

AValiação DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CARVACROL PARA FUTURA APLICAÇÃO EM EMBALAGEM ATIVA SUSTENTÁVEL

Marcus Túlio Cunha dos Santos Filho¹, Amanda Camilo Graciano¹, Taíla Veloso de Oliveira²,
Rafaela Correa Pereira¹, Clara Suprani Marques^{1,2}

¹Instituto Federal de Minas Gerais - campus Bambuí; ²Universidade Federal de Viçosa

mtcsfilho@gmail.com

RESUMO

O investimento no aprimoramento de tecnologias de embalagens cresceu nos últimos anos. Embalagens ativas (EA), especialmente aquelas incorporadas com compostos bioativos, têm sido o foco de pesquisas, dada a preocupação crescente do consumidor em relação a conservantes sintéticos. A exploração dos óleos essenciais (OE) em embalagens é uma abordagem promissora, dada a ampla gama de propriedades que estes compostos apresentam. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi averiguar a atividade antimicrobiana do composto majoritário do OE de orégano (carvacrol), visando sua futura incorporação em EA. Para tal, foi avaliada a Concentração Mínima Inibitória (MIC) do carvacrol pelo método de microdiluição frente a quatro grupos de microrganismos: bactérias Gram-negativa (*Escherichia coli*); Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*); leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e fungos filamentosos (*Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata*; *Fusarium semitectum* e *Aspergillus niger*). A MIC para as bactérias foi de 375 ppm, ao passo que para leveduras e fungos filamentosos, a MIC encontrada foi de 93,75 ppm, demonstrando um potencial antimicrobiano mais acentuado contra esses grupos de microrganismos. Confirmada a eficácia *in vitro*, o próximo passo do estudo será promover a incorporação do composto em bioplástico ativo à base de soro de leite para futura aplicação na conservação de pão de forma.

Palavras-chave: Carvacrol. Concentração mínima inibitória. Embalagem ativa.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, percebe-se um interesse crescente tanto no meio acadêmico quanto no industrial no estudo e modernização da tecnologia de embalagens (FIROUZ; MOHI-ALDEN; OMID, 2021). Uma abordagem que tem se destacado nos últimos anos é a elaboração de embalagens ativas (EA), que consistem em embalagens incorporadas com aditivos sintéticos e/ou biológicos, que migrarão gradativamente para o alimento (CAICEDO *et al.*, 2023). Dessa forma, é possível reduzir a quantidade de aditivos incorporados diretamente no produto, além de auxiliar na conservação do alimento.

A exploração de compostos bioativos, como óleos essenciais (OE), no setor de embalagem vem ganhando foco nos últimos anos, sobretudo com a preocupação dos consumidores quanto ao uso de conservantes sintéticos (NARASAGOU DR *et al.*, 2020). A aplicabilidade dos OEs como agentes conservantes na área de alimentos fundamenta-se

na ampla gama de propriedades que estes apresentam, como: atividade antibacteriana; antifúngica; inseticida; antiviral e antioxidante (CHAUDHARI; DAS, 2023).

Desta forma, nesse trabalho, objetivou-se a averiguação da atividade antimicrobiana do composto majoritário do OE de orégano, o carvacrol, por meio da determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) pelo método de microdiluição frente a quatro grupos de microrganismos, visando sua futura incorporação em embalagem ativa antimicrobiana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos testados

Foram utilizadas bactérias Gram-negativa e Gram-positiva *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente; levedura *S. cerevisiae*; e fungos filamentosos *R. stolonifer*, *A. alternata*, *F. semitectum* e *A. niger*, cedidas pelo Laboratório de Embalagens da Universidade Federal de Viçosa – UFV. As bactérias e levedura foram ativadas em caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubadas por 24 horas a 37 °C. Em seguida, elas foram plaqueadas em ágar padrão para contagem (PCA) e incubadas por mais 24 horas a 37 °C para obtenção de colônias isoladas. Os fungos filamentosos foram ativados em caldo (BHI) e incubados a 25 °C por 3 dias. Após esse período, realizou-se o plaqueamento desses microrganismos em ágar batata dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico 10% m/v e incubados por mais 7 dias a 25 °C. A padronização dos inóculos foi realizada conforme metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012): colônias isoladas foram suspensas em solução salina, com posterior ajuste de turbidez equivalente ao padrão de 0,5 na escala Mcfarland e diluídas até a concentração desejada.

