldade em descrever um mecanismo de ação específico para os OE se dá em função da sua complexa composição química, onde estão presentes um grande número de moléculas ativas com estruturas distintas (BURT, 2004). Embora os OE, normalmente apresentem alguns compostos majoritários, que podem representar até 85% de sua composição (RIBEIRO -SANTOS et al., 2017), ainda assim seu mecanismo de ação não pode ser descrito estritamente em função dos mesmos. É conhecido que o efeito sinérgico dos componentes minoritários representa acréscimos expressivos na atividade antibacteriana quando comparados com a ação individual dos componentes majoritários (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012). Além disso, acredita-se que a ação antibacteriana dos OE aconteça em decorrência do ataque a diferentes alvos celulares (BURT, 2004), reforçando a hipótese de uma ação conjunta/sinérgica dos diferentes constituintes. Deste modo, a atividade antibacteriana dos OE não deve ser descrita estritamente em função de componentes individuais.

Embora os OE sejam constituídos por um grande número de moléculas ativas diferentes, uma característica comum a todas elas é a hidrofobicidade (ASBAHANI et al., 2015). Devido à afinidade de polaridades, acredita-se que os principais alvos celulares dos OE sejam os fosfolipídios presentes na membrana citoplasmática (BURT, 2004). A afinidade dos componentes apolares dos OE com os compostos lipídicos da membrana celular bacteriana

facilitaria sua difusão em meio à estrutura da membrana. Sua acumulação perturba a integridade da membrana celular alterando sua densidade e consequentemente sua permeabilidade, fazendo com que componentes celulares vitais sejam gradativamente perdidos para o meio externo (RAI et al., 2017). Evidências de danos a membrana citoplasmática bacteriana pela ação de OE tem sido relatados. Diao et al (2014) constataram aumento na condutividade elétrica do sobrenadante de células de *Shigella dysenteriae* tratadas com OE de sementes de funcho, indicando o extravasamento de eletrólitos do interior das células para o meio externo, o que infere um aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, além disso, foi verificada a liberação de macromoléculas como açúcares, proteínas e ácido nucléicos (substâncias absorventes a 260 nm), indicando um dano ainda maior à membrana citoplasmática. Em outro estudo, células de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* submetidas ao OE de frutos de *Cudrania tricuspidata* apresentaram perda de íons potássio (K^+), ATP e ácido nucléicos (substâncias absorventes a 260 nm) (BAJPAI; SHARMA; BAEK, 2013). Alguns estudos têm demonstrado visualmente este fenômeno, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), visualizando poros e deformações nas células bacterianas tratadas com OE (AL-REZA et al., 2010; DIAO et al., 2014). Uma baixa quantidade de fuga dos componentes intracelulares é tolerável e não afeta a viabilidade das bactérias, no entanto, um aumento desse extravasamento torna-se crítico a ponto de causar a morte celular (BURT, 2004).

Ainda com relação à ação dos componentes dos OE na membrana citoplasmática, além de aumentar a permeabilidade promovendo o extravasamento de eletrólitos e macromoléculas essenciais, a presença de hidrocarbonetos entre a bicamada fosfolipídica da membrana pode gerar alterações estruturais que perturbem os transportes transmembranares, de modo a impedir a secreção de toxinas, resultando em um acúmulo prejudicial destes componentes no interior da célula (RAI et al., 2017).

Mesmo que o ataque à membrana citoplasmática bacteriana seja um mecanismo que pode ser descrito para a totalidade dos componentes dos OE, em virtude de sua hidrofobicidade, outros mecanismos e alvos são descritos pela literatura. Alterações na força próton motriz, no fluxo de elétrons, no transporte ativo, inibição da produção de energia (ATP) e a coagulação do

conteúdo citoplasmático são outras formas de perturbação ao funcionamento normal das células bacterianas, causados pela ação de OE, que podem isoladamente e/ou em conjunto causar a inibição e morte da bactéria (BURT, 2004; RAI et al., 2017). De modo geral, o mecanismo de ação dos OE poderia ser descrito como uma cascata de reações que ocorrem em toda a célula bacteriana (MACWAN et al., 2016).

Embora a complexa composição química dos OE dificulte uma compreensão mais clara do seu mecanismo de ação, essa mesma complexidade traz pontos positivos em termos de segurança microbiológica. Como o elevado número de moléculas ativas diferentes presentes nos OE podem atacar alvos celulares igualmente distintos, o processo de aquisição de resistência bacteriana é dificultado (BURT, 2004), característica importante no preocupante cenário atual, onde cresce o número de bactérias resistentes aos principais antibióticos de uso clínico (RAI et al., 2017).

6. Aplicação em alimentos

Os OE, especialmente devido às propriedades aromáticas que possuem, são utilizados para muitos fins, tais como em perfumarias, cosméticos, detergentes, fármacos, na química fina e em produtos alimentares (PAVELA, 2015). Em alimentos, são quase que exclusivamente aplicados como aromatizantes naturais devido suas propriedades sensoriais (BURT, 2004). Por serem extraídos, geralmente, de plantas comestíveis através de um processo de extração que não envolve solventes orgânicos, muitos OE são reconhecidos como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), sendo assim aprovada sua aplicação em alimentos (CALO et al., 2015a). Além disso, estudos indicam que OE de plantas selecionadas são seguros e em geral, apresentam baixa ou nenhuma toxicidade (RAI et al., 2017).

A crescente demanda mercadológica por produtos mais naturais vem gerando interesse comercial na utilização de OE não apenas, como aromatizantes, mas fazendo uso de outras propriedades que lhes são atribuídas, tais como a atividade antimicrobiana, permitindo assim substituir conservantes sintéticos atendendo à demanda do mercado. Alguns

conservantes alimentares contendo OE já estão comercialmente disponíveis, na Espanha o “DMC base natural” (DOMCA S.A.) é composto por 50% de OE (alecrim, sálvia e citros) e 50% de glicerol (BURT, 2004).

Nas últimas décadas, muitos estudos foram desenvolvidos buscando avaliar a ação bioconservante de diferentes OE em sistemas alimentares. O OE de pimenta rosa foi testado com sucesso como antibacteriano, contra *L. monocytogenes* e antioxidante natural adicionado diretamente entre os ingredientes de queijo tipo minas frescal (DANNENBERG et al., 2016). Óleos essenciais de canela, orégano e tomilho adicionados a uma marinada mostraram-se efetivos na redução da microbiota contaminante em amostras de carne de peixes (VAN HAUTE et al., 2016). A utilização de OE de orégano em amostras de carne de frango fresca mostrou-se capaz de prolongar a vida útil deste produto (CHOULIARA et al., 2007). Amostras de peixe em pedaços, experimentalmente contaminadas com *L. monocytogenes* foram tratadas com OE de tomilho verificando-se significativa redução do patógeno (ABDOLLAHZADEH; REZAEI; HOSSEINI, 2014)

O caráter aromático intrínseco dos OE é um fator que restringe bastante a ampliação de sua aplicação tecnológica na indústria de alimentos, uma vez que sua incorporação em meio à matriz alimentar promove interferências sensoriais muitas vezes indesejadas (GHABRAIE et al., 2016). Atualmente, trabalhos vêm sendo desenvolvidos visando reduzir e/ou eliminar a interferência sensorial dos OE, através de aplicações indiretas, como por exemplo, em filmes, embalagens, sachês e cápsulas.

Dannenberg et al (2017) desenvolveram filmes de acetato de celulose incorporados com OE de pimenta rosa (2, 4 e 6%) e obtiveram reduções significativas *in vitro* e *in situ* (queijo mozzarella fatiado) nas contagens de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium*. Filmes de PVA (Acetato de polivinila) contendo 2 e 3% de OE de orégano, reduziram significativamente as contagens de células viáveis de *Salmonella enterica* em tomates cereja, durante 7 dias de armazenamento em atmosfera fechada (KWON; CHANG; HAN, 2017). Filmes de zeína contendo 10% de OE de Tomilho de Shirazi, utilizados como revestimento para embalagens de PP (polipropileno), mostrou-se efetivo na redução das contagens de *L. monocytogenes* e *E. coli*, em leite (KASHIRI et al., 2017). Óleo essencial de alho adicionado a filmes de

Polietileno linear de baixa densidade eliminou os patógenos *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* em amostras de frango armazenadas por 21 dias a 4 °C (MULLA et al., 2017). Filmes de mistura de amido de mandioca e quitosana incorporados com OE de Laranjinha do mato (1,25 %) aplicados em mangaba, reduziram em 3 Log.UFC⁻¹ as contagens de bactérias aeróbias mesófilas e de bolores e leveduras (microbiota nativa) até o 12º dia de armazenamento a 10 °C, além de eliminar *B. cereus* intencionalmente inoculado (FRAZÃO; BLANK; SANTANA, 2017). Embalagens de polietileno pulverizadas com OE de alecrim reduziram significativamente as contagens de bactérias psicotróficas viáveis totais, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* e Enterobacteriaceae, em carne bovina fatiada armazenada a 20 e a 4 °C (SIROCCHI et al., 2017).

7 Perspectivas

Um dos fatores que limitam a aplicação de OE como bioconservantes na indústria de alimentos, é a instabilidade de seus componentes, que são voláteis e bastante reativos (PENG et al., 2013). Neste sentido, técnicas de encapsulação mostram-se promissoras para promover uma maior estabilidade dos compostos ativos (ASBAHANI et al., 2015). Além disso, a encapsulação mostra-se interessante por promover a liberação gradual do agente encapsulado, possibilitando a presença do agente antibacteriano por um período mais prolongado (Ribeiro-Santos et al., 2017). Deste modo, a aplicação e investigação de OE encapsulados mostra-se uma área promissora para a pesquisa científica e, posteriormente para a aplicação industrial.

Outro fator importante, que também restringe a aplicação industrial de OE em alimentos, são as necessidades de maiores concentrações dos OE quando aplicados em alimentos do que as verificadas *in vitro* para promover a ação antibacteriana (BURT, 2004; MACWAN et al., 2016). A necessidade de maiores concentrações de OE geralmente implicam em indesejáveis interferências nas propriedades sensoriais dos alimentos (DA SILVEIRA et al., 2014; LU; JOERGER; WU, 2014). Neste sentido, a incorporação de OE em meio a matrizes poliméricas para a produção de filmes, mostra-se outra alternativa promissora para a bioconservação de alimentos através de embalagens bioativas. Os filmes com capacidade antibacteriana são

interessantes, pois, além de atuar encapsulando o OE e aumentando assim sua estabilidade, propiciam uma aplicação indireta (não adicionado em meio à composição do alimento) o que reduz as interferências sensoriais (ASBAHANI et al., 2015). Além disso, com a utilização de embalagens primárias antibacterianas a ação concentra-se na parte externa do alimento, justamente onde encontram-se os maiores riscos de contaminação (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; COMA, 2008).

Outro ponto relevante a ser considerado com mais frequência em estudos futuros, são os aspectos de segurança toxicológica. Muitos estudos com OE baseiam-se em aspectos de segurança pré-creditados a eles, tais como serem derivados de matérias-primas alimentares, não utilizarem solventes orgânicos em sua extração, serem considerados como GRAS, e já serem aplicados como aromatizantes (BURT, 2004). No entanto, a inclusão de análises toxicológicas aos estudos com OE que se mostram bons bioconservantes contra patógenos alimentares, é importante para impulsionar sua aceitação e aplicação industrial, demonstrando garantias de que as concentrações de OE necessárias para promover o efeito desejado no alimento são seguras para o consumo humano (Ribeiro-Santos et al., 2017).

Além da aplicação direta dos OE em alimentos ou embalagens, outra possibilidade de aplicação digna de ênfase nas investigações, é a sua utilização como sanitizante industrial. Além de demonstrarem boa atividade antibacteriana contra patógenos de relevância em alimentos, muitos OE têm demonstrado atividade contra a formação de biofilmes bacterianos (DOS SANTOS RODRIGUES et al., 2016; RAFFAELLA et al., 2017; TOFIÑO-RIVERA et al., 2016), que são um grande problema de contaminação nas plantas de processamento de alimentos (CHARLEBOIS et al., 2017). Neste sentido, as propriedades de biodegradabilidade dos OE também ganham maior importância de investigação, servindo como mais uma característica favorável a sua aplicação como sanitizante ecologicamente correto.

8. Conclusão

Frente à crescente demanda mercadológica por produtos naturais, os OE se apresentam como potenciais substitutos para os tradicionais conservantes sintéticos, largamente utilizados pela indústria de alimentos. Ao longo dos últimos anos, muitas pesquisas foram desenvolvidas comprovando a eficácia de diferentes OE contra muitas bactérias patogênicas e deteriorantes de relevância em alimentos. Estudos estes, realizados tanto *in vitro* como *in situ*. Os OE por conterem em sua composição química muitas moléculas ativas diferentes, normalmente, apresentam um amplo espectro de ação, além de mecanismos de ação variados, característica que dificulta a aquisição de resistência bacteriana. A ampliação de sua aplicação tecnológica é restringida devido a fatores como interferência nas características sensoriais e a instabilidade de seus componentes. Neste sentido, os estudos mais recentes têm utilizado matrizes poliméricas para encapsular OE, produzindo cápsulas ou filmes ativos. A encapsulação confere maior estabilidade aos OE, permite uma liberação prolongada e aplicação indireta ao alimento na forma de embalagens ativas, atuando nas partes periféricas onde as contaminações são maiores e, diminuindo as interferências sensoriais.

9. Referências

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1), 177–183. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.004>
- Al-Reza, S. M., Rahman, A., Lee, J., & Kang, S. C. (2010). Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens. *Food Chemistry*, 119(3), 981–986. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.059>
- Alfonzo, A., Martorana, A., Guarrasi, V., Barbera, M., Gaglio, R., Santulli, A., ... Francesca, N. (2016). Effect of the lemon essential oils on the safety and sensory quality of salted sardines (*Sardina pilchardus Walbaum*

- 1792). *Food Control*, 73, 1265–1274.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.046>
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 113–126.
- Asbahani, a El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., ... Elaissari, a. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1–2), 220–243.
<http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Aumeeruddy-elalfi, Z., Gurib-fakim, A., & Mahomoodally, F. (2015). Antimicrobial , antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. *Industrial Crops & Products*, 71, 197–204.
<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.058>
- Bączek, K. B., Kosakowska, O., Przybył, J. L., Pióro-Jabrucka, E., Costa, R., Mondello, L., ... Węglarz, Z. (2017). Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *Industrial Crops and Products*, 102, 154–163. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.009>
- Bajpai, V. K., Baek, K.-H., & Kang, S. C. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45(2), 722–734. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.052>
- Bajpai, V. K., Sharma, A., & Baek, K. (2013). Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil , affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control*, 32(2), 582–590. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.032>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bassanetti, I., Carcelli, M., Buschini, A., Montalbano, S., Leonardi, G., Pelagatti, P., ... Rogolino, D. (2017). Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. *Food Control*, 73, 606–612.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.010>
- Boyle, W. (1955). Spices and essential oils as preservatives. *The American*

Perfumer and Essential Oil Review, 66, 25–28.

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. a., & Ricke, S. C. (2015a). Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems— A Review. *Food Control*, 54, 111–119. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015b). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54, 111–119. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Charlebois, A., Jacques, M., Boulianne, M., & Archambault, M. (2017). Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry. *Food Microbiology*, 62, 32–38.
<http://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.009>
- Chouliara, E., Karatapanis, A., Savva, I. N., & Kontominas, M. G. (2007). Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. *Food Microbiology*, 24(6), 607–617.
<http://doi.org/10.1016/j.fm.2006.12.005>
- Clemente, I., Aznar, M., Silva, F., & Nerín, C. (2016). Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36, 26–33.
<http://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.013>
- CLSI. (2015a). M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. *CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)*, 35(1).
- CLSI. (2015b). M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. *CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)*, 35(2).
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78, 90–103.
<http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.035>

- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170–175. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x>
- Da Silveira, S. M., Luciano, F. B., Fronza, N., Cunha, A., Scheuermann, G. N., & Vieira, C. R. W. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 86–93. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.032>
- Dannenbergh, G. da S., Funck, G. D., Cruxen, C. E. dos S., Marques, J. de L., Silva, W. P. da, & Fiorentini, Â. M. (2017). Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: potential for application as active packaging for sliced cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 81, 314–318. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.002>
- Dannenbergh, G. da S., Funck, G. D., Mattei, F. J., Silva, W. P. da, & Fiorentini, Â. M. (2016). Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Food Science and Emerging Technologies*, 36, 120–127. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.009>
- Diao, W., Hu, Q., Zhang, H., & Xu, J. (2014). Chemical composition , antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control*, 35(1), 109–116. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.056>
- dos Santos Rodrigues, J. B., de Carvalho, R. J., de Souza, N. T., de Sousa Oliveira, K., Franco, O. L., Schaffner, D., ... Magnani, M. (2016). Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. *Food Control*. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.043>
- Frazão, G. G. S., Blank, A. F., & Santana, L. C. de A. (2017). LWT - Food Science and Technology Optimisation of edible chitosan coatings

- formulations incorporating *Myrcia ovata* Cambessedes essential oil with antimicrobial potential against foodborne bacteria and natural micro flora of mangaba fruits es Santos Fraz. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.011>
- Ghabraie, M., Vu, K. D., Tata, L., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 332–339. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.055>
- Gois, F. D., Cairo, P. L. G., Cantarelli, V. de S., Costa, L. C. do B., Fontana, R., Allaman, I. B., ... Costa, L. B. (2016). Effect of Brazilian red pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance , diarrhea and gut health of weanling pigs. *Livestock Science*, 183, 24–27. <http://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.11.009>
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982–989. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.058>
- Guenther, E. (1948). *The essential oils*. New York. <http://doi.org/doi.org/10.1002/jps.3030370518>
- Guo, N., Zang, Y.-P., Cui, Q., Gai, Q.-Y., Jiao, J., Wang, W., ... Fu, Y.-J. (2017). The preservative potential of Amomum tsaoko essential oil against *E. coli*, its antibacterial property and mode of action. *Food Control*, 75, 236–245. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.013>
- IOS. (2013). Aromatic natural raw materials - vocabulary. *International Standard Organization (IOS 9235:2013)*, 14.
- Jesus, I. C. de, Frazão, G. G. S., Blank, A. F., & Santana, L. C. L. de A. (2016). *Myrcia ovata* Cambessedes essential oils: A proposal for a novel natural antimicrobial against foodborne bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 99, 142–147. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.023>
- Kashiri, M., Cerisuelo, J. P., Domínguez, I., López-carballo, G., Muriel-gallet, V., Gavara, R., & Hernández-muñoz, P. (2017). *Zein films and coatings as carriers and release systems of Zataria multiflora* Boiss. essential oil for

- antimicrobial food packaging*. *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd.
<http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.02.021>
- Klan, A., Jer, B., & Smole, S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts, 81, 121–126. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
- Kwon, S., Chang, Y., & Han, J. (2017). Oregano essential oil-based natural antimicrobial packaging film to inactivate *Salmonella enterica* and yeasts / molds in the atmosphere surrounding cherry tomatoes. *Food Microbiology*, 65, 114–121. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.004>
- Lawless, J. (2013). *The encyclopedia of essential oils - The complete guide to use of aromatic oils in aromatherapy, herbalism, health & well-being*. (C. Press, Ed.). San Francisco.
- Lou, Z., Chen, J., Yu, F., Wang, H., Kou, X., Ma, C., & Zhu, S. (2017). The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. *LWT - Food Science and Technology*, 80, 371–377. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.037>
- Lu, Y., Joerger, R., & Wu, C. (2014). Similar Reduction of *Salmonella enterica* Typhimurium on Grape Tomatoes and Its Cross-Contamination in Wash Water by Washing with Natural Antimicrobials as Compared with Chlorine Treatment. *Food and Bioprocess Technology*, 7(3), 661–670. <http://doi.org/10.1007/s11947-013-1105-9>
- Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Aparnathi, K. D., & Prajapati, J. B. (2016). Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity and Application in Preservation of Food. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(5), 885–901. <http://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.505.092>
- Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., & Aubert, G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics, 47, 167–173. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02406.x>
- Mejlholm, O., & Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34(1), 27–31.

