



Filme biodegradável contendo nisina e óleo essencial de cardamomo contra *Staphylococcus aureus*

Biodegradable film containing nisin and cardamom essential oil against *Staphylococcus aureus*

Gabriel José Couto¹, Luana de Carvalho², Luciana Furlaneto Maia³

RESUMO

O uso de embalagens antimicrobianas tem como finalidade atuar como barreira contra microrganismos. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um filme biodegradável à base de amido de mandioca, acrescido com nisina e óleo essencial de cardamomo, para controlar a bactéria *Staphylococcus aureus*. Foram testados 4 protocolos, com diferentes concentrações de amido e glicerol, como agente plastificante. O óleo de cardamomo e a nisina foram adicionados na proporção de 5 mL e 5%, respectivamente. A formação do filme foi feita pela técnica de *casting*. A atividade antimicrobiana do filme foi testada em superfície do meio de cultura inoculado da bactéria e realizado o teste de curva de morte em cultura líquida. Foram realizados os testes de inchaço, transparência biodegradação. A melhor concentração de amido e glicerol foi 3% e 1,5 mL/100mL, respectivamente. O filme apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. O filme apresentou degradação após 20 dias. O filme com cardamomo apresentou alteração de cor em relação ao de nisina. O filme controle apresentou maior retenção de água em comparação com o controle. Concluímos que o filme biodegradável acrescido com nisina e óleo essencial de cardamomo inibiu significativamente a ação de *S. aureus* podendo ser uma alternativa para indústria de alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: bacteriocina; *Elettaria cardamomum*; estafilococos

ABSTRACT

The use of antimicrobial packaging is intended to act as a barrier against microorganisms. This work aimed to develop a biodegradable film based on cassava starch, added with nisin and cardamom essential oil, to control the *Staphylococcus aureus* bacteria. Four protocols were tested, with different concentrations of starch and glycerol as a plasticizing agent. Cardamom oil and nisin were added at 5 mL and 5%, respectively. The formation of the film was done by the casting technique. The antimicrobial activity of the film was tested on the surface of the inoculated culture medium of the bacteria and the death curve test was performed in liquid culture. Swelling, transparency and biodegradation tests were carried out. The best concentration of starch and glycerol was 3% and 1.5 mL/100mL, respectively. The film showed antimicrobial activity against *S. aureus*. The film showed degradation after 20 days. The cardamom film showed color change in relation to the nisin film. The control film showed greater water retention compared to the control. We conclude that the biodegradable film added with nisin and cardamom essential oil significantly inhibited the action of *S. aureus* and could be an alternative for the food industry.

KEYWORDS: bacteriocin; *Elettaria cardamomum*; staph

INTRODUÇÃO

Abundantes sistemas de embalagens estão sendo desenvolvidas com o propósito de interatuar de forma desejável com o alimento. Os mesmos são denominados de embalagens ativas e/ou inteligentes, sendo importantes para a conservação de alimentos. (MULLER, 2016).

¹ Voluntário. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR, Brasil. E-mail: gabriel.jcouto12@gmail.com. ID Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8580631272182193>

² Mestre em Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR, Brasil. E-mail: luanamedvet23@gmail.com. ID Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4351545706913104>

³ Docente no Curso de Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR, Brasil. E-mail: lucianamaia@utfpr.edu.br. ID Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6007117281861512>



Os filmes antimicrobianos têm a liberação controlada do aditivo antimicrobiano garantindo a segurança alimentar para o consumidor, pois não são adicionados diretamente no alimento (ROSA & FRANCO, 2002). Portanto, a adição de agentes antimicrobianos em filmes biodegradáveis garante uma redução ou inibição de patógenos alimentares, prolongam a vida útil do alimento, trazendo consigo propriedades para proporcionar um alimento seguro e conseqüentemente mais saudável (ROSA & FRANCO, 2002).

