

Óleos essenciais: atividade biológica *in vitro* e sua potencial aplicação a embalagens alimentares

Essential oils: *in vitro* biological activity and their potential application to food packaging

Regiane Ribeiro-Santos^{1,2}, Mariana Andrade¹, Nathália Ramos de Melo^{2,3}, Ana Sanches-Silva^{1,4}

ana.silva@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Departamento de Tecnologia Alimentar, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brasil.

(3) Departamento de Engenharia de Agronegócios, Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brasil.

(4) Centro de Estudos de Ciência Animal, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

_Resumo

Os óleos essenciais (OEs) são metabólitos secundários, produzidos por plantas aromáticas e medicinais, com propriedades biológicas interessantes como a capacidade antimicrobiana e antioxidante. Neste trabalho, foi determinada a atividade antimicrobiana e a capacidade antioxidante dos OEs de manjeriço (*Ocimum basilicum*), canela (*Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl e *Cinnamomum zeylanicum* Blume) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). O OE da *C. cassia* mostrou ter a melhor atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Penicillium* spp. enquanto o óleo de *C. Zeylanicum* exibiu a melhor capacidade antioxidante pelo método da captura do DPPH• (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e pelo ensaio do branqueamento do β-caroteno. No entanto, todos os OEs analisados apresentaram boa atividade biológica, revelando um grande potencial para serem aplicados como aditivos naturais, diretamente aos alimentos ou, indiretamente, a embalagens ativas.

_Abstract

Essential oils are secondary metabolites, produced by aromatic and medicinal plant species, with interesting biological properties such as antimicrobial and antioxidant activities. In this research the antimicrobial and antioxidant capacities of the essential oils of basil (*Ocimum basilicum* L.), cinnamon (*Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl and *Cinnamomum zeylanicum*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) were evaluated. *C. cassia* essential oil presented the highest antimicrobial against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Penicillium* spp. while the *C. zeylanicum* essential oil presented the highest antioxidant capacity by the DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) scavenging method and the β-carotene bleaching assay. However, all the analysed essential oils presented high biological activity, revealing a great potential to be applied as food additives, directly to food or, indirectly, to active packaging.

_Introdução

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de substâncias aromáticas voláteis, produzidos naturalmente como metabólitos secundários de diferentes partes das plantas como as folhas, flores, frutos, caules, raízes, rizomas e sementes (1-7).

A composição dos OEs pode variar de acordo com a espécie e parte da planta de que são extraídos, do método de extração e solvente utilizado, das características edafoclimáticas da planta, do estágio de desenvolvimento da planta, entre outros (8-13).

O interesse pelos OEs tem aumentado nas últimas décadas devido à sua comprovada atividade biológica, incluindo a capacidade antimicrobiana e antioxidante (5,14,15).

Muitos dos OEs são reconhecidos como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), podendo ser utilizados nos alimentos e em embalagens alimentares como aditivos naturais a fim de manterem ou melhorarem as propriedades nutricionais e organolépticas dos mesmos, aumentando o seu tempo de prateleira e contribuindo para manter a sua segurança (16-20).

_Objetivo

Neste trabalho foi avaliada a capacidade antimicrobiana e antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais de manjeriço, canela (de duas espécies) e alecrim.

_Material e métodos

Os OEs selecionados para o estudo (tabela 1) foram adquiridos da Ferquima® (Ferquima Indústria e Comércio Ltda, Vargem Grande Paulista, São Paulo).

A atividade antimicrobiana foi analisada através do método de difusão em ágar (21) contra as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 1122), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e o fungo *Penicillium* spp. As culturas bacterianas e os fungos foram



pré-ativados e incubados a 35 °C em Plate Count Agar (PCA), e a 25 °C em Potato Dextrose Agar (PDA), respetivamente.

Um disco de papel de filtro estéril (6 mm de diâmetro, Unifil) impregnado com 3 µL de OE foi colocado no centro das placas de Petri contendo o meio de cultura ágar Mueller- Hinton previamente inoculado com a bactéria (1×10^7 ufc/mL) ou o fungo (10^7 esporos/mL). As placas foram incubadas à temperatura ótima dos microrganismos e após 24 h (bactérias) e 48 h (fungo) foram observados e medidos os halos de inibição.

O método de captação do radical DPPH e o ensaio do branqueamento do β-caroteno foram utilizados para avaliar a capacidade antioxidante dos OEs.