- Mulla, M., Ahmed, J., Al-attar, H., Castro-aguirre, E., Ali, Y., & Auras, R. (2017). Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging. *Food Control*, 73, 663–671. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.018>
- Pavela, R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 174–187. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050>
- Peng, L., Sheu, M., Lin, L., Wu, C., Chiang, H., Lin, W., ... Chen, H. (2013). Effect of heat treatments on the essential oils of kumquat (*Fortunella margarita*). *Food Chemistry*, 136(2), 532–537. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.014>
- Raffaella, C., Casettari, L., Fagioli, L., Cespi, M., Bonacucina, G., & Baffone, W. (2017). Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 132–140. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.021>
- Rai, M., Paralikar, P., Jogee, P., Agarkar, G., Ingle, A. P., Derita, M., & Zacchino, S. (2017). Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, 519(1–2), 67–78. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.013>
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5), 614–9. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.06.010>
- Ribeiro -Santos, R., Andrade, M., Melo, N. R. de, & Sanches- Silva, A. (2017). Use of essential oils in active food packaging: recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 132–140. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.021>
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Melo, J. C. P. de, Mentz, L. A., & Petrovick, P. ros. (2010). *Farmacognosia - da planta ao medicamento* (6^a edição). Porto Alegre / RS.
- Sirocchi, V., Devlieghere, F., Peelman, N., Sagratini, G., Maggi, F., Vittori, S., &

- Ragaert, P. (2017). Effect of *Rosmarinus officinalis* L . essential oil combined with different packaging conditions to extend the shelf life of refrigerated beef meat. *Food Chemistry*, 221, 1069–1076. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.054>
- Tofiño-Rivera, A., Ortega-Cuadros, M., Pareja, D. G.-, Jiménez-Rios, H., Merini, L. J., & Martínez-Pabón, M. C. (2016). Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 749–754. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.044>
- Van Haute, S., Raes, K., Van der Meeren, P., & Sampers, I. (2016). The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. *Food Control*, 68, 30–39. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.025>

Capítulo 2 - Manuscrito 2

Óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Composição química, atividade antimicrobiana e mecanismo de ação

Manuscrito para submissão ao periódico *Industrial Crops and Products*

Qualis 2015 em ciência de alimentos: A1

Fator de Impacto: 3.449

ISSN: 0926-6690

Óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Composição química, atividade antimicrobiana e mecanismo de ação

Guilherme da Silva Dannenberg¹; Graciele Daiana Funck¹; Wladimir Padilha da Silva¹; Ângela Maria Fiorentini^{1*}.

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA); Pelotas / RS / Brasil, CEP: 96010-900.

*e-mail: angefiore@gmail.com

Resumo

Óleos essenciais conferem proteção aos vegetais, e devido sua origem natural, existe grande interesse na sua utilização como antimicrobianos. Neste trabalho, objetivou-se determinar a composição química, a atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação do óleo essencial de pimenta rosa (OEPR), contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Através da análise cromatográfica (CG/MS) detectou-se 18 compostos, 4 monoterpenos e 14 sesquiterpenos, dos quais β -mirceno (41%), β -cuvebeno (12%) e Limoneno (9%) foram os majoritários. Na atividade antimicrobiana por difusão em ágar e caldo, verificou-se ação contra três bactérias Gram positivas e duas Gram negativas. Com relação a *S. aureus* e *L. monocytogenes*, a concentração inibitória mínima foi 0.68 e 1.36 mg/mL, respectivamente. A concentração bactericida mínima (CBM) foi de 2.72 mg/mL para ambas. No ensaio de difusão em micro-atmosfera o OEPR reduziu em até 16 e 15% o desenvolvimento das bactérias Gram negativas *E. coli* e *S. Typhimurium*, respectivamente. O tempo de contato necessário para a CBM agir efetivamente nas bactérias Gram positivas foi inferior ao período de 12h, e bactérias Gram negativas não foram inibidas, mas tiveram seu crescimento significativamente reduzido pela ação do OEPR. Além disso, foram verificadas alterações na permeabilidade e integridade da membrana citoplasmática de todas as bactérias avaliadas, indicando que ao menos um dos mecanismos de ação deste OE está relacionado a distúrbios na membrana celular das bactérias.

Palavras-chave: Antimicrobiano natural; atividade antibacteriana; cinética de ação; Cromatografia gasosa; bactérias patogênicas.

1. Introdução

A contaminação microbiana é um problema de saúde pública bastante conhecido, no entanto, os compostos sintéticos tradicionalmente utilizados no seu controle vêm tendo sua eficácia e aceitação comprometida. Por exemplo, na área clínica, muitas bactérias apresentam a capacidade de adquirir resistência quando submetidas a doses subletais de antibióticos (CALO et al., 2015b), o que se torna ainda mais crítico mediante o crescente aparecimento de bactérias multirresistentes (AUMEERUDDY-ELALFI; GURIB-FAKIM; MAHOMOODALLY, 2015). Já na indústria de alimentos, os conservantes sintéticos tradicionalmente empregados para o controle microbiano, têm encontrado crescente rejeição por parte dos consumidores, que buscam alimentos mais próximos ao natural (CALO et al., 2015b). Neste cenário, a busca por novas substâncias com atividade antimicrobiana, em especial as naturais, surge como uma alternativa em potencial.

Óleos essenciais (OE) são extratos de origem vegetal, constituídos por substâncias bioativas sintetizadas para conferir resistência ao organismo produtor contra adversidades, tais como o ataque de micro-organismos (ASBAHANI et al., 2015). Tendo em vista a função biológica para a qual estas moléculas são originalmente produzidas, existe a possibilidade de aplicação de OE em sistemas diferentes, visando obter efeitos similares ao que os compostos desempenham na planta.

A pimenta rosa, fruto da anacardiácea *Schinus terebinthifolius* Raddi, é muito utilizada na medicina popular para o combate de infecções (ULIANA et al., 2016), porém, apenas recentemente pesquisas científicas com relação ao potencial do OE vêm sendo realizadas. A ação antimicrobiana já foi verificada *in vitro* (ULIANA et al., 2016), *in situ* (DANNENBERG et al., 2016), *in vivo* (GOIS et al., 2016) e, como componente ativo em filmes antibacterianos (DANNENBERG et al., 2017). No entanto, o mecanismo de ação deste OE ainda não foi elucidado, e assim, o detalhamento de sua atividade antimicrobiana mostra-se necessário, para prospectar futuras aplicações tecnológicas.

Diante da necessidade de descoberta de novos antimicrobianos, e, da potencialidade apresentada pela pimenta rosa para tal fim, este trabalho objetiva determinar a composição química, a atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação do OEPR, contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, apresentando este extrato como um possível substituto aos antimicrobianos tradicionais.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal

Foram utilizados frutos maduros (coloração vermelha) coletados em março de 2015 de árvores adultas situadas no Campus da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) na cidade de Capão do Leão/RS, latitude 31°48'0459" e longitude 52°24'5532", botanicamente identificadas como *Schinus terebinthifolius* Raddi por similaridade com o exemplar registrado sob número 25.131 no herbário do Departamento de Botânica/UFPel, RS, Brasil.

2.2. Extração do óleo essencial

O OE foi extraído pelo processo de hidrodestilação em cleverger, e desidratado mediante filtração com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄ - SYNTH[®]), como descrito por Dannenberg et al. (2016).

2.3. Bactérias avaliadas

Foram utilizadas sete bactérias, sendo três bactérias Gram positivas: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 11778, e quatro Gram negativas: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442.

2.4. Composição química do OEPR

A determinação da composição química do OEPR foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado ao detector de massas (GC/MS - QP 2010SE - Shimadzu®), equipado com uma coluna capilar RTX-5MS (Restek®) (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). O detector seletivo de massas operou no modo de ionização por impacto de elétrons (IE) com um intervalo de varredura de massa de 40 a 700 m/z a 70 eV. Foi utilizado Hélio como gás de arraste a um fluxo de 0,98 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 250 e 280 °C; respectivamente. A temperatura do forno foi programada partindo de 60 °C por 3 min., seguido de um aumento de 3 °C/min. até 280 °C, na qual permaneceu por 10 min. A identificação dos compostos foi baseada no espectro de massas (em comparação com a biblioteca espectral Wiley 275, 6ª edição), e as concentrações apresentadas como percentagens relativas da área de cada pico sobre a área total.

2.5. Atividade antimicrobiana

2.5.1. Atividade antimicrobiana por disco difusão

Inicialmente, a atividade antimicrobiana do OEPR foi determinada pela técnica de disco difusão (CLSI, 2015a). Culturas bacterianas foram suspensas em AP (Água Peptonada - 0,1%) obtendo a concentração de 10^8 UFC/g (0,5 *McFarland*), este inóculo foi semeado com *swabs* estéreis na superfície de placas com ágar Mueller-Hinton (MH - Oxoid®), sobre o qual foram dispostos discos de papel estéreis (Laborclin®). Adicionou-se 10 µL de OE em cada disco, esperando 1 hora para a absorção, e posteriormente incubando as placas a 37 °C. Após 24 horas verificou-se a existência de halos de inibição, quantificando os existentes com paquímetro digital.

2.5.2. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OE foi avaliada através do teste de microdiluição em placa (CLSI, 2015b). O OE foi diluído em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI-Oxoid®) adicionado de 3% de tween 80 (Vetec®), obtendo

concentrações de 100 a 0.20 mg/mL. As bactérias foram adicionadas obtendo a concentração final de 10^4 UFC/mL em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C sob agitação (100 rpm) por 24 horas, e a leitura dos resultados realizada em espectrofotômetro de placas (Robonik® Readwel plate) a 625 nm, considerando como CIM a maior diluição onde não houve crescimento celular (OJEDA-SANA et al., 2013).

Para detectar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), foram inoculadas em ágar BHI alíquotas de 10 µL, de cada poço onde houve inibição no teste da CIM. Considerando como CBM a menor concentração onde não houve crescimento neste novo meio.

2.5.3. Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera

A atividade antimicrobiana em micro-atmosfera foi avaliada pela técnica proposta por GHABRAIE et al., (2016). Alíquotas de 0,1 mL de suspensões celulares (10^3 UFC/mL) das bactérias, foram inoculadas na superfície de placas com Agar BHI (15 mL – camada de 6 mm). Na tampa de cada placa foram posicionados discos de papel estéreis nos quais foram adicionados diferentes volumes do OEPR (100, 50, 25, 12,5 µL), as placas foram imediatamente fechadas de modo invertido (tampa para baixo), e incubadas a 37 °C por 24h. A ação antimicrobiana foi expressa pelo percentual de redução na contagem celular (UFC) dos tratamentos com o OE comparados com um controle contendo água estéril. A concentração de OE foi expressa em função do volume de OE e do espaço livre na placa ($\pi \times r^2 \times h = 3,14 \times 4,5^2 \times 1,5 = 95 \text{ cm}^3$; $95 - 15 \text{ mL de ágar} = 80 \text{ cm}^3$ de espaço livre).

2.6. Mecanismo de ação

2.6.1. Cinética de ação

A cinética de ação foi realizada de acordo com DIAO et al. (2014). Concentrações de 1,36 e 2,72 mg/mL do OEPR foram aplicadas em caldo BHI adicionado de 3% de tween 80. As bactérias foram inoculadas na concentração de 10^5 UFC/g e incubação a 37 °C sob constante agitação (100 rpm). Após 0, 4, 8, 12 e

24 horas, foram feitas diluições seriadas das amostras em AP (0,1%) e inoculadas em ágar BHI. O experimento foi realizado em triplicata, e a média das contagens referentes a cada tempo foram plotadas para gerar um gráfico apresentando a cinética de ação do OEPR.

2.6.2. Permeabilidade da membrana celular

A permeabilidade da membrana celular das bactérias foi determinada pela condutividade elétrica relativa (DIAO et al., 2014). As bactérias foram ativadas em caldo BHI por 10h a 37 °C, sendo posteriormente centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min. O *pellet* foi lavado com uma solução de glicose (5%) até a condutividade elétrica ficar similar a da solução de glicose. O OE foi então adicionado em duas concentrações (1.36 e 2.72 mg/mL) e o sistema incubado a 37 °C por 8h, a condutividade elétrica após este tempo foi denominada de L2.

Em paralelo, as mesmas concentrações de OE foram adicionadas à solução de glicose (ausência de bactéria) e esta condutividade elétrica denominada de L1. O *pellet* em solução de glicose (ausência de OE) foi levado à ebulição por 5 min. e sua condutividade elétrica caracterizada como L0. A permeabilidade da membrana foi calculada com base na variação percentual (V%) da condutividade elétrica, conforme a seguinte equação: $V\% = (L2 - L1 / L0) \times 100$. As condutividades elétricas foram medidas com condutivímetro (HANNA® - HI98311).

2.6.3. Integridade da membrana celular

A integridade da membrana celular foi determinada pela detecção de componentes celulares no sobrenadante (DIAO et al., 2014). As bactérias foram cultivadas em caldo BHI (37 °C por 24h), posteriormente centrifugadas por 15 min. a 5000 rpm e lavadas por três vezes com água estéril, sendo ao final suspensas em 100 mL de solução tampão de fosfato (PBS a 0,1 M, pH 7,4). Estas suspensões foram tratadas com três concentrações de OEPR (0,00, 1,36 e 2,72 mg/mL) e incubadas por 4h a 37 °C. Na sequência, procedeu-se com a centrifugação (11000 g /5 min.), e amostras do sobrenadante foram utilizadas para análise de proteínas

(BRADFORD, 1976) e açúcares redutores (MILLER, 1959), em espectrofotômetro (Robonik® Readwel plate).

2.6.4. Extravasamento de ácidos nucléicos

Para determinar o extravasamento de ácidos nucléicos, o sobrenadante obtido conforme o item 2.5.3 foi submetido a espectrofotometria de UV a 260 nm, utilizando como controle o PBS, e as duas concentrações de OE (1,36 e 2,72 mg/mL) em PBS (Diao et al. 2014).

2.7. Análise estatística

Os resultados obtidos foram estatisticamente comparados por análise de variância (ANOVA one way analysis) utilizando o *software* STATISTICA (StatSoft, França - versão 6.1). Foi aplicado o teste de Tukey para detectar diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os valores médios ($n \geq 3$).

3. Resultados e discussão

3.1. Composição química do OEPR

A composição química do OEPR, determinada por CG/MS, está apresentada na tabela 1. Foram detectados 18 componentes, dentre os quais 4 monoterpenos, representando 60% do total de componentes, e 14 sesquiterpenos. β -mirceno (41%), β -cubebeno (12%), Limoneno (9%) e α -Pineno (8%) foram os majoritários.

Tabela 1

Composição química do óleo essencial de pimenta rosa

Pico	Compostos	Peso Molecular (g/mol)	CAS	Tempo de Retenção ^a	Área do pico (%)
Monoterpenos					
1	α -Pineno	136,23	80-56-8	4,525	7,68
2	β -Pineno	136,23	127-91-3	5,648	2,29
3	β -Mirceno	136,23	123-35-3	6,330	41,01
4	Limoneno	136,23	5989-27-5	7,402	8,90
Sesquiterpenos					
5	Copaeno	204,35	25245021 ^b	21,507	2,00
6	β -Elemeno	204,35	515-13-9	22,201	1,04
7	α -Gurjuneno	204,35	489-40-7	22,859	0,83
8	γ -Cariofileno	204,35	118-65-0	23,293	3,87
9	α -Cariofilleno	204,35	6753-98-6	24,589	0,48
10	β -Farneseno	204,35	77129-48-7	25,063	1,07
11	β -Cubebeno	204,35	13744-15-5	25,937	12,22
12	γ -muuroleno	204,35	21747-46-6	26,392	1,85
13	α -muuroleno	204,35	101708*	26,659	2,05
14	γ -Cadineno	204,35	39029-41-9	27,113	1,03
15	δ -Cadineno	204,35	483-76-1	27,654	7,67
16	D Germacreno	204,35	91104*	29,735	1,48
Sesquiterpenos oxigenados					
17	δ -Cadinol	222,37	19435-97-3	32,497	1,99
18	T-Cadinol	222,37	5937-11-1	32,934	2,55

^aTempo de retenção em minutos; ^bCID.

