

Área: Ciência de Alimentos

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA BRASILEIRA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) VERDE E MADURA FRENTE A BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS

**Guilherme da Silva Dannenberg*, Mariana Almeida Iglesias, Fábio José Mattei,
Barbara Gonçalves, Wladimir Padilha da Silva, Ângela Maria Fiorentini,**

*Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos,
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS*

**E-mail: gui.dannenberg@gmail.com*

RESUMO – A cárie é uma enfermidade da cavidade bucal, que se relaciona indiretamente com os alimentos por ser resultante da ação de bactérias cariogênicas, principalmente *Streptococcus mutans*, sobre resíduos de alimentos. Esta bactéria, juntamente com *Lactobacillus casei*, formam biofilmes dentais e fermentam os carboidratos residuais, produzindo ácidos orgânicos que promovem a desmineralização dos tecidos dentários dando origem a cárie. O tratamento e/ou precaução desta patologia usualmente refere-se à aplicação clínica de antimicrobianos sintéticos, como a clorexidina e o flúor. Embora a relação entre alimentos e cárie seja bem conhecida, comercialmente existem poucos alimentos desenvolvidos visando evitar tal problema. Atualmente muitos estudos tem demonstrado a ação antimicrobiana por substâncias naturais, como os óleos essenciais, que tem ganhado prestígio dentre a população por serem alternativas ao uso dos compostos sintéticos. O presente estudo verificou através da técnica de disco difusão, a ação antimicrobiana de óleo essencial de pimenta brasileira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), nas diferentes etapas de maturação, frutos verdes (OEV) e frutos maduros (OEM), frente às duas bactérias criogênicas, *S. mutans* e *L. casei*. Foi constatado que os óleo essenciais testados apresentaram atividade antimicrobiana frente às duas bactérias. O OEM foi significativamente ($p \leq 0,05$) mais eficaz que o OEV na inibição de *S. mutans*, já a inibição do *L. casei* não foi diferente entre as etapas de maturação. Os resultados encontrados inferem o potencial de aplicação destes óleos essenciais como substâncias naturais anticariogênicas, alternativas ao uso de antimicrobianos sintéticos, e a possibilidade de serem vinculadas a alimentos com tal propósito.

Palavras-chave: pimenta rosa; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus casei*, antagonismo .

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) representam um grande problema de saúde pública e, estão relacionadas à ingestão de alimentos contaminados por toxinas e/ou micro-organismos patogênicos, como as bactérias. No entanto, existem enfermidades que se relacionam indiretamente com os alimentos, como a cárie, que surge devido à ação de bactérias sobre resíduos de alimentos presentes na cavidade bucal. Dentre estas bactérias se atribui a *Streptococcus mutans* a função de iniciar tal processo formando o biofilme dental responsável por mediar a desmineralização dos tecidos dentários denominados de esmalte ou dentina (LOSSO, 2009). A desmineralização propriamente dita é resultante da ação de ácidos orgânicos derivados do metabolismo de carboidratos por bactérias fermentativas, principalmente *S. mutans* e *Lactobacillus casei* (NOGUEIRA, 2007). Tal patologia é considerada mundialmente como um grande problema de saúde pública (MISRA, 2007).

O controle e/ou tratamento da cárie é praticamente restrito a utilização de substâncias sintéticas de aplicação clínica, como a clorexidina, que atua com ação antimicrobiana sobre as bactérias cariogênicas, e o Flúor, que aumenta a resistência do esmalte dentário aos ácidos orgânicos que promovem a desmineralização (ARAÚJO, 2000), não havendo, atualmente, ênfase na pesquisa de substâncias naturais capazes de promover tal ação, e que possibilitem o desenvolvimento de alimentos capazes de minimizar os efeitos da cárie, ou ainda de combater à mesma.