O método utilizado para o ensaio do DPPH• foi adaptado do método descrito por Moure *et al.* (2001). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH• (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha) de concentração $3,6 \times 10^{-5}$ M. A 2 mL da solução metanólica de DPPH• foram adicionados 50 µL de OE. Para os testes controlo foram utilizados 50 µL de metanol. As amostras foram colocadas à temperatura ambiente, protegidas da luz durante 30 min, e em seguida, a sua absorvância foi medida ($\lambda = 515$ nm) num espectrofotómetro (U-2000, Hitachi). A percentagem de inibição (PI) dos OEs foi calculada pela equação 1.

$$PI (\%) = \frac{absC - absA}{absC} \times 100$$

Em que *absC* representa a absorvância da amostra controlo e *absA* representa a absorvância da amostra.

O EC₅₀, ou seja, a concentração que causa uma inibição de 50% do radical DPPH, foi determinado para os OEs com maior capacidade antioxidante (OEs de *C. zeylanicum* e *R. officinalis*). Para tal, prepararam-se diversas diluições dos OEs e determinaram-se as suas respetivas PI. Posteriormente foram traçados gráficos com PI (%) *versus* concentração (mg/mL) e pelo Método dos Mínimos Quadrados foi estabelecida uma equação linear para cada curva, sendo depois possível calcular as concentrações que originaram uma PI (%) igual a 50%, ou seja, o EC₅₀, por interpolação (22-23).

No ensaio do branqueamento do β-caroteno, adaptado do método descrito por Miller (1971), foi realizada uma solução de 0,2 mg/mL de β-caroteno (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha) em clorofórmio. Desta diluição, retirou-se 1 mL ao qual foram adicionados 20 mg de ácido linoleico (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha) e 200 mg de Tween40®. O clorofórmio desta solução foi evaporado a 40 °C a 100 mbar. De seguida, 50 mL de água ultrapura foram adicionados e a solução foi vigorosamente agitada para assegurar a formação de uma emulsão de β-caroteno e ácido linoleico. Para realizar o ensaio, foram adicionados 0,2 mL de diferentes concentrações dos OEs em metanol a 5 mL da emulsão de β-caroteno. As amostras foram aquecidas a 50 °C durante 120 minutos. Após este tempo, a absorvância das amostras foi medida ($\lambda = 470$ nm) num espectrofotómetro (U-2000, Hitachi). As amostras controlo foram preparadas com metanol em substituição dos OEs e a sua absorvância foi medida antes do período de incubação (0 min) e após 120 min de incubação. A Capacidade da Atividade Antioxidante (AAC, *Antioxidant Activity Capacity*) foi calculada através da equação 2.

$$AAC = \frac{AA120 - AC120}{AC0 - AC120} \times 1000$$

Na qual *AA120* representa a absorvância da amostra aos 120 min, *AC0* representa a absorvância do controlo aos 0 min, e *AC120* representa a absorvância do controlo aos 120 minutos.

Todos os testes foram expressos como médias ± desvio padrão de, pelo menos, três repetições. Os valores foram tratados com recurso à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey com um nível de probabilidade de 0,1 e 0,05 para os resultados da capacidade antimicrobiana e antioxidante, respetivamente, utilizando o software STATISTICA® 10.0 (Statsoft Inc. 2325, Tusla, OK).



_Resultados

Os resultados da atividade antimicrobiana dos OEs estão compilados na **tabela 2**. O OE de *C. cassia* apresentou os melhores resultados de atividade antimicrobiana enquanto o OE de *O. basilicum* mostrou reduzida ou inexistente ação contra *E. coli*, *S. aureus* e *Penicillium* spp (**tabela 2**). O OE de alecrim não exibiu atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados.

A *E. coli* e o *S. Aureus* foram inibidos pelos OEs provenientes das duas espécies de canela. O fungo apresentou suscetibilidade a todos OEs testados, exceto ao de alecrim (**tabela 2**).

Relativamente à capacidade antioxidante dos óleos (**tabela 3**), o OE de *C. zeylanicum*, exibiu o maior resultado pelo ensaio do radical DPPH e do branqueamento do β -caroteno seguido pelos óleos de *R. officinalis*, de *C. cassia* e, por fim, pelo óleo de *O. basilicum*.

Tabela 1: Descrição dos óleos essenciais disponibilizada pelo fabricante.