Dourado (2012), também relatou a presença destes compostos ao analisar frutos maduros de *S. terebinthifolius* Raddi, proveniente da mesma localização geográfica dos avaliados neste estudo. Foi identificado mirceno (48,15%) como composto majoritário, e concentrações de 5,14% de α -Pineno, 1,91% de limoneno, e 0,35% de β -cubebeno. Concentrações de 12,36% de limoneno e 10,36% de α -Pineno foram indicadas por Gois et al., (2016) em OE de frutos de *S. terebinthifolius*.

Uliana et al., (2016) relataram 6,78% de mirceno e 4,05% de α -pineno no OE de folhas desta espécie. Para Cavalcanti et al. (2015) a predominância foi de α -pinene (44,9%), β -pinene (15,1%) e germacreno D (17,6%) no OE de frutos de *S. terebinthifolius*. Já para Richter (2010) o composto majoritário foi limoneno (24%), seguido por α -phellandrene (21,1%), α -pinene (16,9%) e β -phellandrene (10,8%) em OE de frutos de *S. terebinthifolius*.

Os hidrocarbonetos monoterpênicos ou sesquiterpênicos e seus derivados oxigenados são considerados como potenciais agentes antimicrobianos por muitos estudos (BAJPAI; SHARMA; BAEK, 2013; DIAO et al., 2014). O componente majoritário do OEPR (Mirceno = 41%) é descrito na literatura como um importante componente para a atividade antimicrobiana de OE (INOUE et al., 2004). Deste modo o perfil cromatográfico encontrado neste estudo para OEPR já permite presumir seu potencial efeito antimicrobiano.

3.2. Atividade antimicrobiana

3.2.1. Disco difusão, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

No teste de disco difusão, o OEPR apresentou ação antimicrobiana contra as três bactérias Gram positivas testadas, e para duas das quatro Gram negativas. Os halos de inibição variaram entre 12,64 e 24,30 mm de diâmetro. A CIM variou de 0,68 a 5,44 mg/mL, e a CBM de 2,72 a 10,88 mg/mL (Tabela 2).

Tabela 2

Atividade antimicrobiana do OEPR por disco difusão, CIM e CBM.

Bactéria	Disco difusão (mm)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
Gram positivas			
<i>S. aureus</i>	24,30 ± 0,66 ^a	0,68 ^d	2,72 ^b
<i>L. monocytogenes</i>	23,09 ± 0,71 ^b	1,36 ^c	2,72 ^b
<i>B. cereus</i>	21,43 ± 0,42 ^c	2,72 ^b	2,72 ^b
Gram negativas			
<i>P. aeruginosa</i>	17,14 ± 0,32 ^d	5,44 ^a	10,88 ^a
<i>S. dysenteriae</i>	12,64 ± 0,46 ^e	5,44 ^a	10,88 ^a
<i>E. coli</i>	ND	ND	ND
<i>S. Typhimurium</i>	ND	ND	ND

Os valores são apresentados como médias (n = 3) ± desvio padrão; Letras diferentes em cada coluna indicam diferença significativa (P < 0.05) pelo teste de Tukey; ND = Não Detectado.

A maior sensibilidade das bactérias Gram positivas ao OEPR condiz com os resultados obtidos na grande maioria dos estudos realizados com OE em geral. E está relacionada às características estruturais das próprias bactérias, enquanto as Gram positivas possuem em sua parede celular apenas uma camada, composta majoritariamente por peptidoglicano, as Gram negativas possuem uma membrana externa extra, composta por uma camada dupla de lipopolissacarídeos (LPS) (NAZZARO; FRATIANNI; MARTINO, 2013). Esta camada densa de LPS, nas bactérias Gram negativas, seria mais resistente a passagem de pequenas moléculas antimicrobianas do que a espessa, porém menos densa, camada de peptidoglicano das bactérias Gram positivas (RAI et al., 2017). Em consequência são necessárias maiores concentrações do OE para promover a ação antimicrobiana, como verificado neste estudo para *P. aeruginosa* e *S. dysenteriae*, que foram inibidas, porém com concentrações (CIM e CBM) significativamente maiores àquelas determinadas para Gram positivas.

O OEPR extraído de frutos coletados no ano de 2012 apresentaram espectro de ação similar ao encontrado no presente estudo, com CIM de 6,82 mg/mL para *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. dysenteriae* e *P. aeruginosa*, e de 0,852 mg/mL para

B. cereus (DANNENBERG et al., 2016). ULIANA et al., (2016) não verificaram atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e *E. coli*, na maior concentração testada, 1 mg/mL (0,1%), para o OE de folhas de *S. terebinthifolius*. Também Aumeeruddy-elalfi et al., (2015) não verificaram atividade antimicrobiana do OE de *S. terebinthifolius* sobre cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*, e apontam uma CBM de 1 mg/mL (0,1%) para *S. aureus*.

A atividade antimicrobiana do OEPR pode ser atribuída aos seus componentes majoritários β -mirceno (41%), β -cubebeno (12%) e Limoneno (9%), que são reconhecidamente antibacterianos (BURT, 2004), ou ainda ao possível efeito sinérgico entre estes e com os componentes minoritários como alguns autores relatam (NGUEFACK et al., 2012). Quando avaliado isoladamente em outro estudo, o mirceno mostrou atividade antibacteriana contra *S. aureus* superior aos demais componentes majoritários igualmente testados (terpine-4-ol e γ -terpineno), evidenciando seu potencial antibacteriano, no entanto, a ação do OE integro foi superior a dos compostos testados isoladamente, reforçando a hipótese de ação conjunta/sinérgica entre os componentes dos OE (INOUE et al., 2004).

3.2.2. Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera

Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana do OEPR em micro-atmosfera estão apresentados na Fig.4.

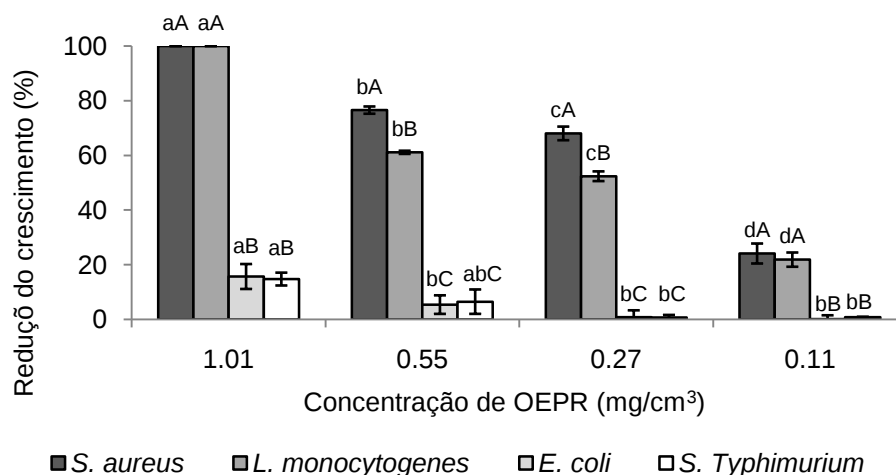


Fig. 4. Atividade antimicrobiana do OEPR em micro-atmosfera, sobre o crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Resultados expressos como médias ($n = 4$) $\pm$ desvio padrão; Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de OE para uma mesma bactéria; letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as bactérias para uma mesma concentração de OE.

A aplicação de OEPR nas concentrações de 1,01, 0,55, 0,27 e 0,11 mg/cm³ em micro-atmosfera, reduziu a contagem de células viáveis de *S. aureus* em 100, 77, 68 e 24%, e de *L. monocytogenes* em 100, 61, 52 e 22%, respectivamente. Já *E. coli* e *S. Typhimurium* apresentaram reduções de 16 e 15% em 1,01 mg/cm³, e de 5 e 6% em 0,55 mg/cm³, não apresentando reduções significativas para as duas menores concentrações testadas (0,27 e 0,11 mg/cm³).

No teste de difusão em micro-atmosfera foi verificada ação do OEPR contra bactérias Gram negativas *E. coli* e *S. Typhimurium*, o que não ocorreu nas análises anteriores por difusão em ágar e caldo. Este resultado demonstra que o meio onde o OE é aplicado influencia diretamente na sua difusão/propagação, interferindo na sua atividade antimicrobiana. Ghabraie et al. (2016) justifica que o caráter apolar dos OE dificulta sua difusão em meios com base aquosa, como ágar e caldo e, devido a isso os resultados verificados nos testes de difusão em micro-atmosfera podem ser bastante diferentes dos demais, pois nesta situação os componentes do OE entram em contato diretamente com as células microbianas, por volatilização.

A capacidade de promover atividade antimicrobiana por volatilização, sem aplicação direta, indica a possibilidade de aplicação do OEPR como antimicrobiano,

por exemplo, em sistemas como o de sachês adicionados em embalagens fechadas de alimentos, onde poderia controlar o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis como bactérias deteriorantes e patogênicas.

3.3. Mecanismo de ação

3.3.1. Cinética de ação

A determinação da cinética de ação fornece informações dinâmicas que complementam os dados estáticos obtidos nas análises de CIM e CBM, permitindo uma predição mais significativa da eficácia do componente em estudo (JIANG et al., 2011). Neste ensaio, foi verificado que a aplicação do OEPR a 2,72 mg/mL necessita de até 12h de contato para promover a completa eliminação de ambas as bactérias Gram positivas avaliadas, partindo de uma concentração celular inicial de 10^4 UFC/mL (Fig. 5 - A e B). Já para as bactérias Gram negativos, onde nos testes anteriores de CIM e CBM o OEPR não demonstrou ação bactericida ou mesmo bacteriostática, na análise de cinética de ação pode-se verificar um efeito significativo deste OE sobre o desenvolvimento destes micro-organismos (Fig. 5 - C e D). Apesar de ser um efeito mais ameno, comparado com efeitos bactericidas e bacteriostáticos, tal redução pode ser importante considerando a possibilidade de atuar sinergicamente com outros agentes/fatores antibacterianos.

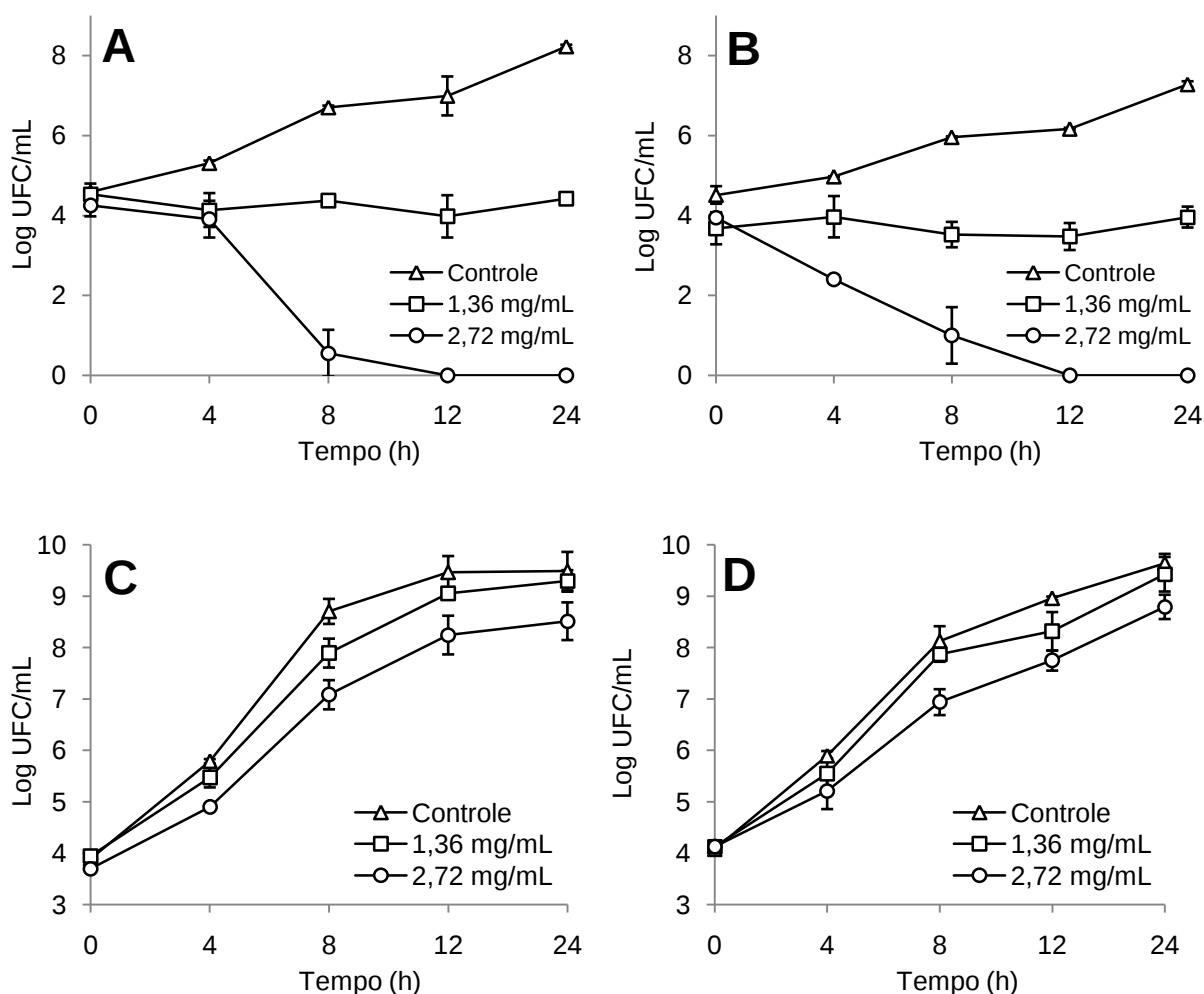


Fig. 5. Cinética de ação do OEPR em *S. aureus* (gráfico A), *L. monocytogenes* (gráfico B), *E. coli* (gráfico C) e *S. Typhimurium* (gráfico D). Resultados expressos como médias ($n = 3$) $\pm$ desvio padrão.

No tratamento controle, sem adição de OE, *S. aureus* e *L. monocytogenes* apresentaram crescimento exponencial ao longo da análise, passando de 4,6 e 4,5 para 8,2 e 7,3 Log UFC/mL, respectivamente. Já mediante a adição do OEPR, em 2,72 mg/mL, foi observado comportamento oposto, com uma redução exponencial na contagem de células viáveis das bactérias, com a eliminação total após 12h de exposição. Nos tratamentos contendo 1,36 mg/mL não foram observadas variações significativas das contagens de células viáveis ao decorrer da análise, indicando que o efeito bacteriostático da CIM se mantém por pelo menos 24h. Jiang et al., (2011) relataram a necessidade de 8h de contato entre o OE de alecrim (CBM = 0,1%) e *S.*

aureus para verificar a completa morte da bactéria e o componente majoritário (1,8 - cineole) aplicado separadamente, levou 12h.

No tratamento controle (sem OE) as bactérias *E. coli* e *S. Typhimurium* passaram das concentrações inicial de 3,9 e 4,1 Log UFC/mL para 9,5 e 9,6 Log UFC/mL após 24h, ambos aumentos de 5,6 Log UFC. Já no tratamento T2 (2,72 mg/mL) as bactérias passaram de 3,7 e 4,1 em 0h para 8,8 Log UFC/mL em 24h, aumento de 5,1 e 4,7 Log UFC. Comparando T2 com o controle, verifica-se uma diminuição de 0,5 e 0,9 Log UFC, o que representam reduções de 10 e 16% no crescimento das bactérias, respectivamente.

3.3.2. Permeabilidade da membrana celular

A influência do OEPR sobre a permeabilidade da membrana celular das bactérias avaliadas está representada na Fig.6. Para todas as bactérias, a aplicação do OEPR em ambas as concentrações testadas (1,36 e 2,72 mg/mL), resultou no aumento significativo da permeabilidade. A maior concentração do OEPR resultou em maiores valores de permeabilidade, bem como os maiores tempos de exposição. Como esperado, com base nos testes anteriores, as bactérias Gram positivas foram mais afetadas do que as bactérias Gram negativas. O aumento da condutividade elétrica do sobrenadante das suspensões bacterianas tratadas com OEPR, indica que ao menos um dos mecanismos de ação deste OE está relacionado a distúrbios na membrana celular das bactérias, implicando na perda de componentes intracelulares para o meio externo.

