

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE (*Zingiber officinale roscoe*) E PEPTÍDEO PRODUZIDO PELO *Lactococcus lactis* SUBESPÉCIE *hordniae* CONTRA *Salmonella* Enteritidis E *Listeria monocytogenes*

Resumo Expandido

Luciano Heusser¹

Alexandra Fabíola Becker²

Ivan de Marco³

Larissa Karla Monteiro⁴

Liana Renata Canonica⁵

Liziane Schittler⁶

Micheli Mayara Trentin⁷

Resumo

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são uma importante causa de enfermidades e morte em todo o mundo, dentre os micro-organismos envolvidos destaca-se a *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes*. Neste sentido, o estudo utilizando compostos antimicrobianos de origem vegetal e microbiana, como os óleos essenciais e bacteriocinas são alternativas promissoras na conservação e garantia de alimentos seguros. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana bem como a concentração mínima inibitória (CMI) do óleo essencial de gengibre (OG) e do peptídeo produzido pelo *Lactococcus lactis* subespécie *hordniae* (PP) contra *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes*. Para isto, OG e PP foram submetidos à avaliação da atividade antimicrobiana contra os micro-organismos patogênicos através da técnica de difusão em ágar conforme descrito por Ostrosky *et al.* (2008). Determinou-se a CMI do OG e do PP contra *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* através do método descrito por Ostrosky *et al.* (2008). Os tamanhos dos halos de inibição (mm) foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey, com nível de 95% de confiabilidade. O OG apresentou atividade antimicrobiana contra *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* produzindo halos de inibição de 8,75 e 18,62 mm, respectivamente. O PP apresentou atividade antimicrobiana somente para *L. monocytogenes*, produziu halo de inibição de 21,5 mm. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tamanhos de halos produzidos pela atividade antimicrobiana do OG e do PP contra *L. monocytogenes*. Referente à CMI do OG foi de 250 e 0,48 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ contra *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes*, respectivamente, e de 0,48 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ do PP contra *L. monocytogenes*. O OG e o PP apresentaram ação antimicrobiana e podem ser uma alternativa interessante na conservação de alimentos.

Palavras-chave: Compostos naturais. Inibição. Micro-organismos patogênicos.

Fundamentação/Introdução

Atualmente é crescente o número de bactérias resistentes a antimicrobianos, o que tem aumentado a busca por compostos antimicrobianos de origem vegetal e

¹ Mestrando, Universidade do Estado de Santa Catarina, luciano.heusser@gmail.com

² Mestranda, Universidade do Estado de Santa Catarina, alexandraf.becker@gmail.com

³ Mestrando, Universidade do Estado de Santa Catarina, ivandemarco22@gmail.com

⁴ Mestranda, Universidade do Estado de Santa Catarina, lrikarlaamonteiro15725@hotmail.com

⁵ Mestranda, Universidade do Estado de Santa Catarina, lianarenata@gmail.com

⁶ Doutora, Universidade do Estado de Santa Catarina, liziane.schittler@udesc.br

⁷ Mestranda, Universidade do Estado de Santa Catarina, mixeli@unochapeco.edu.br

microbiana pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias, isso em decorrência a preferência dos consumidores por alimentos com aditivos naturais. Destacam-se como alternativas promissoras os estudos com óleos essenciais e peptídeos produzidos por bactérias ácido lácticas (BAL).

Os óleos essenciais caracterizam por apresentar misturas complexas de compostos orgânicos com atividade antimicrobiana e antioxidante, resultantes do metabolismo secundário da planta (ANDRADE *et al.*, 2012).

O gengibre (*Zingiber officinale* roscoe) é amplamente conhecido e utilizado na culinária por apresentar odor e sabor picante (YADAV *et al.*, 2012; LORENZI; MATOS, 2008). Além, de ser utilizado na medicina tradicional no tratamento de inflamações, doenças reumáticas e desconfortos gastrointestinais (PFEIFFER *et al.*, 2006). Estudos realizados com óleo essencial e extratos de gengibre tem demonstrado excelente atividade antimicrobiana contra diversos patógenos alimentares, sendo esses patógenos bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas (SILVA *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2012; AHMED *et al.*, 2012).

As bactérias ácido lácticas (BAL) são um grupo de micro-organismos Gram positivos que podem estar presentes em diversos alimentos que apresentam a capacidade de produzir várias substâncias com atividade antagonista, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas, que têm potencial para serem utilizadas na bioconservação de alimentos (MAGRO *et al.*, 2000).