A nisina atua na membrana citoplasmática, permeabilizando as membranas das células sensíveis por meio da formação de poros, causando o desbalanço iônico e fluxo de íons fosfato (OGAKI et al., 2015).

O cardamomo (*Elettaria cardamomum*) é composto por fitoquímicos como esteróis, ácidos fenólicos, lipídios, amido, flavonóides, proteínas e óleo essencial, apresentando eficiência como antimicrobiano (SEPÚLVEDA, 2020).

S. aureus é considerado um patógeno de veiculação alimentar por produzir uma enterotoxina que causa vômito e diarreia (SILVA, 2018).

Em vista disso, este trabalho teve como objetivo desenvolver um filme biodegradável antimicrobiano, sintetizado através de amido de mandioca, acrescido com bacteriocina e óleo essencial de cardamomo, com a finalidade de produzir um filme com propriedades antimicrobianas contra *S. aureus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAL QUÍMICO E BIOLÓGICO

O amido de mandioca foi obtido no comércio local da cidade de Londrina -PR. O óleo de cardamomo (*Elletaria cardamomum*) foi adquirido no comércio especializado. O agente plastificante glicerol foi comprado na empresa Dinâmica. A nisina foi utilizada na concentração de 2,5 mg/mL. O meio Brain Heart Infusim – BHI foi da marca Himedia.

O isolado de *S. aureus* ATCC 29213 pertence à bacterioteca do laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada da UTFPR. O isolado estava conservado em glicerol em freezer – 80 °C.

TESTE ANTIMICROBIANO DO ÓLEO DE CARDAMOMO E NISINA

O óleo de cardamomo e a solução nisina foi testado com *S. aureus*, pela técnica de poço difusão. Uma suspensão do microrganismo testado (10^6 células/mL) foi espalhada na superfície do meio BHI. Foram feitos poços no ágar e em cada poço foi depositado 30 µL de óleo ou solução nisina, diluídos em água (v/v). As placas foram incubadas a 37 °C por 24h.

DESENVOLVIMENTO DO FILME BIODEGRADÁVEL DE AMIDO CONTENDO NISINA E ÓLEO DE CARDAMOMO

A produção do filme foi através da técnica de *casting*. Para tanto, foram desenvolvidos 4 tratamentos diferentes. A diferença entre os tratamentos constou da quantidade de amido e glicerol utilizado. Protocolo 1: amido de mandioca (3%); 90 mL de água destilada estéril; 10 mL de glicerol; Protocolo 2: 3% de amido; 100 mL de água destilada estéril; 2 g de sacarose; 1 mL de glicerol; Protocolo 3: 3% de amido de mandioca; 100 mL de água destilada estéril; 1,5 mL de glicerol e Protocolo 4: 4% de amido de mandioca; 100 mL de água destilada estéril; 2 mL de glicerol.

Em todos os protocolos foram adicionados 5% de nisina ou 5 mL do óleo de cardamomo.



ATIVIDADE MICROBIANA DO FILME BIODEGRADÁVEL

Os filmes contendo cardamomo, nisina e o filme controle, foram recortados em pedaços de aproximadamente 1,0 x 1,0 cm; os pedaços foram colocados na superfície do ágar BHI inoculados com *S. aureus* (concentração 1×10^6 células/mL). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, foi observado a formação de halo de inibição ao redor das colônias. Para a curva de morte, os pedaços de filme foram depositados em tubo de ensaio contendo uma cultura de *S. aureus* (concentração 1×10^6 células/mL). Nos tempos 0, 6, 8, 10 e 24 h, foi retirado uma alíquota para contagem de UFC (Unidade Formadora de Colônia). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC.

TESTE DO INTUMESCIMENTO

As amostras de filme, com cardamomo, nisina e controle, foram cortadas em quadrados e pesados. Em seguida foram imersos em solução aquosa de NaCl 0,1 M por 30 min a 25 °C, secos em papel de filtro e pesados novamente. A taxa de intumescimento (MC) foi calculada usando a Equação 1:

$$SW (\%) = [(M_f - M_i) / M_i] \times 100 \quad (1)$$

Onde: Sw (%) é a porcentagem de intumescimento; M_f é o peso da amostra intumescida e M_i é o peso da amostra seca.