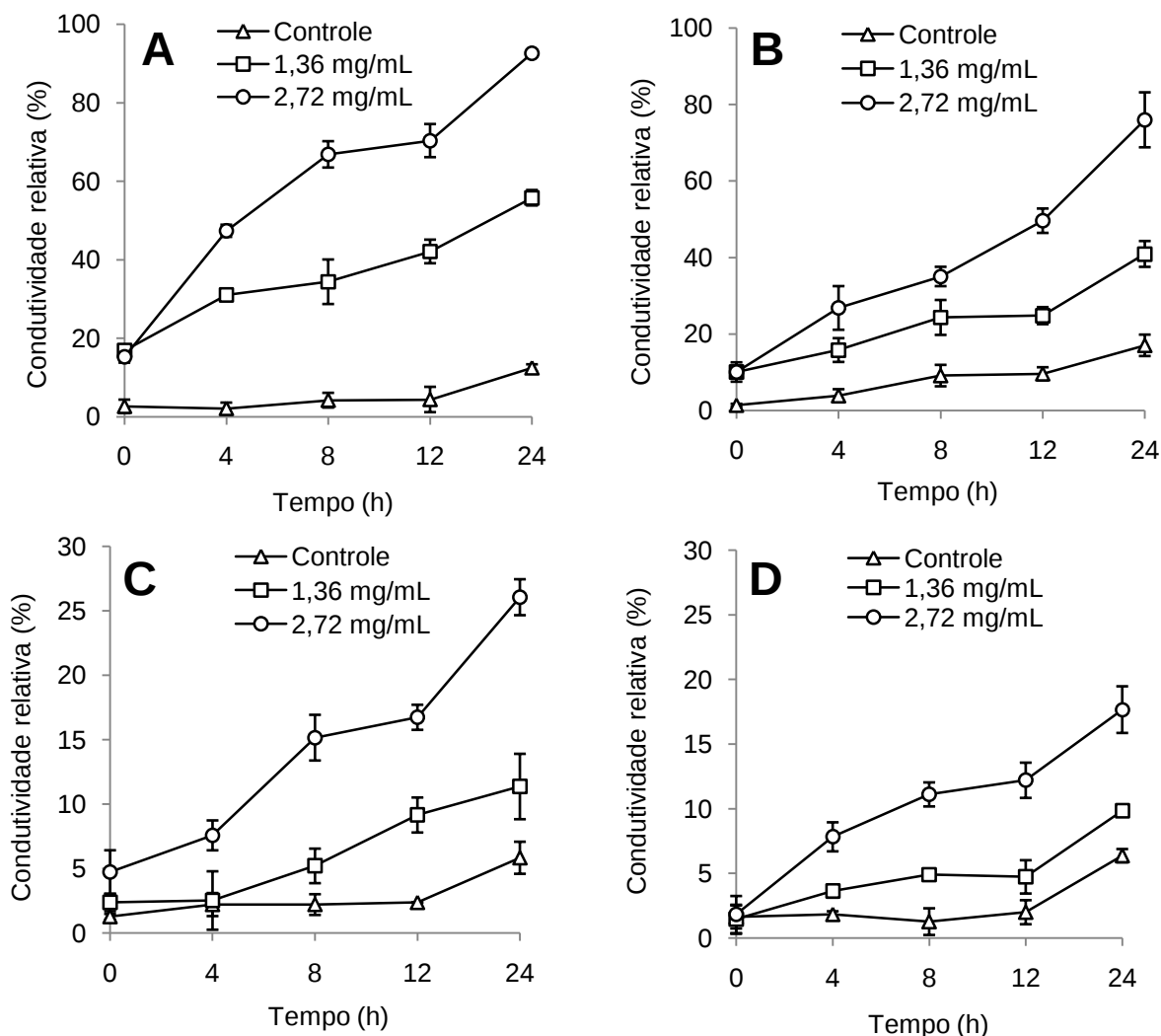


Fig. 6. Efeito de diferentes concentrações de OEPR na permeabilidade da membrana celular de *S. aureus* (gráfico A), *L. monocytogenes* (gráfico B), *E. coli* (gráfico C) e *S. Typhimurium* (gráfico D). Resultados expressos como médias (n = 3) $\pm$ desvio padrão.

Diao et al. (2014) relata que o aumento da condutividade elétrica é um indicativo de rupturas da membrana citoplasmática das bactérias. Em condições normais a membrana citoplasmática atua como uma barreira a passagem de pequenos íons (K^+ , Ca^{2+} e Na^+), sendo este controle essencial para a manutenção das principais funções celulares (metabolismo energético; transporte de solutos; regulação metabólica; controle da pressão de turgescência; motilidade). Sendo que pequenas alterações na integridade das membranas celulares bacterianas podem resultar na morte celular (COX et al., 2001).

3.3.3. Extravasamento de componentes celulares

Os danos causados pelo OEPR à membrana celular dos patógenos, também foram avaliados mediante a quantificação de componentes celulares extravasados (proteínas, açúcares e ácidos nucleicos), e os resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3

Efeito do OEPR no extravasamento de componentes celulares de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium*.

Concentração	Componentes celulares extravasados (µg/mL)		
	Açúcares	Proteínas	Ácidos nucleicos
<i>S. aureus</i>			
Controle	36,8 ± 1,6 ^{cA}	9,8 ± 0,2 ^{cA}	0,032 ± 0,000 ^{cB}
1,36 mg/mL	77,9 ± 1,6 ^{bB}	81,1 ± 0,5 ^{bA}	0,230 ± 0,003 ^{bB}
2,72 mg/mL	105,7 ± 2,7 ^{aA}	102,2 ± 0,3 ^{aA}	0,303 ± 0,006 ^{aB}
<i>L. monocytogenes</i>			
Controle	30,1 ± 1,6 ^{cB}	10,2 ± 0,2 ^{cA}	0,040 ± 0,001 ^{cA}
1,36 mg/mL	84,6 ± 1,6 ^{bA}	86,0 ± 3,6 ^{bA}	0,254 ± 0,005 ^{bA}
2,72 mg/mL	99,0 ± 0,0 ^{aB}	105,4 ± 2,0 ^{aA}	0,321 ± 0,003 ^{aA}
<i>E. coli</i>			
Controle	16,8 ± 1,6 ^{cC}	9,6 ± 0,4 ^{bA}	0,021 ± 0,000 ^{bC}
1,36 mg/mL	22,3 ± 0,0 ^{bC}	11,4 ± 1,9 ^{bB}	0,047 ± 0,008 ^{aC}
2,72 mg/mL	30,1 ± 1,6 ^{aC}	15,5 ± 0,4 ^{aB}	0,050 ± 0,005 ^{aC}
<i>S. Typhimurium</i>			
Controle	4,6 ± 3,1 ^{bD}	6,9 ± 0,3 ^{cB}	0,019 ± 0,000 ^{bD}
1,36 mg/mL	9,0 ± 0,0 ^{abD}	11,2 ± 0,4 ^{bB}	0,031 ± 0,004 ^{aC}
2,72 mg/mL	11,2 ± 1,6 ^{aD}	13,8 ± 0,2 ^{aB}	0,035 ± 0,005 ^{aC}

Resultados expressos como médias (n = 4) ± desvio padrão; Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos para uma mesma bactéria; Letras Maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as bactérias para um mesmo tratamento.

A aplicação de OEPR em ambas as concentrações resultou em um aumento significativo da densidade ótica a 260 nm para todas as bactérias avaliadas quando comparadas ao tratamento controle. As maiores DO foram verificadas para *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium*, nesta ordem. Para as bactérias Gram positivas o aumento da concentração de OEPR resultou em aumento significativo da DO, já para as bactérias Gram negativas não houve diferença significativa entre as DO dos tratamentos com OEPR. A medição de marcadores de fuga específicos, como materiais absorventes a 260 nm e proteínas, são indicadores da integridade da membrana celular que permitem verificar a influência de agentes antimicrobianos neste ponto específico (BAJPAI; SHARMA; BAEK, 2013). As quantidades de açúcares e proteínas extravasadas também aumentaram significativamente para todas as bactérias quando tratadas com OEPR. As maiores concentrações foram verificadas para *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium*, respectivamente. Com exceção dos açúcares para *S. Typhimurium*, onde não houve diferença entre as concentrações de OE, todas as demais bactérias apresentaram um aumento significativo na concentração de açúcares e proteínas extravasadas com o aumento da concentração de OE. Proteínas, açúcares e ácidos nucleicos, estão presentes no citoplasma das células e são os principais componentes das bactérias. O aumento da concentração destas macromoléculas no exterior da célula é um indicativo de sérios danos à integridade da membrana citoplasmática (Diao et al. 2014).

Estes resultados corroboram com os obtidos na análise de permeabilidade da membrana celular, onde a aplicação de OEPR resultou no aumento da permeabilidade a íons. Juntos explicam os resultados de atividade antibacteriana inicialmente verificados e, indicam que os principais mecanismos de ação do OEPR possivelmente estão relacionados a danos na parede celular bacteriana. Constatação que também corrobora com os dados da análise cromatográfica, visto que o caráter hidrofóbico dos componentes presentes no OEPR demonstra a afinidade destes com os componentes lipídicos presentes na parede celular bacteriana.

4. Conclusão

Neste estudo, o OEPR majoritariamente composto por β -mirceno (41%), demonstrou atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e *L. monocytogenes* em todos os meios avaliados (ágar, caldo e micro-atmosfera). A concentração de 2,72 mg/mL promoveu a completa eliminação de ambos os patógenos após 12h de contato, enquanto 1,36 mg/mL manteve o efeito bacteriostático por pelo menos 24h. A ação do OEPR possivelmente está relacionada à membrana citoplasmática, visto que foram verificados indícios de sérios danos a esta estrutura. *E. coli* e *S. Typhimurium* mostraram-se mais resistentes, porém apresentaram redução expressiva no seu desenvolvimento bem como indícios de danos significativos as suas células.

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam o potencial antimicrobiano do OEPR e apresentam um detalhamento sobre a ação, servindo como base para justificar e nortear trabalhos futuros visando a aplicação deste extrato vegetal como antimicrobiano natural.

5. Referências

- Asbahani, a El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E.H.A., Casabianca, H., Mousadik, a El, Hartmann, D., Jilale, a, Renaud, F.N.R., Elaissari, a, 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.* 483, 220–243. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.069
- Aumeeruddy-elalfi, Z., Gurib-fakim, A., Mahomoodally, F., 2015. Antimicrobial , antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. *Ind. Crop. Prod.* 71, 197–204. doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.058
- Bajpai, V.K., Sharma, A., Baek, K., 2013. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil , affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control* 32, 582–590. doi:10.1016/j.foodcont.2013.01.032
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram

- Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 254, 248–254.
- Burt, S., 2004. Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C. a., Riche, S.C., 2015. Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems– A Review. *Food Control* 54, 111–119. doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.040
- Cavalcanti, S., Souza, M. De, Cristina, L., Patrocínio, S., Nalesso, M., Siqueira, D., Chaves, D.A., Andre, M., Souza, A. De, 2015. Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. *Rev. Bras. Farmacogn.* 25, 356–362. doi:10.1016/j.bjp.2015.07.003
- CLSI, 2015a. M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35.
- CLSI, 2015b. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G., Wales, N.S., Biotechnologies, G., 2001. Determining the Antimicrobial Actions of Tea Tree Oil 87–91.
- Dannenber, G. da S., Funck, G.D., Cruxen, C.E. dos S., Marques, J. de L., Silva, W.P. da, Fiorentini, Â.M., 2017. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: potential for application as active packaging for sliced cheese. *LWT - Food Sci. Technol.*
- Dannenber, G. da S., Funck, G.D., Mattei, F.J., Silva, W.P. da, Fiorentini, Â.M., 2016. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) *in vitro* and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Food Sci. Emerg. Technol.* 36, 120–127. doi:10.1016/j.ifset.2016.06.009
- Diao, W., Hu, Q., Zhang, H., Xu, J., 2014. Chemical composition , antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill .). *Food Control* 35, 109–116.

doi:10.1016/j.foodcont.2013.06.056

- Dourado, M.T., 2012. Óleos essenciais e oleoresina da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): propriedades químicas e biológicas. Tese - UFPel 1–121.
- Ghabraie, M., Vu, K.D., Tata, L., Salmieri, S., Lacroix, M., 2016. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT - Food Sci. Technol.* 66, 332–339. doi:10.1016/j.lwt.2015.10.055
- Gois, F.D., Cairo, P.L.G., Cantarelli, V. de S., Costa, L.C. do B., Fontana, R., Allaman, I.B., Sbardella, M., Júnior, F.M. de C., Costa, L.B., 2016. Effect of Brazilian red pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance, diarrhea and gut health of weanling pigs. *Livest. Sci.* 183, 24–27. doi:10.1016/j.livsci.2015.11.009
- Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hamashima, H., Shimada, J., 2004. The Antibacterial Effects of Myrcene on *Staphylococcus aureus* and Its Role in the Essential Oil of the Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*). *Nat. Med.* 1, 10–14.
- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y.-J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C.-J., Zu, Y.-G., Liu, X.-L., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32, 63–8. doi:10.1016/j.etap.2011.03.011
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L. De, 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* 1451–1474. doi:10.3390/ph6121451
- Nguefack, J., Tamgue, O., Dongmo, J.B.L., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Amvam Zollo, P.H., Nkengfack, a. E., 2012. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. *Food Control* 23, 377–383. doi:10.1016/j.foodcont.2011.08.002
- Ojeda-sana, A.M., Baren, C.M. Van, Elechosa, M.A., Juárez, M.A., Moreno, S., 2013. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control* 31, 189–195. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.022
- Rai, M., Paralikar, P., Jogee, P., Agarkar, G., Ingle, A.P., Derita, M., Zacchino, S.,

2017. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles : Emerging trends and future perspectives. *Int. J. Pharm.* 519, 67–78. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.01.013
- Richter, R., Reuß, S.H. Von, König, W.A., 2010. Phytochemistry Spirocyclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Phytochemistry* 71, 1371–1374. doi:10.1016/j.phytochem.2010.05.003
- Uliana, M.P., Fronza, M., Silva, A.G. da, Vargas, T.S., Andrade, T.U. De, Scherer, R., 2016. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. *Ind. Crops Prod.* 83, 235–240.

Capítulo 3 - Manuscrito 3

Óleo essencial de pimenta rosa como componente ativo em filmes de acetato de celulose: potencial de aplicação como embalagem ativa para queijo fatiado

Artigo publicado no periódico *LWT - Food Science and Technology*

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.002>

Qualis 2015 em ciência de alimentos: A1

Fator de Impacto: 2.711

ISSN: 0023-6438

Óleo essencial de pimenta rosa como componente antimicrobiano em filme de acetato de celulose: potencial de aplicação como embalagem ativa para queijo fatiado

Guilherme da Silva Dannenberg¹; Graciele Daiana Funck¹; Claudio Eduardo dos Santos Cruxen¹; Juliana de Lima Marques¹; Wladimir Padilha da Silva¹; Ângela Maria Fiorentini^{1*}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Campus Capão do Leão CEP 96010-900, Pelotas/RS, Brasil.

* E-mail: angefiore@gmail.com

Resumo

Embalagens ativas, antimicrobianas, conferem segurança microbiológica e diminuem a necessidade de conservantes adicionados diretamente aos alimentos. O caráter ativo pode ser obtido pela adição de óleos essenciais (OE), que são extratos naturais com propriedades antimicrobianas. Neste trabalho, objetivou-se produzir filmes ativos de acetato de celulose pela incorporação de OE de pimenta rosa, avaliando esta ação por difusão em meio sólido (ágar), dispersão em meio líquido (caldo), volatilização (micro-atmosfera), e *in situ* (queijo mozzarella fatiado) frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium*. Observou-se que concentrações de 2, 4 e 6% do OE nos filmes, tornaram-os ativos em todos os meios avaliados contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*. *Escherichia coli* foi sensível em meio líquido, micro-atmosfera e *in situ*, enquanto *S. Typhimurium* demonstrou sensibilidade aos filmes em meio líquido e *in situ*. Os testes *in situ*, demonstram que a afinidade entre as moléculas apolares do OE e os componentes lipídicos do queijo, permite a migração do OE do polímero para o alimento, indicando características favoráveis para sua aplicação como embalagem ativa, por contato direto.

Palavras-chave: Filme ativo; atividade antimicrobiana; bactérias patogênicas; queijo; conservação.

1. Introdução

Tradicionalmente as embalagens possuem ação passiva sobre os alimentos, atuando apenas como barreira entre este e o meio externo. Mas, a incorporação de substâncias ativas pode promover interações desejáveis com o alimento, como atividade antimicrobiana (HAFSA et al., 2016). Dentre as substâncias ativas, os OE ganham destaque, pois, sua origem natural transmite a sensação de segurança aos consumidores (CALO et al., 2015a). Embalagens ativas, antimicrobianas, além de aumentar a segurança microbiológica (RIZZOLO et al., 2016), permitem reduzir a aplicação de aditivos sintéticos adicionados diretamente aos alimentos (MORADI et al., 2016).

Em estudos anteriores o OE de pimenta rosa (OEPR), *Shinus terebinthifolius* Raddi, demonstrou atividade antibacteriana frente à patógenos de alimentos nos testes *in vitro* e *in situ* (queijo), porém com indesejável interferência sensorial devido à aplicação direta no alimento (DANNENBERG et al., 2016). No entanto, este problema pode ser minimizado com a aplicação do OE na embalagem, evitando a adição direta no alimento, e assim, concentrando sua ação na superfície do mesmo, onde a contaminação microbiana é mais intensa (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; COMA, 2008).

O caráter volátil dos OE torna-os sensíveis aos processos térmicos empregados na produção de embalagens (FABRA; LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2016), porém, o acetato de celulose (AC) é um polímero capaz de formar filmes a baixas temperaturas (GOUVÊA et al., 2015).

Tendo em vista a potencialidade do OEPR como antibacteriano em alimentos (DANNENBERG et al., 2016), e a inexistência de estudos incorporando este OE em filmes, em caráter inédito, este trabalho objetivou aplicar OEPR como componente ativo em filmes de AC. Caracterizando sua ação *in vitro* em diferentes formas/meios de aplicação (sólido, líquido e fase de vapor), e posteriormente *in situ* (queijo fatiado), inferindo sua utilização como embalagem ativa no controle do desenvolvimento de patógenos relevantes em alimentos.

2. Material e métodos

2.1. Materiais

Na elaboração dos filmes foi utilizado Acetato de Celulose (AC - Mn ~ 50,000; Aldrich[®]), Acetona (Synth[®]) e Tween 80 (Synth[®]). Para o cultivo das bactérias utilizou-se caldo Brain Heart Infusion (BHI - Acumedia[®]), e os seguintes ágar: Cromogênico (CR - Oxoid[®]), Baird-Parker (BP - Oxoid[®]), Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant green (MLCB - Oxoid[®]), Eosin Methyene Blue (EMB- Oxoid[®]) e Mueller- Hinton (MH - Oxoid[®]).

2.2. Bactérias

Foram utilizadas quatro bactérias patogênicas de alimentos: *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028).

2.3. Óleo essencial

O OEPR foi obtido de acordo com Dannenberg et al. (2016). A análise cromatográfica (CG/MS) detectou 18 componentes, 4 monoterpenos e 14 sesquiterpenos, dos quais β -mirceno (41%), β -cubebeno (12%) e Limoneno (9%) foram os majoritários (Dados não publicados).

2.4. Elaboração dos filmes ativos

Os filmes foram produzidos pela técnica de *casting*. A solução filmogênica (SF) foi formada por AC em acetona (3% m/v). Acrescentou-se OEPR a SF em concentrações de 0, 2, 4 e 6% (v/v - OE/SF), gerando os tratamentos T0, T1, T2 e T3. As misturas foram homogeneizadas em ultra-turrex (15.000 rpm / 5 min.), alíquotas de 5 mL foram espalhadas em placas de vidro (90 mm de diâmetro) secando-as a 25 °C por 3 horas. Sendo após esterilizados (UV por 15 min) e armazenados (4 °C).