As bacteriocinas são peptídeos antibióticos sintetizados nos ribossomas de algumas BAL, biologicamente ativos, que possuem efeito antimicrobiano em organismos intimamente relacionados, podendo ter um amplo espectro de atividade antibacteriana (BIZANI *et al.*, 2005). A única bacteriocina licenciada é a nisina, produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, sendo composta por 34 aminoácidos. Isso indica que novos isolados como *L. lactis* subespécie *hordniae* podem produzir peptídeos e outros compostos com atividade antimicrobiana.

Considerando, que as doenças transmitidas por alimentos (DTA) são causadoras de enfermidades e morte em todo o mundo, dentre os principais micro-organismos envolvidos destaca-se a *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes*, a pesquisa de compostos naturais com atividade antimicrobiana torna-se necessária e promissora, pois estes podem ser uma alternativa na substituição de aditivos químicos sintéticos utilizados comumente nas indústrias de alimentos.

Objetivos

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e a concentração mínima inibitória do óleo essencial de gengibre e de peptídeo produzido pelo *L. lactis* subespécie *hordniae* contra *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*.

Delineamento e Métodos

O óleo essencial de gengibre (OG) foi adquirido de formulação comercial na cidade de Chapecó – SC. A nisina da marca Nisaplim (2,5 µL.L⁻¹) foi utilizada como controle positivo para atividade antimicrobiana (NC).

O *L. lactis* subespécie *hordniae* (PP) foi isolado de alface e identificado pelo sequenciamento do gene 16S do rRNA. O isolado foi cultivado em caldo MRS por 24 h a 36 ± 1 °C. O cultivo foi centrifugado a 13.000 x g a 4 °C, por 15 min, e o sobrenadante neutralizado com NaOH 1 N até pH 7,0. Esterilizou-se por filtração o

sobrenadante utilizando membrana de 0,22 μm (Mililipore), e aquecido a 85 °C por 10 minutos.

As cepas patogênicas de *Salmonella* Enteritidis (ATCC13076) e *Listeria monocytogenes* foram recuperadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 36°C \pm 1 °C por 24 h, e diluídas até atingir turbidez semelhante a escala 0,5 McFarland (3×10^8 UFC.mL⁻¹). Após, calculou-se o volume necessário das culturas para atingir a concentração de $\approx 10^5$ UFC mL⁻¹ em água peptonada.

Para avaliar a atividade antimicrobiana do OG e de PP produzido pelo *L. lactis* subespécie *hordniae* utilizou-se o método de difusão em disco, descrito por Ostrosky et al. (2008). Inoculou-se as culturas patogênicas na concentração de 10^5 através do auxílio de swab em ágar Müller-Hinton. Em seguida, adicionou-se em cada placa, três discos de papel filtro estéril com 6 mm de diâmetro e adicionou-se 15 μL da substância a ser testada (OG e PP). Incubou-se a 36 \pm 1 °C por 24 horas. Os halos formados foram medidos através de paquímetro Digimess® e o valor expresso em milímetros (mm). O experimento foi realizado em triplicata.

Determinou-se a CMI do OG e do PP contra *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* em microplacas de 96 poços conforme método descrito por (OSTROSKY et al., 2008). No primeiro poço adicionou-se 200 μL da substância a ser testada e nos demais poços 100 μL de caldo BHI. Após, retirou-se 100 μL do primeiro poço e transferiu-se para o segundo poço, e assim sucessivamente até o penúltimo poço, perfazendo 10 diluições, obtendo-se as concentrações de 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%; 0,05% e 0,00% das substâncias testadas, respectivamente.

Adicionou-se 100 μL da cultura microbiana na concentração de 10^5 UFC.g⁻¹ nos poços, exceto no primeiro. Com isto, o primeiro e o último poço foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Incubou-se a microplaca por 18 horas a 37 \pm 1 °C, e adicionou-se 10 μL de resazurina (3%) em todos os poços. Incubou-se por mais 2 horas a 37 °C e realizou-se a leitura, poços com coloração azul: sem desenvolvimento microbiano; coloração rosa: houve desenvolvimento microbiano.

O tamanho dos halos inibição produzidos pela ação dos antimicrobianos testados foram submetidos a análise estatística pelo Teste de Tukey, através da análise de variância (ANOVA), usando o software Statistic®. para detectar a diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$), em nível de confiança de 95%.

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 pode-se visualizar os tamanhos dos halos de inibição produzidos pelo PP e pelo OG. O OG apresentou atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, que são micro-organismos Gram positivo e Gram negativo, respectivamente.

De acordo com Turina et al. (2006), os óleos essenciais são ricos em compostos fenólicos, terpenos, tocoferóis, entre outros, que podem ser responsáveis pelas propriedades antimicrobianas.