Planta aromática	Nome científico	Parte da planta utilizada para preparar os OEs
Manjerição	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Folhas
Canela	<i>Cinnamomum cassia</i> (L.) J. Presl	Caule, casca e folhas
	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	Folhas
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Folhas

Tabela 2: Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (adaptado de Ribeiro-Santos *et al.*, 2017).

Óleos essenciais	Diâmetro médio da zona de inibição (cm) ⁽¹⁻³⁾		
	<i>Escherichia coli</i> (Gram-negativa)	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram-positiva)	<i>Penicillium</i> spp
<i>O. basilicum</i>	0,135 ± 0,03 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,342 ± 0,003 ^a
<i>C. cassia</i>	1,035 ± 0,19 ^b	1,85 ± 0,31 ^b	4,292 ± 0,26 ^b
<i>C. zeylanicum</i>	0,415 ± 0,05 ^c	0,775 ± 0,06 ^c	3,192 ± 0,19 ^c
<i>R. officinalis</i>	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a

a) Não inclui o diâmetro do disco de 0,6 cm.

b) Os resultados obtidos são a média dos testes ± desvio padrão, n=3.

c) As médias, dentro da mesma coluna, que apresentem a mesma letra, não apresentam diferenças significativas (p > 0,1) pelo Teste de Tukey.

Tabela 3: Capacidade antioxidante dos óleos essenciais ^(1,2) (adaptado de Ribeiro-Santos *et al.*, 2017).

Óleos essenciais	DPPH• (PI %)	DPPH• [EC ₅₀ (mg/mL)]	Branqueamento do β -caroteno (AAC)
<i>O. basilicum</i>	26,6 ± 1,80 ^a	nd	8,88 ± 0,33 ^a
<i>C. cassia</i>	44,8 ± 1,37 ^b	nd	8,94 ± 2,26 ^a
<i>C. zeylanicum</i>	*	0,14 ± 0,00 ^a	927 ± 3,62 ^b
<i>R. officinalis</i>	80,2 ± 0,28 ^c	38,5 ± 0,51 ^b	68,3 ± 17,4 ^c

a) Os resultados obtidos são a média dos testes ± desvio padrão, n=3.

b) As médias, dentro da mesma coluna, que apresentem a mesma letra, não apresentam diferenças significativas (p > 0,05) pelo Teste de Tukey.

* superior a 100%; nd - não determinado.



_Discussão

Em geral, as bactérias Gram negativo, como a *E. coli*, são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que as bactérias Gram positivo, devido à complexidade da dupla membrana celular comparativamente com a membrana simples das bactérias Gram positivo. No caso da *E. coli*, esta bactéria tem uma parede celular externa constituída por lipopolissacarídeos, o que torna mais difícil a penetração dos componentes dos OEs (3, 25).

Os resultados encontrados para o OE de alecrim estão de acordo com os resultados encontrados por Teixeira *et al.* (26). No entanto são diferentes dos resultados encontrados por Mathlouthi *et al.* (27) nos quais foi observada atividade antimicrobiana do OE de alecrim contra *E. coli* e *S. aureus*.

Bozin *et al.* (28) encontraram resultados semelhantes ao deste trabalho para a mesma espécie de manjeriço.

No que diz respeito à capacidade antioxidante, os resultados encontrados para o OE de canela estão de acordo com os resultados obtidos por Prasad *et al.* (29).

Não obstante, é de salientar que os OEs são misturas de substâncias bastante heterogêneas e as suas atividades biológicas devem-se a um componente maioritário e a efeitos sinérgicos e/ou antagonistas dos seus componentes, que são de carácter bastante variável e dependem não só das espécies das plantas, mas também do método de extração e parte da planta utilizados (30,31).

_Conclusão

O óleo essencial de canela, e em particular, o óleo proveniente da espécie *C. cassia*, foi o que apresentou maior atividade antimicrobiana. Por outro lado, o óleo proveniente da espécie *C. zeylanicum* foi o que apresentou maior capacidade antioxidante. Os óleos essenciais estudados, utilizados individualmente ou em combinação, são uma ótima alternativa aos aditivos sintéticos uma vez que possuem capacidade antioxidante e/ou antimicrobiana, podendo ser adicionados diretamente aos alimentos ou podem ser incorporados em embalagens alimentares ativas com o objetivo de prolongar a vida útil dos alimentos.