Atualmente muitos estudos tem avaliado a ação antimicrobiana de extratos vegetais, dentre os quais tem se destacado os óleos essenciais (OE), líquidos orgânicos de caráter apolar, geralmente compostos por ésteres fenólicos, ácidos aromáticos e alifáticos, provenientes de terpenos e seus derivados oxigenados. Estas substâncias são naturalmente produzidas pelo metabolismo secundário dos vegetais como mecanismos de defesa, em resposta a condições ambientais adversas (KAVOOSI, 2013).

Para possibilitar uma aplicação tecnológica dos OE a nível industrial, além da sua eficácia, é desejável que exista uma boa disponibilidade da matéria prima, já que o rendimento obtido na extração dos OE's é geralmente baixo. Atendendo a este quesito, encontra-se amplamente difundida na América do Sul a planta *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida como falsa aroeira, pimenta brasileira (PB) ou pimenta rosa.

O presente trabalho objetivou avaliar a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi em dois diferentes estágios de maturação, frente às duas bactérias de maior relevância no processo de formação da cárie, *S. mutans* e *L. casei*, inferindo a possibilidade futura do desenvolvimento de novos produtos alimentares funcionais, atuando no combate a cárie...

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras utilizadas foram coletadas exclusivamente de árvores adultas, botanicamente identificadas como *Schinus terebinthifolius* Raddi, situadas no Campus da Universidade Federal de Pelotas

(UFPEl) na cidade de Capão do Leão/RS, em duas etapas de maturação dos frutos: verde e maduro (coloração vermelha). O procedimento de coleta dos frutos verdes ocorreu no período de maio a junho, e dos maduros entre os meses de junho e julho do ano de 2012. Os frutos foram manualmente separados dos galhos, selecionados e limpos, de modo a descartar frutos desuniformes, assim como remover sujidades, folhas e pedúnculos.

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação em Clevenger, com adaptações da metodologia descrita por Dourado (2012), para tal processo os frutos foram macerados em moinho de bola, e o óleo essencial obtido foi desidratado pela adição de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) seguido de centrifugação a 5000 rpm / 30 segundos, a 4°C.

A cepa de *S. mutans*, codificada como UA 159 (ATCC 700610) foi cedida pela Faculdade de Odontologia/UFPEl e *L. casei* foi cortesia da empresa Global Food.

A atividade antimicrobiana do OE foi avaliada por adaptações da técnica de disco difusão estabelecida por CLSI (2012). As bactérias foram ativadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) por 12 horas a 37°C, e a concentração bacteriana ajustada pela escala 0,5 do padrão de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL) em água peptonada (0,1%), inoculou-se homogênea as bactérias com um swab estéril na superfície de placas de petri com ágar Mueller-Hinton (Oxoid®) com pH $7 \pm 0,2$, em uma espessura padronizada de 4mm. Na sequência foi adicionado um disco de papel filtro (Laborclin®) com 6mm de diâmetro no centro de cada placa, sobre os quais adicionou-se 10µL do OE. As placas foram incubadas em BOD a 37°C, após 24h foi verificado a formação de halos de inibição ao redor dos discos, sendo os mesmos aferidos com paquímetro digital king.tools®. Realizaram-se duas repetições do teste em triplicata.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste tukey ($p \leq 0,05$), com o auxílio do software STATISTICA 8.0. adotando um intervalo de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os OE de pimenta brasileira, nos dois estágios de maturação testados, promoveram inibição ao crescimento das duas bactérias de maior relevância na patologia da cárie, *S. mutans* e *L. casei*, quando aplicados no teste de disco difusão, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Média dos valores obtidos nos halos de inibição conferidos pelos óleos essenciais de pimenta brasileira frente as bactérias cariogênicas.

Bactéria	Halo de inibição (mm)	
	OEV*	OEM**
<i>Streptococcus mutans</i>	31,20 ± 1,67aA	42,62 ± 0,06bA
<i>Lactobacillus casei</i>	34,66 ± 0,76aB	35,19 ± 0,98aB

*Óleo essencial de frutos verdes

**Óleo essencial de frutos maduros

Médias acompanhadas por letra minúscula diferente na linha diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a média dos halos de inibição de cada óleo essencial. Médias acompanhadas por letra maiúscula diferente na coluna diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a média dos halos de inibição entre as duas bactérias.