As concentrações aplicadas se basearam nos resultados de concentração inibitória mínima (CIM), anteriormente verificados para *L. monocytogenes* e *S. aureus* (CIM = 1.36 mg/mL; Dados não publicados), obtendo a CIM por unidade de área: T1 = 1,36 mg/cm²; T2 = 2,73 mg/cm² e T3 = 5,45 mg/cm².

2.5. Atividade antimicrobiana dos filmes

2.5.1. Atividade antimicrobiana em meio sólido

A atividade antimicrobiana por difusão em meio sólido foi avaliada de modo similar à técnica de disco-difusão (CLSI, 2015a) para *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium*. Utilizando discos de 10 mm de diâmetro assepticamente recortados dos filmes. Os diâmetros dos halos de inibição foram utilizados para calcular as áreas de inibição, expressas em mm², descontando a área dos filmes (Hafsa et al., 2016).

2.5.2. Atividade antimicrobiana em caldo

Recortes dos filmes (4 cm²) foram dispostos em tubos com 4 mL de caldo BHI inoculados com *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium* (10⁴ UFC/mL). O sistema foi incubado a 37 °C, retirando alíquotas nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24 horas, para a quantificação do desenvolvimento celular (UFC/mL) em ágar MH.

2.5.3. Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera

A análise de atividade antimicrobiana dos filmes por micro-atmosfera baseou-se na metodologia proposta por Ghabraie et al. (2016) para avaliação de OE. Cultivos de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium*, (10³ UFC/mL) foram inoculadas em placas com ágar MH (15 mL). Na face interna da tampa das placas foram dispostas peças íntegras dos filmes (90 mm de diâmetro). As placas foram invertidas e vedadas com filme tipo *parafilme*, sendo incubadas a 37 °C por 24h. Os resultados foram expressos em percentual de inibição, calculados pelas diferenças entre as contagens de células viáveis dos tratamentos e do controle.

2.5.4. Atividade antimicrobiana *in situ*

Foi utilizado como matriz alimentar, queijo mozzarella fatiado obtido comercialmente (espessura das fatias $\approx 1,5$ mm). As fatias foram inicialmente submetidas à radiação UV por 15 minutos, em ambas as faces (Lee, Lee, & Song, 2015). Após, foram experimentalmente contaminadas em uma das faces, pela adição de suspensões celulares (10^6 UFC/mL) de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* ou *S. Typhimurium*, obtendo a concentração final de 10^4 UFC/g de queijo. Após secagem do inóculo (15 min.) as fatias foram posicionadas sobre os filmes com a face contaminada em contato com o mesmo. O sistema foi armazenado por 12 dias a 4°C, analisando nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 dias.

As amostras foram diluídas em AP (0,1%) e inoculadas em placas com Ágar Cromogênico, para a quantificação de *L. monocytogenes* e, Ágar Baird Parker para a contagem de *S. aureus*, ágar MLCB para contagem de *S. Typhimurium* e ágar EMP para contagem de *E. coli*.

2.6. Análise estatística

Os resultados foram comparados por análise de variância (ANOVA) utilizando o *softwar* STATISTICA (StatSoft, França - versão 6.1). Foi aplicado o teste de Duncan para detectar diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as médias.

3. Resultados e discussão

3.1. Atividade antimicrobiana em meio sólido

Os resultados da análise de atividade antimicrobiana dos filmes de AC, com e sem OEPR, por contato direto em meio sólido (ágar), estão apresentados na Fig.7.

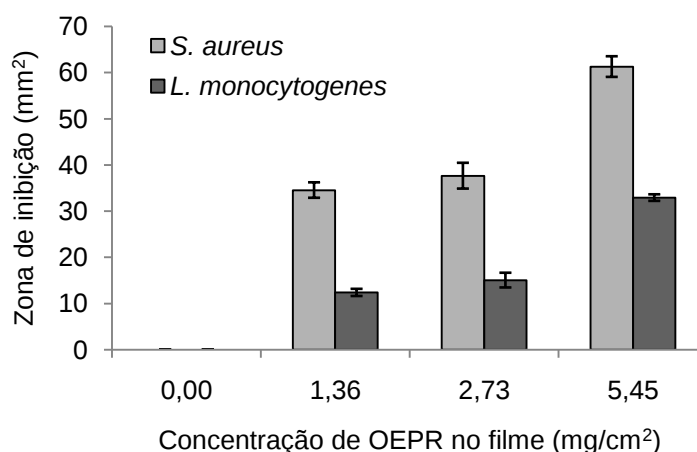


Fig. 7 - Atividade antimicrobiana de filmes com diferentes concentrações de OEPR contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Resultados expressos como média (n = 3) ± desvio padrão.

O filme sem OEPR (T0), não apresentou atividade para os patógenos avaliados. A incorporação de 1,36 mg/cm² (T1), 2,73 mg/cm² (T2) e 5,45 mg/cm² (T3) de OEPR aos filmes, tornou-os ativos frente a *S. aureus* e *L. monocytogenes*, aumentando sua atividade com o aumento da concentração de OE ($P \leq 0,05$). *Staphylococcus aureus* apresentou maior sensibilidade frente a todos os tratamentos, com zonas de inibição de $34,54 \pm 1,67$ (T1), $37,65 \pm 2,79$ (T2) e $61,27 \pm 2,23$ mm² (T3). As zonas de inibição verificadas para *L. monocytogenes* foram menores ($P \leq 0,05$): $12,39 \pm 0,7$, $15,06 \pm 1,60$ e $32,91 \pm 0,71$ mm².

Assim como com o OE puro em ágar (DANNENBERG et al., 2016), nenhum dos filmes apresentou zona de inibição contra as bactérias Gram-negativas, *E. coli* e *S. Typhimurium*, mas observou-se reduções do crescimento celular sob os discos dos filmes T2 (2,73 mg/cm²) e T3 (5,45 mg/cm²). Como não apresentaram zonas de inibição, os resultados não foram plotados no gráfico (fig.7.).

Em trabalho anterior, 10 µL do OEPR puro formou halos de 42,70 e 40,86 mm de diâmetro (1403 e 1282 mm² de área) contra *S. aureus* e *L. monocytogenes* (DANNENBERG et al., 2016). Os menores halos verificados para os filmes, comparados ao OE puro, se justificam pelo menor volume de OE em contato com o àgar, 1,36, 2,73 e 5,45 mg/cm² de OEPR nos tratamentos T1, T2 e T3. Além disso, nos filmes existe a necessidade dos componentes do OE migrarem do interior da

matriz polimérica até a superfície do àgar, para então se difundir e promover sua ação antimicrobiana (FABRA; LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2016).

A aplicação no filme mostra-se vantajosa por evitar a aplicação direta do OE no alimento, diminuindo interferências indesejáveis nas características sensoriais. E ainda, permite uma liberação gradual dos compostos antimicrobianos na superfície do produto, prolongando o tempo de ação/proteção, e agindo justamente onde o risco de contaminação é maior (COMA, 2008).

Resultados similares ao deste trabalho foram verificados por outros autores, avaliando diferentes OE, em diferentes polímeros. Filmes de quitosana, intrinsecamente antimicrobianos, com 2% e 4% de OE de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) apresentaram respectivamente, áreas de inibição de $27,80 \pm 3,79$ e $61,35 \pm 3,97 \text{ mm}^2$ para *S. aureus*, (HAFSA et al., 2016). Filmes de zeína com 2% e 3% de OE de *Zataria multiflora* Boiss apresentaram zonas de inibição de $85,36 \pm 4,70$ e $149,28 \pm 4,82 \text{ mm}^2$ contra *L. monocytogenes* (MORADI et al., 2016).

3.2. Atividade antimicrobiana em caldo

Os resultados obtidos por dispersão em meio líquido (caldo MH), para a atividade antimicrobiana dos filmes de AC, com e sem OEPR, estão apresentados na Fig. 8.

No tratamento controle (TC), sem adição de filme, *S. aureus* (Fig. 8 - A) e *L. monocytogenes* (Fig. 8 - B) passaram de 4,86 e 4,40 para 8,69 e 7,51 log UFC/mL após 24 horas de incubação (37 °C). O filme de AC sem OEPR (T0), não afetou o desenvolvimento dos patógenos, apresentado contagens finais (24h) similares ao controle ($P \leq 0,05$). O aumento da concentração de OEPR foi proporcional a redução de ambos os patógenos. As contagens finais de *S. aureus* foram de 7,73, 5,17 e 3,08 log UFC/g nos tratamentos T1, T2 e T3, valores significativamente menores que o controle. Para *L. monocytogenes*, as contagens após 24 horas, foram de 7,08, 6,34 e 3,46 log UFC/mL nos tratamentos T1, T2 e T3, valores significativamente menores que o controle. As menores concentrações de células viáveis, de ambas as bactérias, foram verificadas no tempo 4 horas para os tratamentos T3, T2 e T1, nesta ordem.

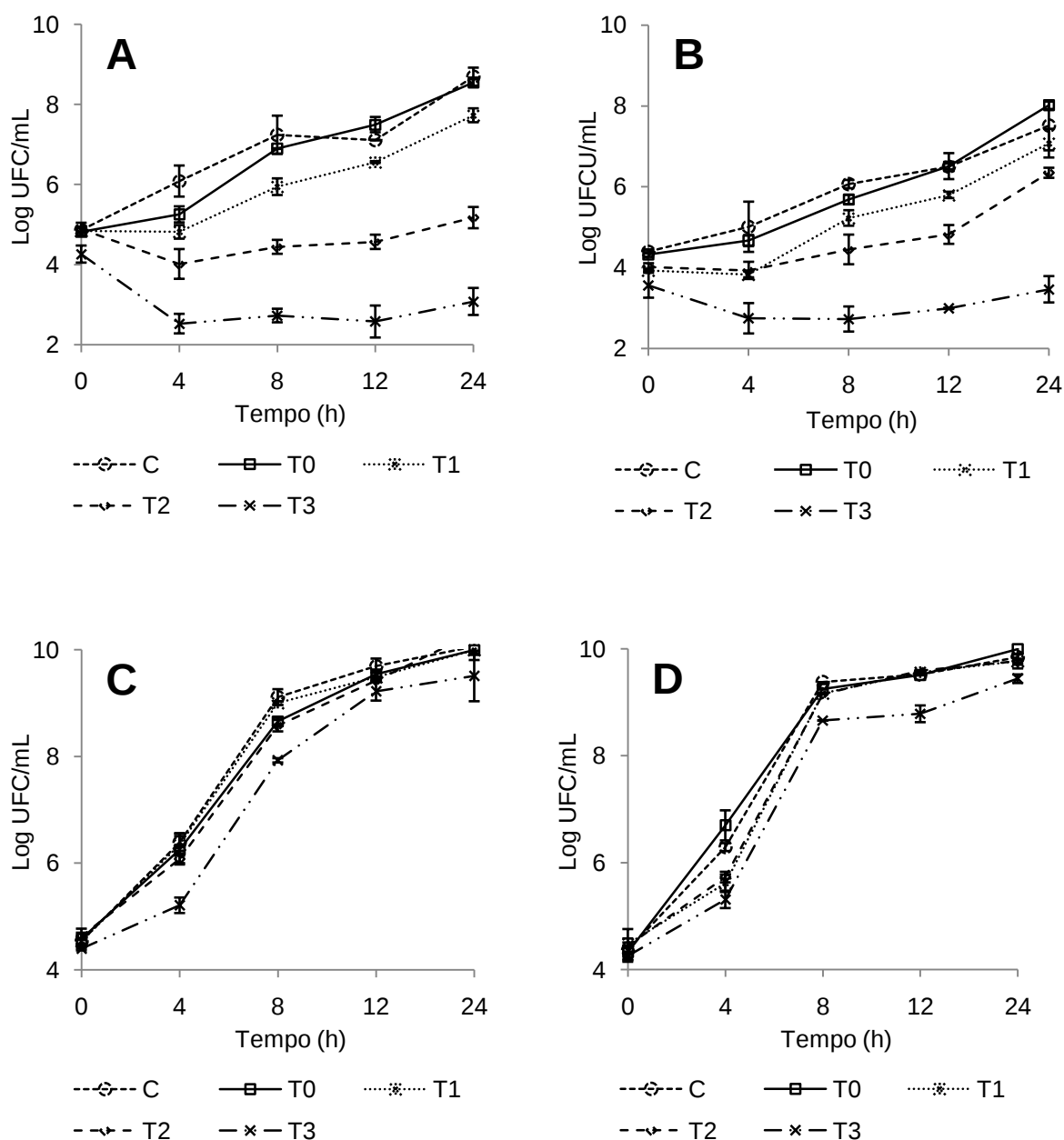


Fig. 8 - Atividade antimicrobiana de filmes com diferentes concentrações de OEPR sobre o crescimento de *S. aureus* (gráfico A), *L. monocytogenes* (gráfico B), *E. coli* (gráfico C) e *S. Typhimurium* (gráfico D) em caldo. Resultados expressos como média ($n = 4$) $\pm$ desvio padrão. C = Tratamento controle (sem filme); T0 = filme sem OE; T1 = 1,36 mg/cm²; T2 = 2,73 mg/cm²; T3 = 5,45 mg/cm² (massa de OE por área do filme).

Para as bactérias Gram-negativas *E. coli* (Fig. 8 - C) e *S. Typhimurium* (Fig. 8 - D) verificou-se efeito significativo dos filmes apenas no tratamento T3, onde as

contagens finais (24h) foram de 8,9 e 9,0 log UFC/g respectivamente, valores significativamente inferiores aos da CT (9,3 e 9,6 log UFC/g).

3.3. Atividade antimicrobiana em micro-atmosfera

A atividade antimicrobiana verificada para os filmes de AC, com e sem OEPR, por volatilização em micro-atmosfera, estão apresentados na Fig. 9.

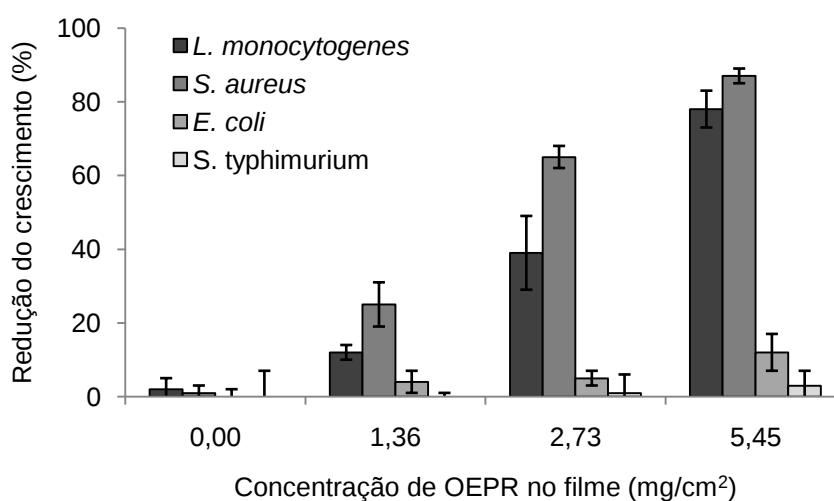


Fig. 9 - Atividade antimicrobiana de filmes com diferentes concentrações de OEPR, por volatilização em micro-atmosfera, no desenvolvimento de bactérias patogênicas. Resultados expressos como média ($n = 3$) $\pm$ desvio padrão dos percentuais de redução de cada tratamento comparados ao controle.

As concentrações de OEPR aplicadas aos filmes (2, 4 e 6%) tornaram os filmes ativos contra *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*, por volatilização. O filme sem OEPR (T0), não foi ativo contra os patógenos avaliados, apresentando contagens similares ao tratamento controle (TC). Nos tratamentos T2 e T3 foram observadas reduções de $1 \pm 0,05$ e $3 \pm 0,04$ % nas contagens de *S. Typhimurium*, mas estes valores não foram estatisticamente diferentes do controle ($P \leq 0,05$). *Staphylococcus aureus* foi a bactéria mais sensível ($P \leq 0.05$), com redução de 25, 65 e 87%, seguido por *L. monocytogenes* com 12, 39, 78%, e *E. coli* com 4, 5 e 12% de redução, quando submetidos em micro-atmosfera aos tratamentos T1, T2 e T3.

Ghabraie et al. (2016) relata que a ação dos OE em fase de vapor pode ser completamente diferente das verificadas com contato direto em meio sólido ou líquido. No contato direto, existe a necessidade do OE se difundir no meio, para isso os componentes menos hidrofóbicos são mais importantes, visto que geralmente ágar e caldos são compostos por base aquosa. Já na fase de vapor, moléculas com diferentes polaridades mostram-se igualmente importantes, pois não existe a necessidade de difusão em um meio, chegando diretamente às células microbianas mediante volatilização (GOÑI et al., 2009).

Chen & Liu (2016) obtiveram $93,4 \pm 1$ e 100% de redução nas contagens de *S. aureus* e *E. coli* respectivamente, aplicando 1g de filme de sulfato de celulose contendo 1,2% de OE de mostarda em micro-atmosfera.

3.4. Atividade antimicrobiana *in situ*

A análise *in situ* (queijo mozzarella fatiado) demonstrou que os filmes de AC com OEPR, em todas as concentrações avaliadas, foram ativos (antimicrobianos). As contagens de *S. aureus* e *L. monocytogenes* nas fatias de queijo foram significativamente reduzidas ($P \leq 0,05$) (Fig. 10).

No tratamento controle (TC), *S. aureus* (Fig. 10 - A) não apresentou crescimento significativo após 12 dias, porém manteve-se viável, sem redução significativa no número de células viáveis ($P \leq 0,05$). Comportamento similar foi verificado para o tratamento T0, onde o filme de AC sem OE não influenciou o desenvolvimento do patógeno, apresentando valores iguais ao do TC ($P \leq 0,05$). No tratamento T1, imediatamente após a aplicação do filme, verificou-se uma redução significativa ($P \leq 0,05$) de 4,30 para 2,91 log UFC/g, mantendo-se inferior ao TC até o último dia analisado. O tratamento T2, logo após a aplicação do filme, diminuiu de 4,14 para 1,24 log UFC/g a contagem de *S. aureus*, não sendo mais detectado na seqüência. No tratamento T3, imediatamente após a aplicação do filme, não foi mais detectada a presença do patógeno, indicando a rápida morte da bactéria.