TRANSPARÊNCIA DO FILME E BIODEGRADAÇÃO DO FILME

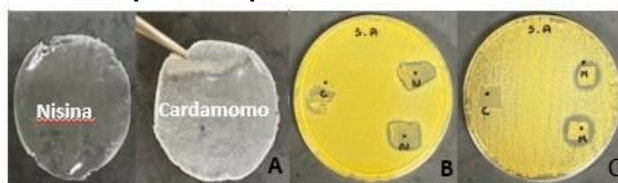
Os filmes contendo cardamomo, nisina e controle, foram cortados em pedaços de 2x 2 cm, e colocados sobre letras impressas em negrito. A imagem foi capturada em câmera de celular.

Para avaliação da biodegradação dos filmes formados, pedaços do filme foram colocados sobre solo em placa de Petri, mantido à temperatura ambiente e observado diariamente, por 20 dias.

RESULTADO E DISCUSSÃO

No teste antimicrobiano contendo óleo essencial de cardamomo foi observada a formação de halos de inibição, comprovando sua ação inibitória contra atividade do microrganismo *S. aureus*. Foram testados 4 tratamentos de filmes, contudo o tratamento 3 apresentou melhores resultados visual e palpável. A Figura 1 (A) apresenta o filme formado com adição de nisina e cardamomo. Observa-se que o filme teve sua remoção fácil da placa de Petri, apresentando estabilidade ao rompimento. No estudo desenvolvido por Lapa (2020) o filme quando removido facilmente do recipiente é devido a capacidade de formação de gel.

Figura 1 – (A) Filme de amido de mandioca acrescido de nisina e óleo essencial de cardamomo; (B) e (C) halo de inibição de *S. aureus* em filme com nisina e cardamomo, respectivamente. A letra C nas placas representa o controle.



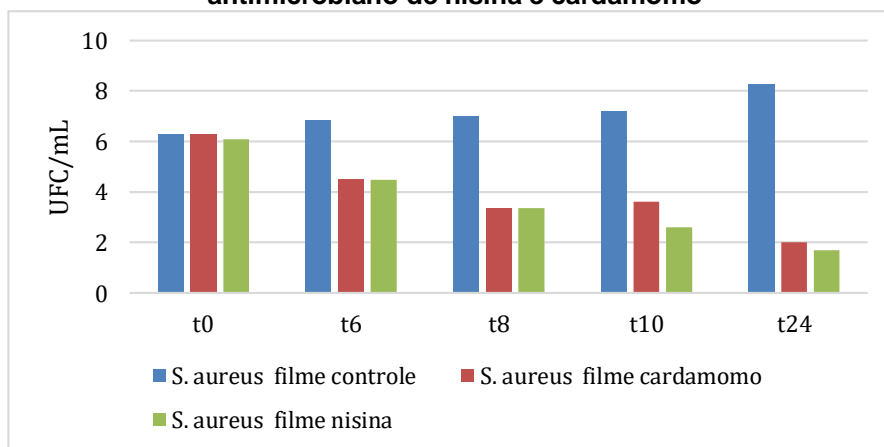
Fonte: Autoria própria.



As Figuras 1 B e C mostram o halo de inibição formado ao redor do filme contendo nisina e cardamomo, respectivamente. A curva de morte do patógeno alimentar *S. aureus* foi realizada a partir do filme biodegradável adicionado de óleo essencial de cardamomo e nisina. A partir da formação de colônias foram realizados os cálculos de UFC. Na figura 2 foi possível observar que no tempo 6 horas (T6) já ocorreu diminuição da contagem de células bacterianas, mantendo essa diminuição até 24 hs.