Referências bibliográficas:

- (1) Nakatsu T, Lupo AT, Chinn JW, et al. Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies Nat Prod Chem* 2000;21(Part B):571-631.
- (2) Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2004;35(4): 275-80. www.scielo.br/pdf/bjm/v35n4/v35n4a01.pdf
- (3) Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94(3):223-53.
- (4) Dvaranauskaitė A, Venskutonis PR, Raynaud C, et al. Variations in the essential oil composition in buds of six blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars at various development phases. *Food Chem.* 2009;114(2):671-9.
- (5) Aidi Wannes W, Mhamdi B, Sriti J, et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(5):1362-70.
- (6) Lv J, Huang H, Yu L, et al. Phenolic composition and nutraceutical properties of organic and conventional cinnamon and peppermint. *Food Chem.* 2012;132(3):1442-50.
- (7) Hill LE, Gomes C, Taylor TM. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Sci Technol.* 2013;51(1):86-93.
- (8) Khajeh M, Yamini Y, Bahramifar N, et al. Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chem.* 2005;91(4):639-44.
- (9) Elzaawely A, Xuan T, Koyama H, et al. Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. *Food Chem.* 2007;104(4):1648-53.
- (10) Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *Int J Food Microbiol.* 2012;156(1):7-17.
- (11) Riahi L, Elferchichi M, Ghazghazi H, et al. Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. *Ind Crops Prod.* 2013;49:883-9.
- (12) Costa DC, Costa HS, Albuquerque TG, et al. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends Food Sci Technol.* 2015;45(2):336-54.
- (13) Ribeiro-Santos R, Carvalho-Costa D, Cavaleiro C, et al. A novel insight on an ancient aromatic plant: the rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends Food Sci Technol.* 2015;45(2):355-68.
- (14) Brahmi F, Abdenour A, Bruno M, et al. Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Ind Crops Prod.* 2016;88:96-105.
- (15) Seydim AC, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res Int.* 2006;39(5):639-44.
- (16) Food And Drug Administration. Code of Federal Regulations (CFR) Title 21 - Food and Drugs. Chapter I - Food Drug Adm Dep Heal Hum Serv. Subchapter B - Food for human consumption. Part 182 - Substances generally recognized as safe [Em linha]. [consult. 22/12/2016]. www.law.cornell.edu/cfr/text/21/part-182
- (17) Keshvari M, Asgary S, Jafarian-Dehkordi A, et al. Preventive effect of cinnamon essential oil on lipid oxidation of vegetable oil. *ARYA Atheroscler.* 2013;9(5):280-6.
- (18) Dussault D, Vu KD, Lacroix M. In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Sci.* 2014;96(1):514-20.
- (19) Szczepanski S, Lipski A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control.* 2014;36(1):224-9.
- (20) Echegoyen Y, Nerin C. Performance of an active paper based on cinnamon essential oil in mushrooms quality. *Food Chem.* 2015;170:30-6.
- (21) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests (Approved standard). 8th ed. Wayne, Pa: NCCLS, 2003 (Document M2-A8).
- (22) Cruz JM, Domínguez H, Parajó JC. Anti-oxidant activity of isolates from acid hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. *Food Chem.* 2005;90(4):503-11.
- (23) Cruz JM, Conde E, Domínguez H, et al. Thermal stability of antioxidants obtained from wood and industrial wastes. *Food Chem.* 2007;100(3):1059-64.
- (24) Miller HE. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc.* 1971;48(2):91-101.
- (25) Zinoviadou KG, Koutsoumanis KP, Biliaderis CG. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Sci.* 2009;82(3):338-45.



artigos breves_ n. 7

- 26) Teixeira B, Marques A, Ramos C, et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Ind Crops Prod.* 2013;43(1):587-95.
- 27) Mathlouthi N, Bouzaienne T, Oueslati I, et al. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: in vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *J Anim Sci.* 2012;90(3):813-23.
- 28) Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem.* 2006;54(5):1822-8.
- 29) Prasad KN, Yang B, Dong X, J, et al. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2009;10(4):627-32.
- 30) Singh G, Maurya S, DeLampasona MP, et al. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(9):1650-61.
- 31) Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, et al. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control.* 2013;31(1):189-95.
- 32) Ribeiro-Santos R, Andrade M, de Melo NR, et al. Biological activities and major components determination in essential oils intended for a biodegradable food packaging. *Ind Crops Prod.* 2017;97:201-10.