Listeria monocytogenes (Fig. 10 - B) teve um aumento significativo ($P \leq 0,05$) após os 12 dias, passando de 3,67 para 5,41 log UFC/g no TC. Os filmes de AC sem OE (T0) reduziram o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, com contagem final de 4,35 log UFC/g, significativamente menor que o controle. Nos tratamentos T1 e T2,

aos três dias, as contagens do patógeno foram respectivamente, 2.41 e 1.15 log UFC/g, significativamente menores que TC e T0. No tratamento T3, a partir do 2º dia de análise (dia 3), não foi mais detectada a bactéria, demonstrando que a adição de OEPR (1.36, 2.73 e 5.45 mg/cm²) ao filme de AC os tornaram ativos (antimicrobianos).

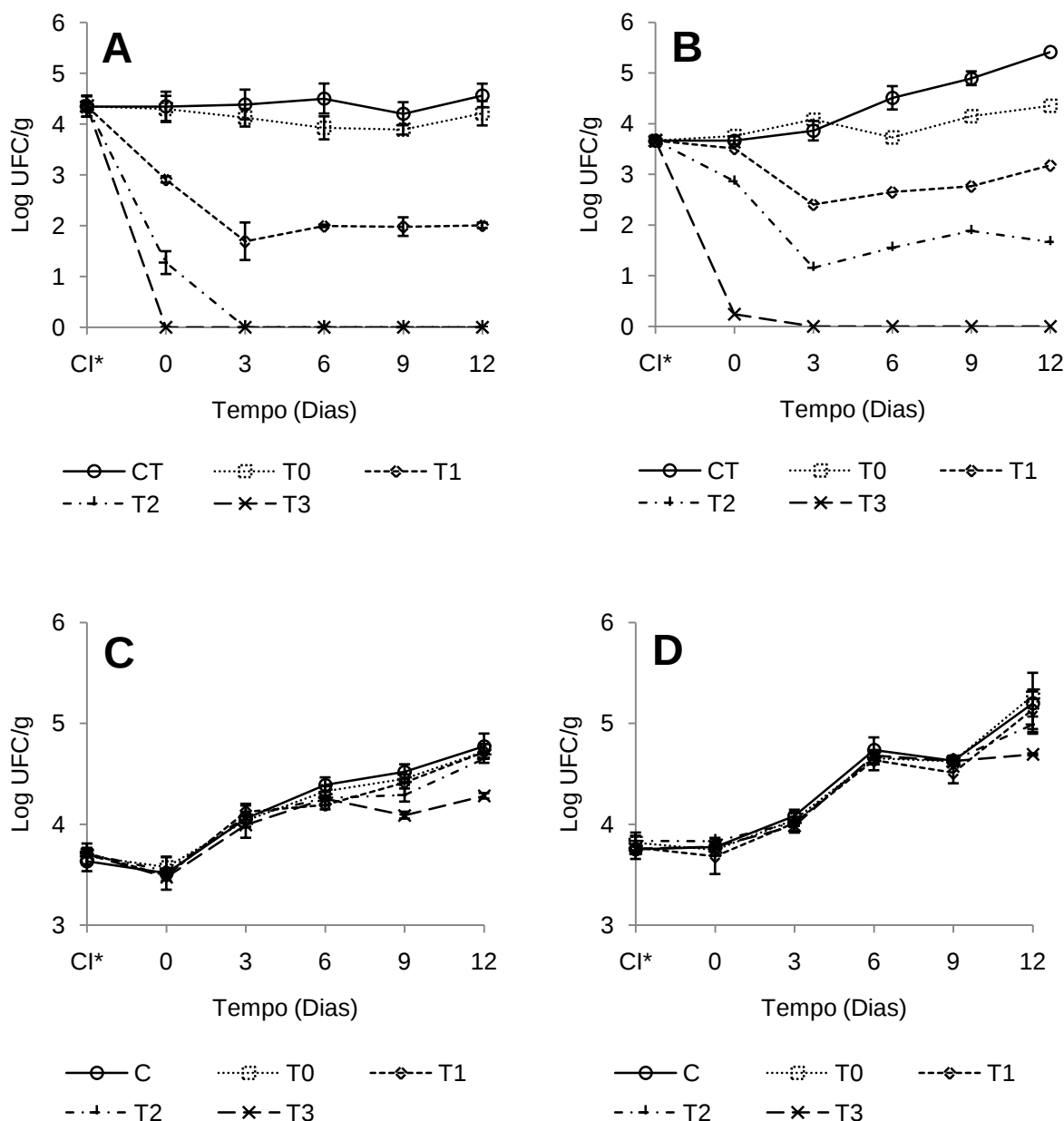


Fig. 10 - Atividade antimicrobiana de filmes com diferentes concentrações de OEPR sobre o crescimento de *S. aureus* (gráfico A), *L. monocytogenes* (gráfico B), *E. coli* (gráfico C) e *S. Typhimurium* (gráfico D) em queijo fatiado. Resultados expressos como média (n = 3) ± desvio padrão. C = Tratamento controle (sem filme); T0 = filme

sem OE; T1 = 1,36 mg/cm²; T2 = 2,73 mg/cm²; T3 = 5,45 mg/cm² (massa de OE por área do filme); CI* = Concentração Inicial (contagem de bactérias nos queijos antes da aplicação dos filmes).

Para as bactérias Gram-negativas *E. coli* (Fig. 10 - C) e *S. Typhimurium* (Fig. 10 - D) as películas não mostraram uma ação tão significativa quando comparadas às Gram-positivas. No entanto, após 12 dias de armazenamento, o tratamento T3 com a concentração mais elevada de EO apresentou contagens significativamente mais baixas do que o controle, indicando que, embora mais amena, a presença de EO na matriz polimérica também exerceu atividade antimicrobiana contra estas bactérias.

Com relação às bactérias Gram-positivas, com exceção de T3 para *S. aureus*, onde houve imediata morte da bactéria, os demais tratamentos contendo OEPR apresentaram comportamento cinético semelhante. Onde, as menores contagens foram verificadas no dia 3, indicando que neste período ocorreu a maior liberação de OE.

A rápida liberação do OE, assim como os significativos resultados verificados *in situ*, justifica-se pela afinidade existente entre os componentes do OE (apolares) e o sistema utilizado (queijo mozzarella), que é composto por aproximadamente 21% de lipídeos. Esta característica facilita a migração do OE do interior do filme para a superfície do produto, e possibilita uma melhor dispersão do antimicrobiano no alimento. Comportamento similar foi verificado para filmes de zeína com 2 e 3% de OE de *Zataria multiflora* Boiss, que reduziram as contagens de *L. monocytogenes* em carne bovina durante 12 dias de armazenamento refrigerado (MORADI et al., 2016).

4. Conclusão

O OEPR conferiu atividade antimicrobiana aos filmes de AC em todas as concentrações avaliadas (2, 4 e 6%) contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

A capacidade antimicrobiana foi detectada em todos os sistemas avaliados *in vitro*, demonstrando a capacidade do OEPR migrar do filme e se difundir em meio sólido, líquido e gasoso, respectivamente. Nos queijos experimentalmente

contaminados, todos os filmes mostraram-se ativos frente aos patógenos Gram-positivos, e o filme T3 também contra os Gram-negativos.

A atividade antimicrobiana verificada permite inferir, preliminarmente, que filmes de AC com OEPR são potenciais componentes para a produção de embalagens ativas. No entanto, para sua efetiva utilização, avaliações toxicológicas devem ser realizadas para comprovar a segurança previamente creditada aos mesmos.

5. Referências

- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 113–126.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54, 111–119.
- Chen, G., & Liu, B. (2016). Cellulose sulfate based film with slow-release antimicrobial properties prepared by incorporation of mustard essential oil and β -cyclodextrin. *Food Hydrocolloids*, 55, 100–107.
- CLSI. (2015). M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. *CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)*, 35(1).
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78, 90–103.
- Dannenbergh, G. da S., Funck, G. D., Mattei, F. J., Silva, W. P. da, & Fiorentini, Â. M. (2016). Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Food Science and Emerging Technologies*, 36, 120–127.
- Fabra, M. J., López-Rubio, A., & Lagaron, J. M. (2016). Use of the electrohydrodynamic process to develop active/bioactive bilayer films for food packaging applications. *Food Hydrocolloids*, 55, 11–18.
- Ghabraie, M., Vu, K. D., Tata, L., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 332–

339.

- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982–989.
- Gouvêa, D. M., Mendonça, R. C. S., Soto, M. L., & Cruz, R. S. (2015). LWT - Food Science and Technology Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 85–91.
- Hafsa, J., Smach, M. ali, Ben Khedher, M. R., Charfeddine, B., Limem, K., Majdoub, H., & Rouatbi, S. (2016). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 356–364.
- Lee, J.-H., Lee, J., & Song, K. Bin. (2015). Development of a chicken feet protein film containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, 46, 208–215.
- Moradi, M., Tajik, H., Mehdi, S., Rohani, R., & Mahmoudian, A. (2016). LWT - Food Science and Technology Antioxidant and antimicrobial effects of zein edible film impregnated with *Zataria multiflora* Boiss . essential oil and monolaurin. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 37–43.
- Rizzolo, A., Bianchi, G., Povolo, M., Anna, C., Contarini, G., Pelizzola, V., & Cattaneo, T. M. P. (2016). Volatile compound composition and antioxidant activity of cooked ham slices packed in propolis-based active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 8, 41–49.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho realizado possibilitou verificar que:

- O OEPR é quimicamente composto por 4 monoterpenos e 14 sesquiterpenos, dos quais β -mirceno (41%), β -cuvabeno (12%) e Limoneno (9%) são os componentes majoritários.
- No teste *In vitro* o OEPR apresentou atividade contra patógenos Gram positivos e Gram negativos. Concentrações de 1,36 e 2,72 mg/mL promoveram efeitos bacteriostáticos e bactericidas respectivamente, em *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e afetam significativamente o desenvolvimento de *E. coli* e *S. Typhimurium*. O efeito bactericida foi observado após 12 horas de contato.
- Em fase de vapor (micro-atmosfera) o OEPR promoveu reduções de até 100% no desenvolvimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e de 16 e 15 % em *E. coli* e *S. Typhimurium*, respectivamente.
- A aplicação de OEPR em células de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium* resultou em significativas alterações da permeabilidade da membrana celular, com extravasamento de íons e macromoléculas.
- Acetato de celulose mostrou-se um polímero adequado para a produção de filmes ativos contendo OEPR. Seu processo de formação a baixas temperaturas e em pouco tempo reduz possíveis perdas dos compostos voláteis do OE. Além disso, permite a liberação dos componentes ativos em diferentes meios de aplicação (caldo, micro-atmosfera e em queijo).
- A incorporação de OEPR em filmes de acetato de celulose (5,45 mg/cm²) tornou-os ativos. Demonstrado atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium*, *in vitro* e *in situ*.

- Filmes de acetato de celulose incorporados com OEPR foram eficazes na redução do crescimento de bactérias patogênicas em queijos experimentalmente contaminados, demonstrando possibilidade de aplicação como embalagem ativa para alimentos.

Referências

ABDOLLAHZADEH, E.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 177–183, jan. 2014.

AL-REZA, S. M. et al. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 981–986, 1 abr. 2010.

ALFONZO, A. et al. Effect of the lemon essential oils on the safety and sensory quality of salted sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792). **Food Control**, v. 73, p. 1265–1274, 2016.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, p. 113–126, 2002.

ASBAHANI, A. EL et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 13 fev. 2015.

ASSIS, L. M. DE et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99–109, 2012.

AUMEERUDDY-ELALFI, Z.; GURIB-FAKIM, A.; MAHOMOODALLY, F. Antimicrobial , antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. **Industrial Crops & Products**, v. 71, p. 197–204, 2015.

BĄCZEK, K. B. et al. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 102, p. 154–163, 2017.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K.-H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 722–734, mar. 2012.

BAJPAI, V. K.; SHARMA, A.; BAEK, K. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil , affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 582–590, 2013.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BASSANETTI, I. et al. Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. **Food Control**, v. 73, p. 606–612, 2017.

BENBELAÏD, F. et al. Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 4, n. 6, p. 463–72, 2014.

BOYLE, W. Spices and essential oils as preservatives. **The American Perfumer and Essential Oil Review**, v. 66, p. 25–28, 1955.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 254, p. 248–254, 1976.

BURT, S. Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of food microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157 : H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 162–167, 2003.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015a.

CAVALCANTI, S. et al. Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 356–362, 2015.

CHARLEBOIS, A. et al. Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry. **Food Microbiology**, v. 62, p. 32–38, 2017.

CHEN, G.; LIU, B. Cellulose sulfate based film with slow-release antimicrobial properties prepared by incorporation of mustard essential oil and β -cyclodextrin. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 100–107, 2016.

CHOULIARA, E. et al. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 607–617, 2007.

CLEMENTE, I. et al. Antimicrobial properties and mode of action of mustard

and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 26–33, 2016.

CLSI. M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)**, v. 35, n. 1, 2015a.

CLSI. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)**, v. 35, n. 2, 2015b.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat Science**, v. 78, p. 90–103, 2008.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170–175, 2000.

COX, S. D. et al. Determining the Antimicrobial Actions of Tea Tree Oil. p. 87–91, 2001.

DA SILVEIRA, S. M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 86–93, 2014.

DANNENBERG, G. DA S. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 120–127, 2016.

DANNENBERG, G. DA S. et al. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 314–318, 2017.

DIAO, W. et al. Chemical composition , antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 109–116, 2014.

DOS SANTOS RODRIGUES, J. B. et al. Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. **Food Control**, 2016.

DOURADO, M. T. Óleos essenciais e oleoresina da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): propriedades químicas e biológicas. **Tese - UFPel**, p. 1–121, 2012.

FABRA, M. J.; LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Use of the electrohydrodynamic process to develop active/bioactive bilayer films for food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 11–18, 2016.

FRAZÃO, G. G. S.; BLANK, A. F.; SANTANA, L. C. DE A. LWT - Food Science and Technology Optimisation of edible chitosan coatings formulations incorporating *Myrcia ovata* Cambessedes essential oil with antimicrobial potential against foodborne bacteria and natural microflora of mangaba fruits es Santos Fraz. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 1–10, 2017.

GHABRAIE, M. et al. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 332–339, 2016.

GOIS, F. D. et al. Effect of Brazilian red pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance, diarrhea and gut health of weanling pigs. **Livestock Science**, v. 183, p. 24–27, 2016.

GOÑI, P. et al. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 982–989, 2009.

GOUVÊA, D. M. et al. LWT - Food Science and Technology Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 85–91, 2015.

GUENTHER, E. **The essential oils**. New York: [s.n.].

GUO, N. et al. The preservative potential of *Amomum tsaoko* essential oil against *E. coli*, its antibacterial property and mode of action. **Food Control**, v. 75, p. 236–245, 2017.

HAFSA, J. et al. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 356–364, 2016.

INOUE, Y. et al. The Antibacterial Effects of Myrcene on *Staphylococcus aureus* and Its Role in the Essential Oil of the Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*). **Natural Medicines**, v. 1, p. 10–14, 2004.

IOS. Aromatic natural raw materials - vocabulary. **International Standard**

Organization (IOS 9235:2013), p. 14, 2013.

JESUS, I. C. DE et al. *Myrcia ovata* Cambessedes essential oils: A proposal for a novel natural antimicrobial against foodborne bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 142–147, 2016.

JIANG, Y. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 63–8, 2011.

JINGOU, J. et al. Preparation, characterization of hydrophilic and hydrophobic drug in combine loaded chitosan/cyclodextrin nanoparticles and in vitro release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 1, p. 103–107, 2011.

KASHIRI, M. et al. **Zein films and coatings as carriers and release systems of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil for antimicrobial food packaging**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017.

KLAN, A.; JER, B.; SMOLE, S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. v. 81, p. 121–126, 2010.

KWON, S.; CHANG, Y.; HAN, J. Oregano essential oil-based natural antimicrobial packaging film to inactivate *Salmonella* enterica and yeasts / molds in the atmosphere surrounding cherry tomatoes. **Food Microbiology**, v. 65, p. 114–121, 2017.

LAWLESS, J. **The encyclopedia of essential oils - The complete guide to use of aromatic oils in aromatherapy, herbalism, health & well-being**. San Francisco: [s.n.].

LEE, J.-H.; LEE, J.; SONG, K. BIN. Development of a chicken feet protein film containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 208–215, abr. 2015.

LOU, Z. et al. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 371–377, 2017.

LU, Y.; JOERGER, R.; WU, C. Similar Reduction of *Salmonella enterica* Typhimurium on Grape Tomatoes and Its Cross-Contamination in Wash Water by Washing with Natural Antimicrobials as Compared with Chlorine Treatment. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 3, p. 661–670, 2014.

MACWAN, S. R. et al. Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity and Application in Preservation of Food. **International Journal of Current**

Microbiology and Applied Sciences, v. 5, n. 5, p. 885–901, 2016.

MARCUZZO, E. et al. Encapsulation of aroma compounds in biopolymeric emulsion based edible films to control flavour release. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 984–988, 2010.

MAYAUD, L. et al. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. v. 47, p. 167–173, 2008.

MEJLHOLM, O.; DALGAARD, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. **Letters in applied microbiology**, v. 34, n. 1, p. 27–31, jan. 2002.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MORADI, M. et al. LWT - Food Science and Technology Antioxidant and antimicrobial effects of zein edible film impregnated with *Zataria multi flora* Boiss . essential oil and monolaurin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 37–43, 2016.

MULLA, M. et al. Antimicrobial efficiency of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging. **Food Control**, v. 73, p. 663–671, 2017.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L. DE. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, p. 1451–1474, 2013.

NGUEFACK, J. et al. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 377–383, fev. 2012.

OJEDA-SANA, A. M. et al. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 189–195, 2013.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174–187, 2015.