O OE proveniente de frutos maduros gerou uma zona inibitória média de $42,62 \pm 0,06$ mm, 36,6% maior que a média de $31,20 \pm 1,67$ mm conferidos pelo OE de frutos verdes frente ao *S. mutans*, diferença estaticamente significativa ($p \leq 0,05$). Tal resultado é um indicativo de que ao longo do processo de maturação ocorre uma concentração de compostos bacteriostáticos e/ou bactericidas dentre os constituintes do OE desta espécie. No caso de *L. casei* não existiu diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre a inibição conferida pelos diferentes óleos, indicando que o composto responsável pela ação antimicrobiana permanece com sua integridade e concentração inalterada após a maturação do fruto.

Alguns autores como Gebara (2002), Leitão 2004 e Nogueira (2007) relatam bons resultados para a inibição de *S. mutans* por diferentes óleos essenciais, no entanto em todos estes, os halos inibitórios encontrados foram inferiores aos aferidos no presente estudo, indicando uma maior eficácia da pimenta brasileira sobre este patógeno. Outro ponto relevante de comparação com os estudos citados, é que em nenhum destes os OE foram capazes de inibir o *L. casei*, característica que segundo Nogueira (2007) é fundamental para uma formulação eficaz no tratamento da cárie, e tal resultado foi encontrado em OE de pimenta brasileira, qualificando-a primariamente como um bom antimicrobiano frente às bactérias criogênicas.

4 CONCLUSÃO

Óleo essencial de pimenta brasileira, nas duas etapas de maturação dos frutos testados (verdes e maduros), apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias de maior relevância no processo de formação da cárie, *S. mutans* e *L. casei*. O OEM se mostrou significativamente ($p \leq 0,05$) mais eficaz que o OEV para o *S. mutans*, enquanto que para o *L. casei* se aferiu expressivos halos de inibição, porém, sem diferença estatística entre as etapas de maturação dos frutos. Tais resultados inferem uma potencialidade de aplicação tecnológica destes óleos essenciais visando o controle da cárie.

REFERENCIAS

ARAÚJO, I.C., Odontologia como promoção de saúde. In: Rocha MPC. *Odontologia reabilitadora: noções básicas para o clínico*. São Paulo: Santos; 2000. p.150-70.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved standard - Eleventh Edition*. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

DOURADO, M. T., Óleos essenciais e oleoresina da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): propriedades químicas e biológicas. Tese de Doutorado (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

GEBARA, E. C. E., LIMA L. A., MAYER, M. P. A., Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Braz J Microbiol* 2002; 33:365-9.

KAVOOSI, G., ROWSHAN, V., (2013) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time. *Food Chemistry*, 138, 2180-2187.

LEITÃO, D. P. S., SILVA-FILHO, A. A., POLIZELLO, A. C. M., BASTOS, J. K., SPADARO, A. C. C. Comparative evaluation of *in-vitro* effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *streptococcus mutans*. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(11):1834-9.

LOSSO, E. M., TAVARES, M. C. R., DA SILVA, J. Y. B., URBAN, C. A. Severe early childhood caries: an integral approach. *J Pediatr (Rio J)*. 2009;85(4):295-300.

MISRA, S., TAHMASSEBI, J., BROSMAN, M., EARLY, CHILDHOOD., caries - a review. *Dent Update*. 2007;34:556-8.

NOGUEIRA, M. A., DIAZ, M. G., TAGAMI, P. M., LORSCHIDE, J. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.1, p.93-97, 2007, ISSN 1808-4532.

ROSSI, D., GUERRINI, A., GUGLIELMO, P., BERNACCHIA, G., CONFORTI, F., STATTI, G., MAIETTI, S., POPPI, I., TACCHINI, M., SACCHETTI, G., (2013) *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil as possible mutagen-protective food ingredient against heterocyclic amines from cooked food. *Food Chemistry*, 139, 439-447.