2.2 Antimicrobiano utilizado e preparo das soluções-estoque

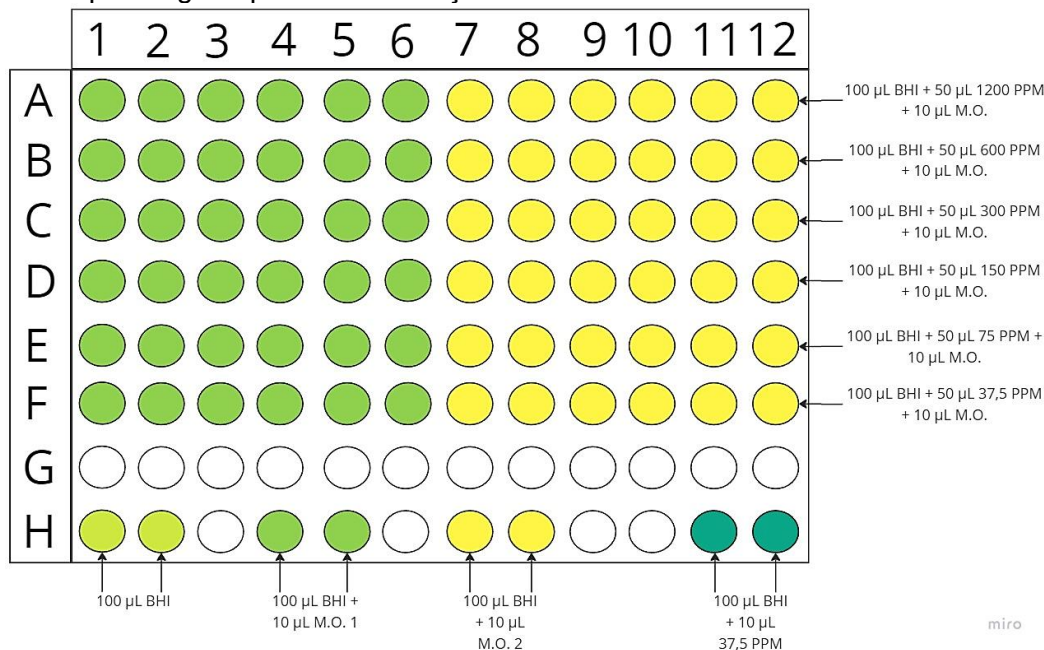
O carvacrol, componente majoritário do óleo essencial de orégano, foi utilizado como agente antimicrobiano. Por meio de diluições seriadas a uma razão de 2, foram preparadas soluções-estoques em concentrações de 1.200 a 37,5 ppm ($\mu\text{L/L}$) de carvacrol diluídos em água, DMSO 10% e Tween 80 0,5%.

2.1 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC)

A determinação da MIC do carvacrol foi realizada pelo método de microdiluição utilizando microplacas com 96 poços conforme metodologia proposta pelo CLSI (CLSI,

2012). A Figura 1 apresenta um esquema geral de como se deu o preparo da microplaca para análise MIC do carvacrol frente a bactérias e leveduras. Outras placas com preparo similar foram usadas também para fungos filamentosos e levedura.

Figura 1 – Esquema geral para determinação da MIC do carvacrol frente a bactérias e levedura



Fonte: Autores, 2023.

Os poços foram completados com 100 µL de caldo BHI e 50 µL de cada solução de carvacrol, sendo que, nos poços, as concentrações do antimicrobiano atingiram os valores de 375 a 11,72 ppm. Em seguida, inoculou-se 10 µL dos inóculos previamente padronizados, que atingiram, em cada poço, a concentração de aproximadamente 5×10^4 UFC/mL, confirmada posteriormente por contagem em placa. Também foram preparados poços controles: caldo BHI puro, para confirmar a esterilidade do meio; caldo BHI e microrganismo, para confirmar a viabilidade dos inóculos; caldo BHI e solução de carvacrol, também para controle de esterilidade.