Resultados diferentes foram relatados por Trajano et al. (2009), onde avaliaram o óleo essencial de gengibre, e este, não apresentou atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. Esta divergência de resultados entre nosso estudo e Trajano et al. (2009), pode ser explicado pela variação na composição química dos óleos essenciais e das cepas testadas. De acordo com Sarto et al. (2014) a atividade biológica dos óleos essenciais depende da composição e concentração de seus constituintes

químicos como por exemplo, a presença citral, pineno, cineol, cariofileno, elemeno, furanodieno, imoneno, eugenol, eucaliptol, carvacrol entre outros. O autor destaca também, que a atividade biológica do óleo está diretamente relacionada com a estação de colheita, genótipo, clima, fontes geográficas da planta bem como o método de extração (OUSSALAH *et al.*, 2007). O autor Probst (2012) verificou possíveis diferenças no perfil de sensibilidade de óleos essenciais sobre linhagens de *Salmonella* spp. (*S. Enteritidis* e *S. typhimurium*).

Observa-se na Tabela 1, que PP produziu maiores halos de inibição contra *L. monocytogenes* comparando ao OG. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tamanhos dos halos de inibição produzidos pelo PP e a nisina. Isso reforça que o PP apresenta as mesmas características da nisina, está bacteriocina é comercialmente utilizada na indústria, tendo seu uso aprovado em alimentos em mais de 50 países (MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005). Porém, para confirmar que o PP apresente características de alta eficiência como conservante em alimentos, assim como a nisina, são necessários mais estudos.

Na Tabela 1, observa-se que o OG e o PP apresentam menor atividade antimicrobiana contra *S. Enteritidis* do que *L. monocytogenes*. De acordo com estudos a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e bacteriocinas são maiores contra bactérias Gram positivas, como por exemplo, a *L. monocytogenes* (DAGDELEN *et al.*, 2014; GOVARIS *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Tamanho dos halos de inibição (mm) produzidos pela nisina $2,5\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ (NC), óleo essencial de gengibre (OG) e peptídeo produzido pelo *L. lactis* subespécie *hordniae* (PP) contra *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*.

Substância	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Enteritidis</i>
	Tamanho do halo (mm)	
NC	18,75±0,64 ^a	10,0±0,70 ^a
OG	18,62±0,94 ^a	8,75±1,51 ^a
PP	21,5±1,91 ^a	0,00±0,00 ^{b*}

*Não apresentou halo de inibição.

Média ± desvio padrão; Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

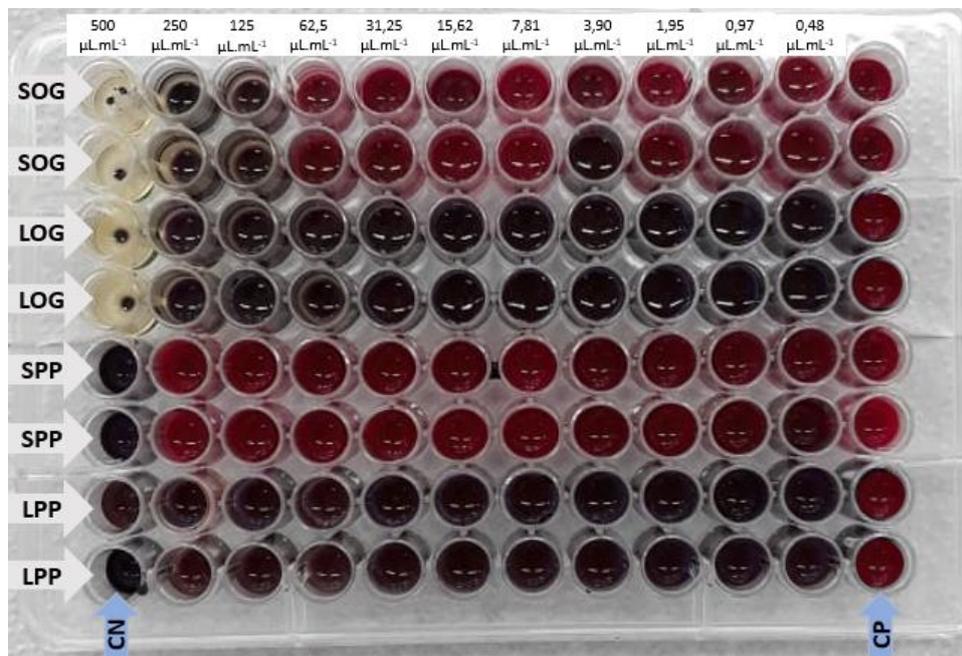
Como não há padrão estabelecido pela ANVISA e *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), quanto ao tamanho de halo de inibição, consequentemente, classificação da atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. Utilizamos os descritos por Mosbah *et al.* (2018), o qual estabelece, zona de inibição com tamanho entre 1 e 6, 7 e 10, 11 e 15, 12 e 20 mm como: baixa, moderada, alta e excelente atividade antimicrobiana, respectivamente. O OG e o PP apresentaram excelente atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. Já, o OG apresentou moderada atividade antimicrobiana contra *S. Enteritidis*.