No teste de intumescimento foi possível constatar que o filme controle teve maior absorção da solução com Sw de 48,48 % e conforme foram adicionados nisina e cardamomo essa absorção diminuiu, onde Sw nisina foi de 42,00% e cardamomo 41,50% (onde Sw é a porcentagem do intumescimento). Enquanto quando adicionado os aditivos podem ter influenciado nessa interação com a água. O filme com nisina e cardamomo teve baixa rugosidade e alteração na cor, mantendo sua transparência quando comparado ao controle.

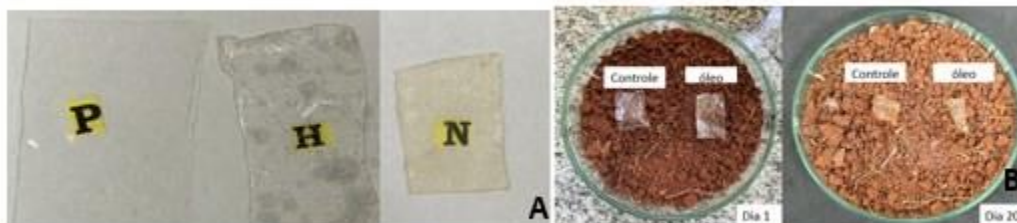
Figura 2 – Gráfico de morte *Staphylococcus aureus* na presença e ausência do filme antimicrobiano de nisina e cardamomo



Fonte: Autoria própria.

A Figura 3 (B) apresentam as imagens da biodegradabilidade do filme em solo. Esse processo foi observado visualmente e após 20 dias, foi possível concluir que o filme controle foi inteiramente degradado pelo solo e o filme com aditivos ainda continha partes para se degenerar, partes estas que ao toque já estavam quebradiças e quase degradadas por completo, Mueller (2016) relatou a boa degradabilidade de filmes a base de amido de mandioca.

Figura 3 – Teste de transparência do filme com nisina e cardamomo (A); Teste de biodegradabilidade do filme controle de incorporado com cardamomo (B)



Fonte: Autoria própria.



CONCLUSÃO

Conforme os resultados apresentados e discutidos, foi possível analisar que o filme acrescido com estes ingredientes é eficiente, inibindo o desenvolvimento do microrganismo *S. aureus*, o mesmo tendo potencial de biodegradabilidade, transparência e intumescimento adequados e possibilitando o uso da bacteriocina e óleo essencial de cardamomo como conservantes naturais de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à UTFPR pelo incentivo à pesquisa (eital PROPPG 07/2022). Luana de Carvalho agradece à Capes pela concessão de bolsa do mestrado.

CONFLITO DE INTERESSE

“Não há conflito de interesse”.

REFERÊNCIAS

LAPA, L. S. S. et al. Aplicação das análises espectroscópicas e termogravimétricas em filmes biodegradáveis de amido de milho incorporados com extrato de própolis verde. **ForScience**, v. 8, n. 2, e00712, jul./dez. 2020. DOI: 10.29069/forscience.2020v8n2.e712.

MÜLLER, P. S. **Desenvolvimento de embalagem ativa biodegradável de amido de pinhão e de mandioca com antioxidantes e antimicrobianos naturais para conservação de manteiga orgânica**. 2016. 170f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)– Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; FURLANETO-MAIA, L. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 18, n. 4, p. 267-276, out-dez 2015.

ROSA, C. M.; FRANCO, B.D.G.M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **ConScientiae Saúde**. São Paulo, n. 1, p. 1-8. 2002.

SEPÚLVEDA, S. F. P. **Estudio de la composición química y actividad biológica de aceites esenciales de Cardamomo (*Elettaria cardamomum*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*)**. 2020. 91f. Trabajo de grado para optar el título de Química Ambiental. Universidad Santo Tomás, Bucaramanga, 2020.

SILVA, C.M.R. **Potencial da nisina no controle de *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA) e sensível (MSSA) à meticilina**. 2018, f 63,. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária)- Programa de Pós Graduação em Biologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2018.