As placas contendo as bactérias e leveduras foram incubadas a 37 °C por 24 h, ao passo que as placas contendo os fungos filamentosos foram incubadas a 25 °C por 3 dias. O valor de MIC foi considerado a menor concentração de carvacrol capaz de evitar crescimento visível do microrganismo no poço.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da análise de MIC pode ser consultado na Tabela 1.

Tabela 1 – MIC, em ppm ($\mu\text{L/L}$), de carvacrol frente aos microrganismos testados

Concentração de carvacrol no poço (ppm)	Microrganismos						
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>R. stolonifer</i>	<i>A. alternaria</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>A. Niger</i>
375,00	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
187,50	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
93,75	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
46,88	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
23,44	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
11,72	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(+): crescimento visível de microrganismo; (-): sem crescimento visível de microrganismo.

Fonte: Autores, 2023.

Conforme a Tabela 1, a MIC obtida nesse trabalho para *E. coli* e *S. aureus* foi de 375,00 ppm. Diao *et al.* (2022) obtiveram um valor de MIC de 336 ppm contra *E. coli*, ao passo que Santos *et al.* (2016) encontraram um MIC de 312 ppm para *E. coli* e *S. aureus*, valores similares ao que foi verificado no presente estudo.

Os resultados obtidos demonstraram um efeito antimicrobiano mais acentuado do carvacrol contra as cepas de levedura e fungos filamentosos quando comparados às bactérias. Mauriello *et al.* (2021) obtiveram um valor de MIC menor que 500 ppm para *S. cerevisiae*, o que vai ao encontro dos resultados obtidos no presente trabalho. Abbaszadeh *et al.* (2014) obtiveram uma MIC de 50 ppm para *A. niger*, em concordância com os resultados obtidos, ao passo que para *A. alternaria* o MIC encontrando foi de 350 ppm, valor superior ao do presente trabalho. Abbaszadeh *et al.* (2014) avaliaram uma estirpe de *Rhizopus* (*R. oryzae*) e *Fusarium* (*F. oxysporum*) e obtiveram uma MIC de 200 e 125 ppm, respectivamente, valores próximos aos obtidos no presente trabalho.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que o carvacrol é um antimicrobiano com potencial para aplicação em alimentos, tendo em vista que apresentou MIC baixas para todos os microrganismos testados, em especial fungos filamentosos e levedura. Confirmada a eficácia *in vitro*, o próximo passo do estudo será promover a incorporação do composto em bioplástico ativo à base de soro de leite para futura aplicação na conservação

de pão de forma. Espera-se que a EA desenvolvida com carvacrol iniba o desenvolvimento de fungos filamentosos (principais deterioradores do pão de forma), dessa forma estendendo a vida de prateleira do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEH, S. *et al.* Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de mycologie medicale**, v. 24, n. 2, p. e51-e56, 2014.

CAICEDO, C. *et al.* Biobased and Biodegradable Packaging Plastics for Food Preservation. *In: INAMUDDIN; ALTALHI, T. Handbook of Bioplastics and Bio composites Engineering Applications*. 2 ed. Hoboken: WILEY, 2023. p. 383-424.

CHAUDHARI, A. K.; DAS, S. Natural products: origin, biosynthesis, and applications in pharmaceuticals, therapeutics, and food systems. *In: PRAKASH, B.; SÃO JOSÉ, J. F. B. Green Products in Food Safety*. Academic Press, 2023. p. 81-109.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**. 9 ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

DIAO, M. *et al.* Characterization and antibacterial activity study of α -Lactalbumin-carvacrol complex. **Food Chemistry**, v. 397, p. 133820, 2022.

FIROUZ, M. S.; MOHI-ALDEN, K.; OMID, M. A critical review on intelligent and active packaging in the food industry: Research and development. **Food Research International**, v. 141, p. 110113, mar. 2021.

MAURIELLO, E.; FERRARI, G.; DONSI, F. Effect of formulation on properties, stability, carvacrol release and antimicrobial activity of carvacrol emulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 197, p. 111424, 2021.

NARASAGOUDR, Shivayogi S. *et al.* Physico-chemical and functional properties of rutin induced chitosan/poly (vinyl alcohol) bioactive films for food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, v. 109, p. 106096, 2020.

SANTOS, A. R. *et al.* Application of edible coating with starch and carvacrol in minimally processed pumpkin. **Journal of food science and technology**, v. 53, p. 1975-1983, 2016.