PENG, L. et al. Effect of heat treatments on the essential oils of kumquat (*Fortunella margarita*). **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 532–537, 2013.

PINTADO, C. M. B. S.; FERREIRA, M. A. S. S.; SOUSA, I. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films

containing malic acid, nisin and natamycin. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 240–246, 2010.

RAFFAELLA, C. et al. Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 132–140, 2017.

RAI, M. et al. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles : Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1–2, p. 67–78, 2017.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 110, n. 5, p. 614–9, nov. 2010.

RIBEIRO -SANTOS, R. et al. Use of essential oils in active food packaging: recent advances and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, p. 132–140, 2017.

RICHTER, R.; REUS, S. H. VON; KÖNIG, W. A. Phytochemistry Spirocyclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Phytochemistry**, v. 71, n. 11–12, p. 1371–1374, 2010.

RIZZOLO, A. et al. Volatile compound composition and antioxidant activity of cooked ham slices packed in propolis-based active packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 8, p. 41–49, 2016.

ROYO, M.; FERNÁNDEZ-PAN, I.; MATÉ, J. I. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 9, p. 1513–1519, 2010.

SAKKAS, H. et al. In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. **Journal of intercultural ethnopharmacology**, v. 5, n. 3, p. 212–8, 2016.

SIENKIEWICZ, M. et al. The Antimicrobial Activity of Thyme Essential Oil Against Multidrug Resistant Clinical Bacterial Strains. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 2, p. 137–148, 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 6^a edição ed. Porto Alegre / RS: [s.n.].

SIROCCHI, V. et al. Effect of *Rosmarinus officinalis* L . essential oil combined with different packaging conditions to extend the shelf life of refrigerated beef meat. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1069–1076, 2017.

TOFIÑO-RIVERA, A. et al. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 749–754, 2016.

ULIANA, M. P. et al. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 235–240, 2016.

VAN HAUTE, S. et al. The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. **Food Control**, v. 68, p. 30–39, 2016.

VONASEK, E.; LE, P.; NITIN, N. Food Hydrocolloids Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. **Food hydrocolloids**, v. 37, p. 7–13, 2014.

ZINOVIADOU, K. G.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 1, p. 49–59, 2010.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Fotos do experimento.



Figura 11 - Foto dos frutos de pimenta rosa madura utilizados para a obtenção do óleo essencial utilizado no estudo.



Figura 12 - Foto de teste de atividade antibacteriana do óleo essencial de pimenta rosa (OEPR) em ágar pela técnica de disco difusão.

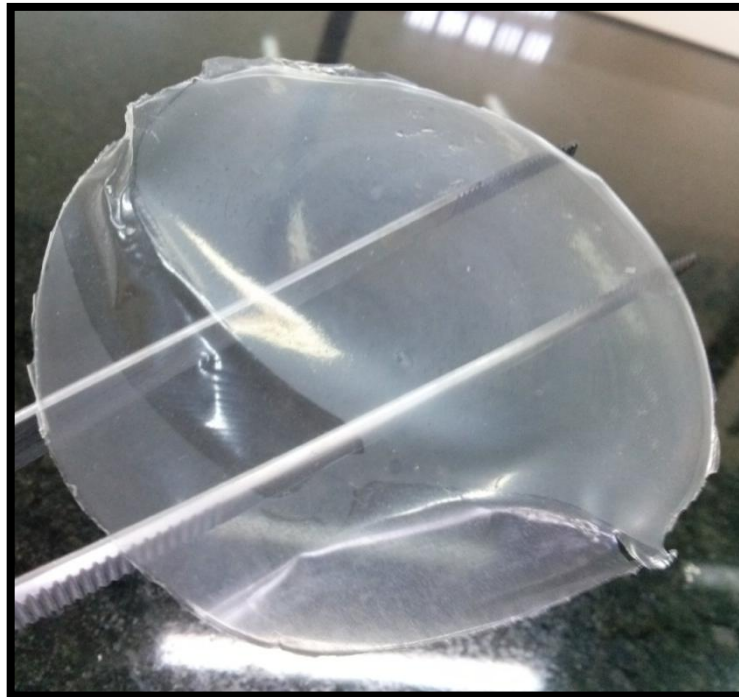


Figura 13 - Foto de filme de acetato de celulose incorporado com óleo essencial de pimenta rosa.

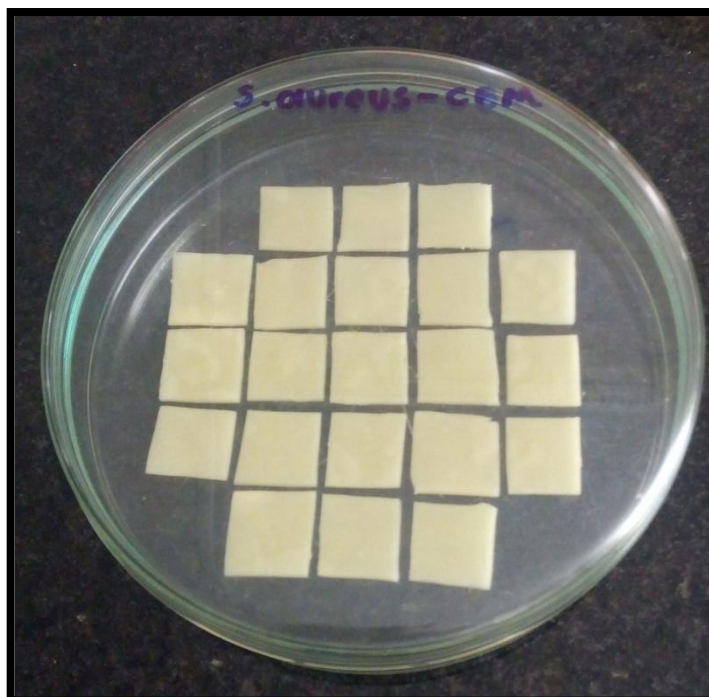


Figura 14 - Foto do teste *in situ* (queijo mussarela fatiado) da atividade antibacteriana dos filmes de acetato de celulose incorporados com óleo essencial de pimenta rosa; Fatias de queijo experimentalmente contaminadas dispostas sobre o filme bioativo.

Apêndice 2 - Imagens referentes a análise cromatográfica

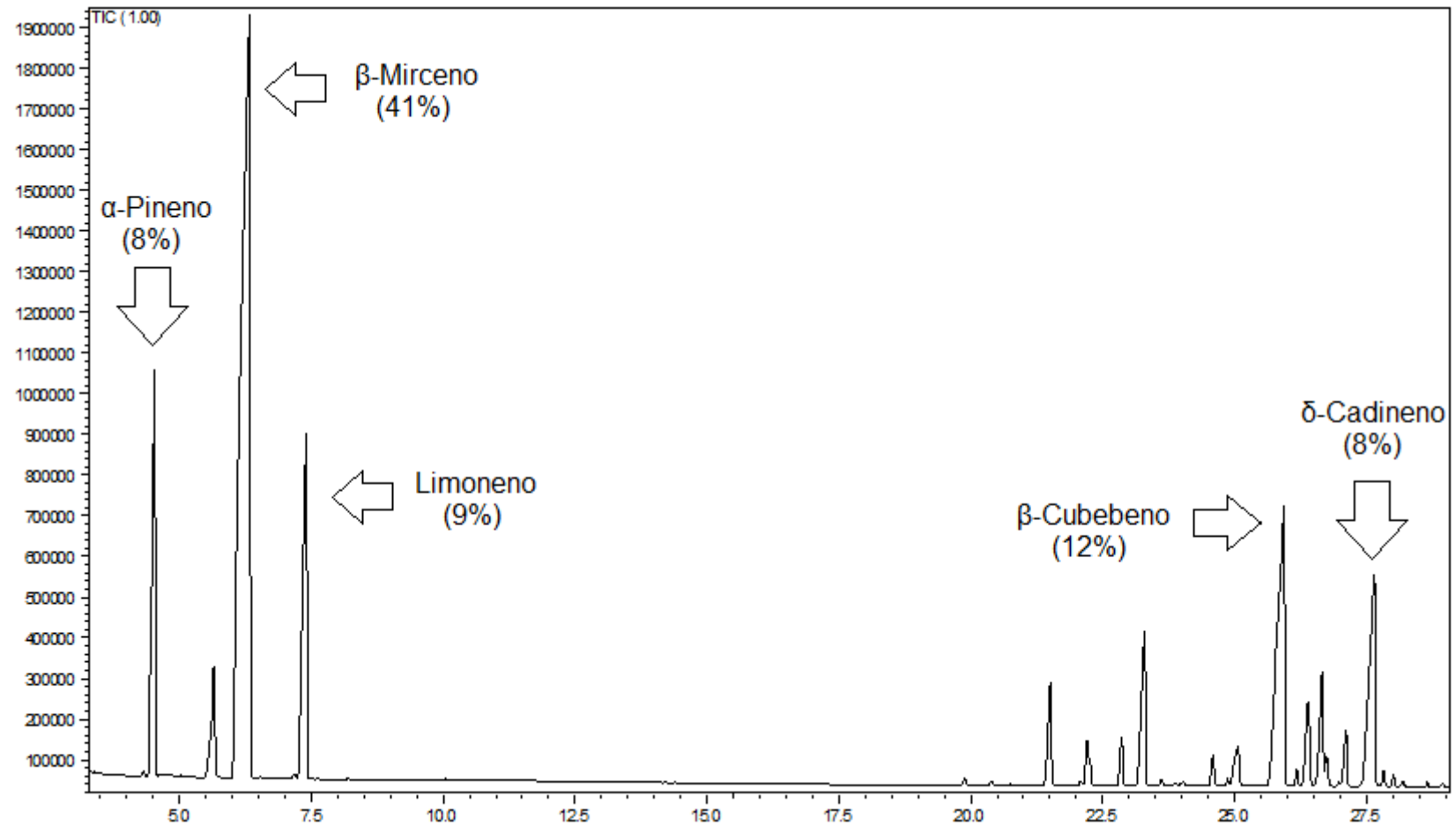


Figura 15 - Cromatograma do OEPR obtido a partir de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/MS), com a identificação dos componentes majoritários.

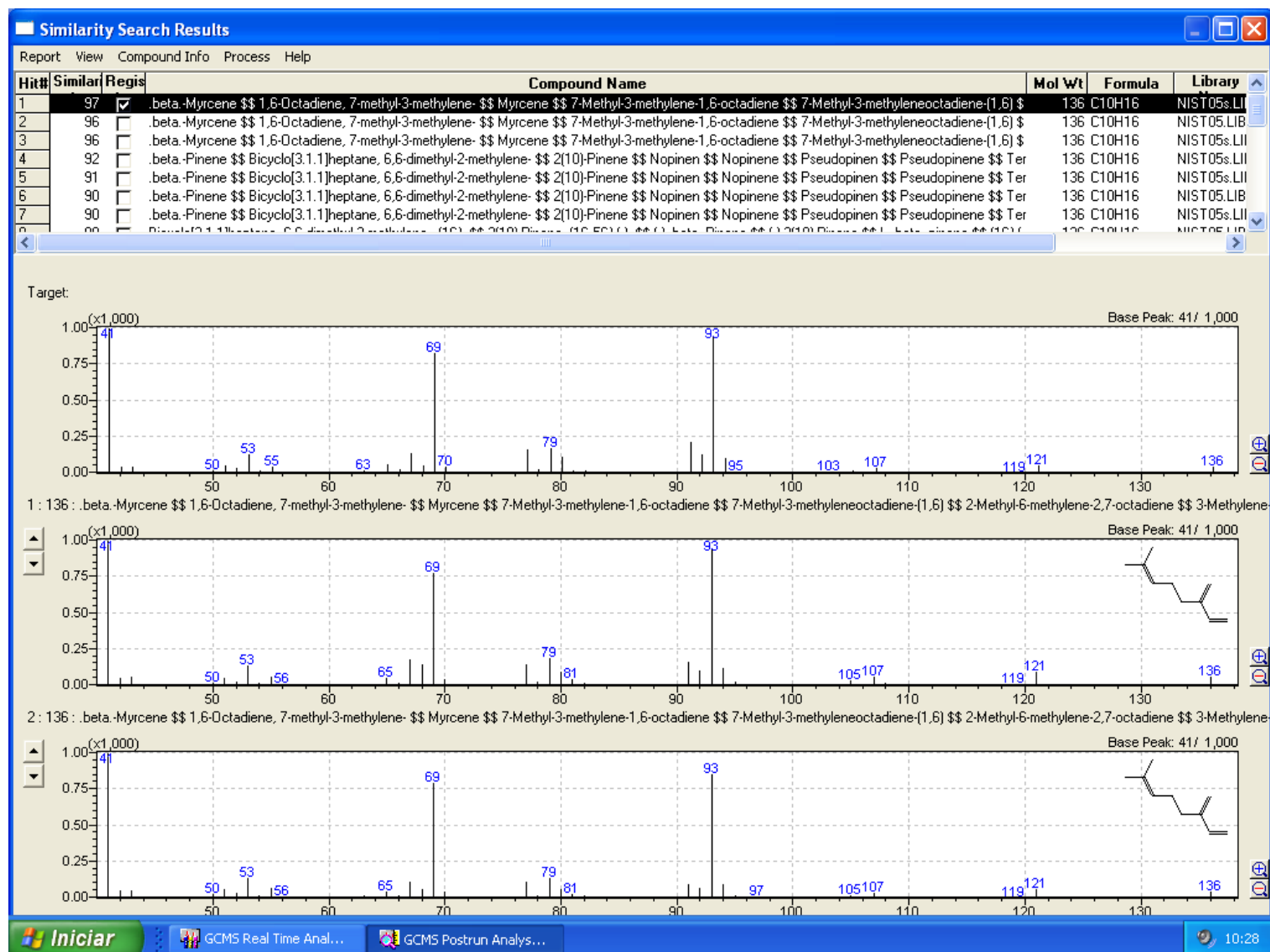


Figura 16 - Perfil de fragmentação do componente majoritário do OEPR (mirceno) comparado com os dados da biblioteca NIST.

Apêndice 3 - Análises estatísticas

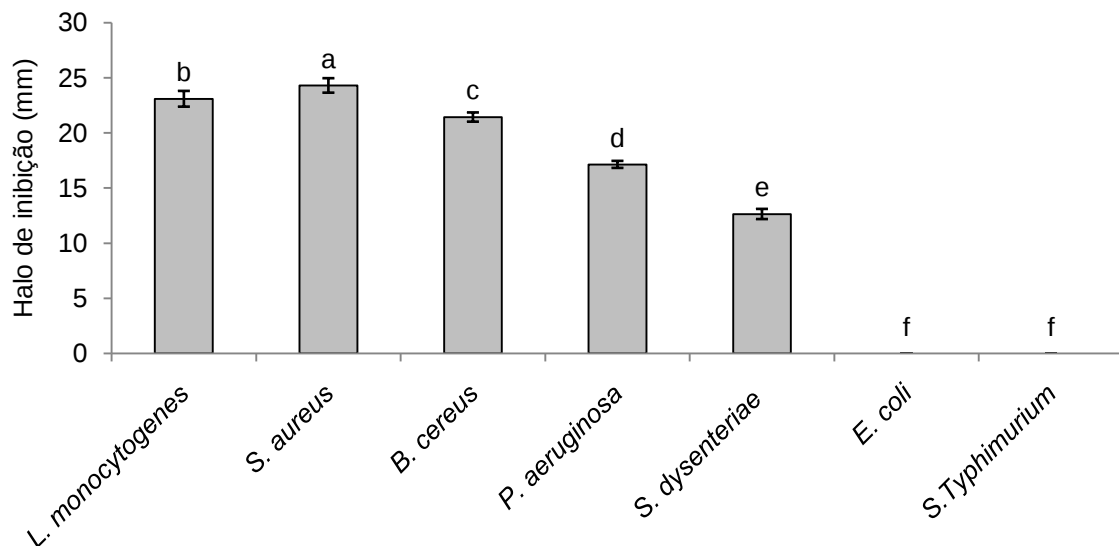


Figura 17 - Análise estatística dos halos de inibição aferidos para bactérias patogênicas e deteriorantes de relevância em alimentos mediante a ação do óleo essencial de pimenta rosa, com a respectiva análise estatística; Resultados expressos como média ($n = 3$) $\pm$ desvio padrão; Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (Tukey - $p \leq 0,05$) entre o tamanho dos halos, comparando o efeito do OE entre as bactérias.

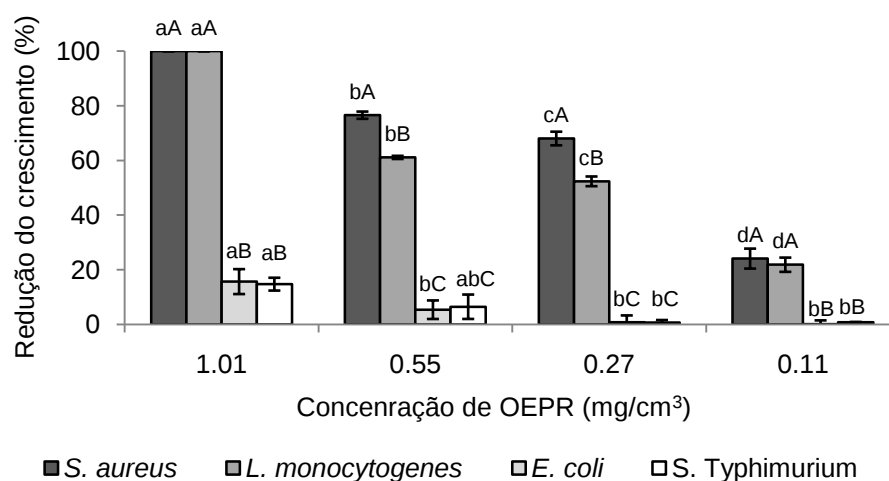


Figura 18 - Análise estatística dos resultados da atividade antimicrobiana do OEPR contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium* em micro-atmosfera. Resultados expressos como média ($n = 4$) $\pm$ desvio padrão; Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (Tukey - $p \leq 0,05$) entre os tratamentos para uma mesma bactéria; Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa (Tukey - $p \leq 0,05$) entre as bactérias para um mesmo tratamento.