A Figura 1 representa a determinação da CMI, com base nos resultados apresentados, poços com coloração azul considerou-se presença de atividade antimicrobiana e coloração rosa/vermelhada ausência de atividade antimicrobiana, evidencia-se que concentração mínima do OG inibir a *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* foi de 250 e $0,48\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Podemos perceber que a concentração necessária de OG é muito maior para inibir *S. Enteritidis* do que *L. monocytogenes* (Figura 1). Estes resultados corroboram com os obtidos pelo método

de difusão em disco, onde a atividade antimicrobiana do OG é considerada moderada para *S. Enteritidis* e excelente para *L. monocytogenes*.

Resultados diferentes foram relatados por Dall Agnol *et al.* (2018), onde a concentração mínima do óleo essencial de alecrim necessária para inibir *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* foi de 12,5 e 1,56 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente. Esta divergência de resultado entre nosso estudo e Dall Agnol *et al.* (2018), pode ser explicada pela diferença na composição dos óleos essenciais testados, haja vista, que as cepas indicadoras utilizadas bem como os ensaios foram realizados no mesmo laboratório.

Figura 1 – Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) das substâncias testadas contra *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*.



CN: Controle negativo – substância testada; SOG: *S. Enteritidis* com óleo essencial de gengibre; LOG: *L. monocytogenes* com óleo essencial de gengibre; SPP: *S. Enteritidis* com peptídeo de origem *L. lactis* subespécie *hordniae*; LPP: *L. monocytogenes* com peptídeo de origem *L. subespécie hordniae*; CP: Controle positivo – micro-organismo patogênico.

Fonte: Autores, 2019.

Conclusões/Considerações Finais

Óleo essencial de gengibre e o peptídeo produzido pelo *L. lactis* subespécie *hordniae* apresentam atividade antimicrobiana. O óleo essencial de gengibre apresenta maior atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* do que *S. Enteritidis*. O peptídeo apresenta atividade antimicrobiana semelhante ao óleo essencial de gengibre contra *L. monocytogenes*.

Substâncias de origem natural como o óleo essencial de gengibre e o peptídeo produzido *L. lactis* podem ser alternativas interessantes para a substituição de aditivos químicos sintéticos no controle da multiplicação microbiana em alimentos. Porém, estudos devem ser realizados para verificar as possíveis mudanças nas propriedades nutricionais, sensoriais bem como garantir a segurança destes antes de incorporar nos alimentos.

Referências

- AHMED, S.A. *et al.* Study the antibacterial activity of *Zingiber officinale* roots against some of pathogenic bacteria. **Al-Mustansiriya Journal Science**, v.23, n.3, 2012, p.63-70.
- ANDRADE, M.A. *et al.* Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- BIZANI, D. *et al.* Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. **int. microbiol.**, v. 8, n. 2, 2005, p. 125-131.
- DAGDELEN, S. *et al.* Volatile Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Herbal Plants Used in the Manufacture of Van Herby (OTLU) Cheese. **Journal Food Processing and Preservation**, v.38, n.4, 2014, p.1716-1725.
- DALL AGNOL, V. *et al.* **Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli***. Anais. IV Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação URI (CONIGTI). Erechim, Rio Grande do Sul, v. 4, 2018, p. 1157 – 1161.
- GOVARIS, A. *et al.* Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese package under modified atmosphere. **Food Science and Technology - LWT**, v. 44, n.4, 2011, p. 1240-1244.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, p. 544.
- MAGRO, M. L. M. *et al.* Las bacteriocinas de las bacterias lácticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria**, Madrid, v. 37, n. 314, 2000, p. 59-66.
- MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52, n. 304, 2005, p. 1-17.
- MOSBAH, H. *et al.* Phytochemical characterization, antioxidant, antimicrobial and pharmacological activities of *Feijoa sellowiana* leaves growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v.112, 2018, p. 521-531.
- NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard--Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- OSTROSKY, E.A. *et al.* Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.18, n.2, 2008.
- OUSSALAH, M. *et al.* Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157. **Food Control**, v. 18, n. 5, 2007, p.414-420
- PROBST, I.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2012.
- SILVA, M. T. N. *et al.* Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 3, 2009, p.257-262.
- SILVEIRA, L. M.S. *et al.* Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.**, v.90, n.2, 2009, p. 124-128.

TRAJANO, V. N. *et al.* Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 3, n. 29, 2009, p.542-545.

YADAV, S. *et al.* *Zingiber officinale* Roscoe: A Monographic Review Research & Reviews: **Journal of Botany**, v.1, n.1, 2012, p.45-50.