Tabela 4 - Análise estatística dos resultados da análise de cinética de ação do OEPR contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium*.

Bactéria	Tempo (Horas)	Tratamento		
		Controle	1,36 mg/mL	2,72 mg/mL
<i>S. aureus</i>	0	4,59 ± 0,21 ^{aC}	4,54 ± 0,06 ^{aA}	4,25 ± 0,28 ^{aB}
	4	5,31 ± 0,06 ^{bC}	4,14 ± 0,42 ^{aA}	3,91 ± 0,46 ^{aB}
	8	6,70 ± 0,05 ^{cB}	4,37 ± 0,04 ^{bA}	0,55 ± 0,58 ^{aA}
	12	6,99 ± 0,49 ^{cB}	3,98 ± 0,53 ^{bA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}
	24	8,23 ± 0,04 ^{cA}	4,42 ± 0,12 ^{bA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}
<i>L. monocytogenes</i>	0	4,51 ± 0,22 ^{bD}	3,67 ± 0,40 ^{abA}	3,95 ± 0,13 ^{aC}
	4	4,97 ± 0,01 ^{cC}	3,97 ± 0,52 ^{bA}	2,40 ± 0,10 ^{aB}
	8	5,96 ± 0,02 ^{cB}	3,52 ± 0,32 ^{bA}	1,00 ± 0,71 ^{aA}
	12	6,17 ± 0,02 ^{cB}	3,47 ± 0,34 ^{bA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}
	24	7,28 ± 0,08 ^{cA}	3,96 ± 0,26 ^{bA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}
<i>E. coli</i>	0	3,89 ± 0,06 ^{aC}	4,05 ± 0,04 ^{abD}	3,70 ± 0,01 ^{bD}
	4	5,79 ± 0,04 ^{bB}	5,47 ± 0,19 ^{bC}	4,90 ± 0,04 ^{aC}
	8	8,89 ± 0,02 ^{cA}	7,89 ± 0,28 ^{bB}	7,08 ± 0,28 ^{aB}
	12	9,33 ± 0,43 ^{aA}	9,05 ± 0,03 ^{abA}	8,25 ± 0,38 ^{bA}
	24	9,49 ± 0,37 ^{aA}	9,30 ± 0,21 ^{aA}	8,76 ± 0,24 ^{bA}
<i>S. Typhimurium</i>	0	4,08 ± 0,03 ^{aE}	4,13 ± 0,02 ^{aA}	4,13 ± 0,10 ^{aE}
	4	5,90 ± 0,09 ^{aD}	5,55 ± 0,30 ^{aB}	5,21 ± 0,35 ^{aD}
	8	8,13 ± 0,29 ^{bC}	7,87 ± 0,15 ^{bB}	6,94 ± 0,25 ^{aC}
	12	8,96 ± 0,04 ^{bB}	8,32 ± 0,38 ^{abC}	7,75 ± 0,20 ^{aB}
	24	9,64 ± 0,19 ^{bA}	9,43 ± 0,34 ^{abD}	8,79 ± 0,24 ^{aA}

Resultados expressos como média (n = 3) ± desvio padrão; Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Tukey - p ≤ 0,05) entre os tratamentos para uma mesma bactéria e um mesmo tempo. Letras Maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa (Tukey - p ≤ 0,05) entre as bactérias para um mesmo tratamento em um mesmo tempo.

Tabela 5 - Análise estatística dos resultados da análise de condutividade elétrica dos sobrenadantes de células de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium* tratadas com diferentes concentrações de OEPR .

Bactéria	Tempo (Horas)	Tratamento		
		Controle	1,36 mg/mL	2,72 mg/mL
<i>S.aureus</i>	0	02,63 ± 1,72 ^{bA}	16,84 ± 0,74 ^{aA}	15,26 ± 1,49 ^{aA}
	4	02,11 ± 1,49 ^{cA}	31,05 ± 1,49 ^{bA}	47,37 ± 1,55 ^{aA}
	8	04,21 ± 1,87 ^{cAB}	34,39 ± 5,67 ^{bA}	66,84 ± 3,36 ^{aA}
	12	04,39 ± 3,23 ^{cAB}	42,11 ± 3,01 ^{bA}	70,35 ± 4,22 ^{aA}
	24	12,46 ± 0,89 ^{cA}	55,79 ± 1,97 ^{bA}	92,63 ± 0,86 ^{aA}
<i>L. monocytogenes</i>	0	01,4 ± 0,38 ^{bA}	10,08 ± 1,53 ^{aB}	10,08 ± 2,53 ^{aAB}
	4	03,88 ± 1,71 ^{bA}	15,81 ± 3,11 ^{aB}	26,82 ± 5,70 ^{aB}
	8	09,15 ± 2,80 ^{cA}	24,34 ± 4,56 ^{bA}	35,04 ± 2,53 ^{aB}
	12	09,61 ± 1,71 ^{cA}	24,81 ± 2,23 ^{bB}	49,61 ± 3,18 ^{aB}
	24	17,05 ± 2,80 ^{cA}	40,93 ± 3,38 ^{bB}	75,97 ± 7,18 ^{aB}
<i>E. coli</i>	0	01,26 ± 0,22 ^{bA}	02,37 ± 0,67 ^{abC}	04,74 ± 1,69 ^{aBC}
	4	02,21 ± 0,89 ^{bA}	02,53 ± 2,27 ^{bC}	07,58 ± 1,16 ^{aC}
	8	02,21 ± 0,81 ^{bB}	05,21 ± 1,34 ^{bB}	15,17 ± 1,77 ^{aC}
	12	02,37 ± 0,00 ^{cB}	09,16 ± 1,36 ^{bC}	16,75 ± 0,97 ^{aC}
	24	05,85 ± 1,24 ^{cB}	11,37 ± 2,54 ^{bC}	26,07 ± 1,40 ^{aC}
<i>S. typhimurium</i>	0	01,64 ± 0,89 ^{aA}	01,46 ± 1,12 ^{aC}	01,82 ± 1,43 ^{aC}
	4	01,82 ± 0,26 ^{bA}	03,64 ± 0,52 ^{bC}	07,83 ± 1,12 ^{aC}
	8	01,28 ± 1,03 ^{cB}	04,92 ± 0,45 ^{bB}	11,11 ± 0,93 ^{aC}
	12	02,00 ± 0,93 ^{bB}	04,74 ± 1,29 ^{bC}	12,20 ± 1,36 ^{aC}
	24	06,38 ± 0,52 ^{cB}	09,84 ± 0,00 ^{bC}	17,67 ± 1,80 ^{aC}

Resultados expressos como média (n = 3) ± desvio padrão; Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa (Tukey - $p \leq 0,05$) comparando os tratamentos para uma mesma bactéria em um mesmo tempo. Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa (Tukey - $p \leq 0,05$) entre as bactérias em um mesmo tratamento e tempo.

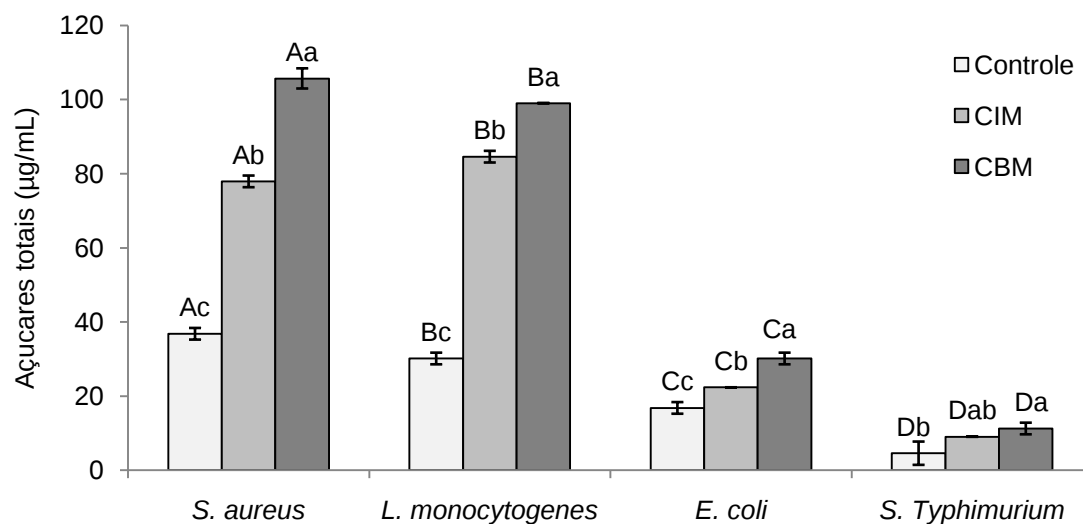


Figura 19 - Análise estatística dos resultados da análise de açúcares totais dos sobrenadantes de células de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium* tratadas com OEPR. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (Tukey - $p \leq 0,05$) entre os tratamentos para uma mesma bactéria; Letra maiúsculas diferentes indicam diferença significativa (Tukey - $p \leq 0,05$) entre as bactérias para um mesmo tratamento.

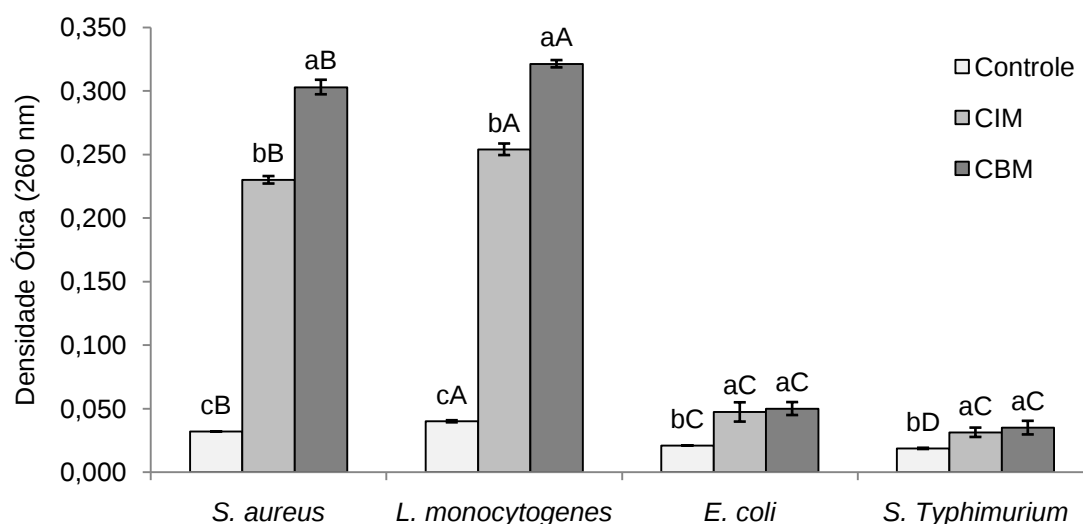


Figura 20 - Análise estatística dos resultados da análise de ácidos nucleicos (substâncias absorventes a 230 nm) do sobrenadante de células de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium* tratadas com OEPR; Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (Tukey - $p \leq 0,05$) entre os tratamentos para uma mesma bactéria; Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa (Tukey - $p \leq 0,05$) entre as bactérias para um mesmo tratamento.

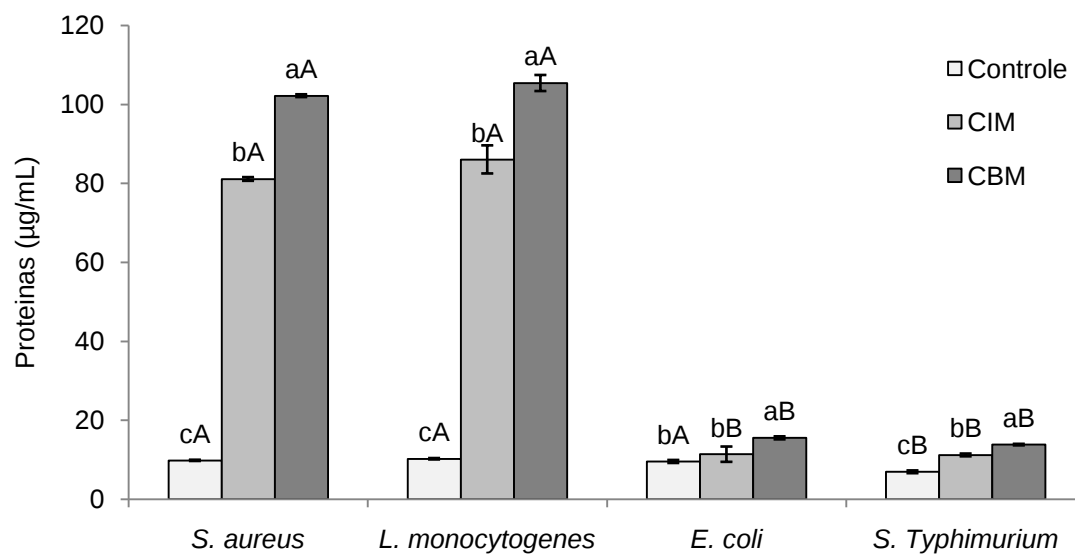


Figura 21 - Análise estatística dos resultados da análise de proteínas do sobrenadante de células de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium* tratadas com OEPR; Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (Tukey - $p \leq 0,05$) entre os tratamentos para uma mesma bactéria; Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa (Tukey - $p \leq 0,05$) entre as bactérias para um mesmo tratamento.

Tabela 6 - Análise estatística dos resultados da análise de atividade antimicrobiana dos filmes contendo diferentes concentrações de OEPR contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium* em ágar.

Tratamento	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>
T0	00,00 ± 0,00 ^{aA}	00,00 ± 0,00 ^{aA}	00,00 ± 0,00 ^{aA}	00,00 ± 0,00 ^{aA}
T1	34,54 ± 1,67 ^{aB}	12,39 ± 0,77 ^{bB}	00,00 ± 0,00 ^{cA}	00,00 ± 0,00 ^{cA}
T2	37,65 ± 2,79 ^{aB}	15,06 ± 1,60 ^{bC}	00,00 ± 0,00 ^{cA}	00,00 ± 0,00 ^{cA}
T3	61,27 ± 2,23 ^{aC}	32,91 ± 0,71 ^{bD}	00,00 ± 0,00 ^{cA}	00,00 ± 0,00 ^{cA}

Resultados expressos como média (n = 3) ± desvio padrão; Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa (Tukey - $p \leq 0,05$) entre as bactérias para um mesmo tratamento; Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa (Tukey - $p \leq 0,05$) entre os tratamentos para uma mesma bactéria.

Apêndice 4 - Representação das diluições e curvas de calibração utilizadas

Tabela 7 - Representação das diluições, e respectivas concentrações, obtidas nos poços das placas de microdiluição para o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Poço	Concentração		
	%	μL/mL	mg/mL*
Inicial	20,00%	200,00	174,06
1	10,00%	100,00	87,03
2	5,00%	50,00	43,52
3	2,50%	25,00	21,76
4	1,25%	12,50	10,88
5	0,63%	6,25	5,44
6	0,31%	3,13	2,72
7	0,16%	1,56	1,36
8	0,08%	0,78	0,68
9	0,04%	0,39	0,34
10	0,02%	0,20	0,17

*Valor calculado com base na densidade do OEPR (0,8703 g/mL).

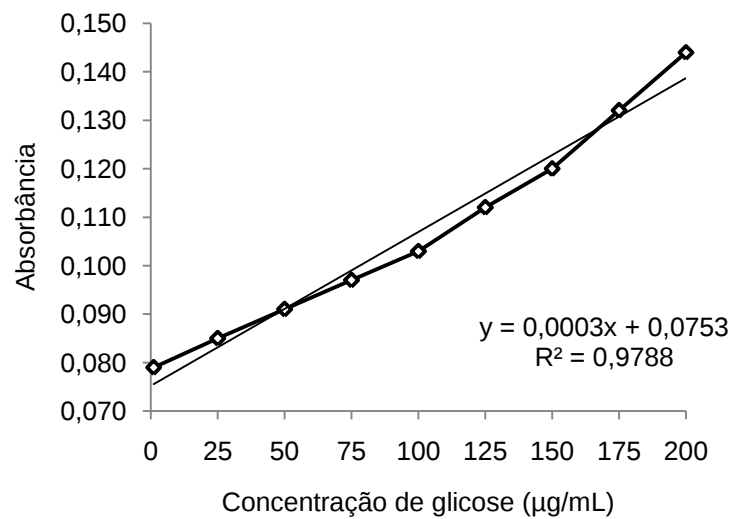


Figura 22 - Curva de calibração de glicose para a análise de açúcares totais em sobrenadantes de células de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium* tratadas com OEPR.

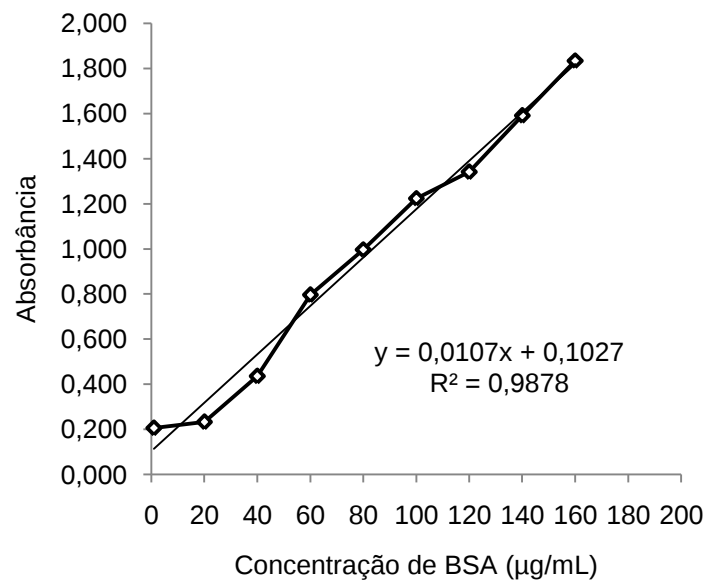


Figura 23 - Curva de calibração de BSA (albumina de soro bovino) para a análise de proteínas dos sobrenadantes de células bacterianas tratadas com OEPR.