

O efeito da pimenta do reino preta moída frente a contaminação *in vitro* com *Salmonella* Rubislaw.

The effect in vitro of ground black pepper on contamination with *Salmonella* Rubislaw

Christiane A. RISTORI^{1*}
Marco A. dos S. PEREIRA¹
Dilma S. GELLI¹

RIALA6/929

Ristori, C. A., Pereira, M. A. dos S., Gelli, D. S. O efeito da pimenta do reino preta moída frente a contaminação *in vitro* com *Salmonella* Rubislaw. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2): 131-133, 2002

RESUMO. As especiarias e seus derivados têm sido usados no preparo de alimentos há milhares de anos, conferindo-lhes sabor e aroma diferenciados. A ação inibitória das especiarias e seus extratos nos diferentes microrganismos tem sido relatada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antibacteriana da pimenta do reino preta moída (*Piper nigrum* L.) e de seu óleo essencial frente a uma cepa de *Salmonella* Rubislaw. Os efeitos da pimenta e seu óleo adicionados em meios de cultura foram avaliados em dois experimentos. No primeiro foram preparados dois tipos de meio de cultura sólidos, um com 1% de pimenta do reino e o outro com 1% de óleo essencial diluído em etanol, adicionados de caldo tripticase de soja (TSB) e ágar. As sementeiras foram feitas em superfície de diluições decimais (10^{-1} até 10^{-7}) da cepa de *S. Rubislaw*, em fase estacionária. Após a incubação a 35°C durante 24 a 48h, procedeu-se a contagem das colônias. No segundo experimento, 1mL da diluição 10^{-3} da mesma cepa, em fase estacionária, foi adicionada a 100mL de TSB com o óleo diluído em etanol, para uma concentração final de 100µg/mL. Após 24h de incubação a 35°C foram realizadas contagens padrão em placas. Os resultados obtidos nos experimentos não demonstraram efeito inibitório da pimenta do reino preta moída e de seu óleo essencial na cepa estudada.

PALAVRAS-CHAVES. pimenta do reino preta moída, *Salmonella* Rubislaw, atividade antibacteriana

¹ Instituto Adolfo Lutz Central – São Paulo, S.P. Seção de Microbiologia Alimentar

* Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – São Paulo – SP

As especiarias e seus derivados têm sido usados no preparo de alimentos há milhares de anos, conferindo-lhes sabor e aroma diferenciados. O Brasil é o segundo maior produtor de pimenta no mundo⁵, sendo que um dos componentes que contribuem para aumentar o seu valor como condimento é o seu óleo essencial. A ação inibitória das especiarias e seus extratos nos diferentes microrganismos tem sido relatada em diversos estudos^{1,2,4,8,9}.

O interesse renovado no uso de especiarias como agentes antibacterianos é atribuído basicamente a duas razões: (1) a segurança dos aditivos químicos é constantemente questionada havendo uma tendência ao uso de substâncias naturais de plantas; (2) a redução do sal ou do açúcar em alimentos por razões dietéticas tende a aumentar o uso de outros temperos⁶.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antibacteriana da pimenta do reino preta moída (*Piper Nigrum* L.) e do seu óleo essencial frente a uma cepa de *Salmonella* Rubislaw.

Nesse estudo foi utilizada cepa de *S. Rubislaw*, obtida de pimenta, por ter sido este sorotipo o mais freqüentemente isolado em amostras deste produto, analisadas pela Seção de Microbiologia Alimentar, do Instituto Adolfo Lutz Central. A cultura da cepa, em fase estacionária, foi obtida em caldo BHI (Brain Heart Infusion) a 35°C por 18-24h (cerca de 10⁹ UFC/mL),

Foram realizados dois experimentos, baseados nos testes de Beuchat¹, um com meios de cultura sólidos e outro, em caldo. Beuchat testou a sensibilidade do *Vibrio parahaemolyticus* frente especiarias secas adicionadas em meios de cultura nas concentrações finais de 0.1-1.0% e seus óleos essenciais nas concentrações finais de 10 e 100 µg/mL. De acordo com os resultados apresentados no referido trabalho, foram escolhidas as concentrações mais altas de 1% e 100 µg.

No presente estudo, o primeiro experimento foi realizado preparando-se dois meios de cultura, um adicionado de 1% de pimenta do reino preta moída de três marcas diferentes (A, B e C) e o outro com 1% de óleo essencial de pimenta do reino preta diluído em etanol absoluto. O meio de cultura base foi: 3 g de caldo tripticaseína de soja (TSB) em pó e 1g de ágar para solidificação em 100mL de água destilada. O controle negativo dos meios foi realizado sem adição do óleo essencial ou pimenta, isto é, apenas o meio base sem adição. Após a esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos, o meio foi distribuído em placas de Petri (15-18mL/placa). Foram feitas diluições decimais até 10⁻⁷ da cultura de *S. Rubislaw*, em fase estacionária, em água peptonada tamponada a 1%. De cada diluição 0,1mL foi semeado em superfície de placas de Petri (7 placas) contendo o meio

sólido preparado anteriormente. As placas foram incubadas em estufa a 35°C e as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) contadas após 24 e 48h de incubação.

No segundo experimento, o óleo essencial foi diluído em etanol (0,1mL de óleo para 10mL de etanol) e uma alíquota de 0,1mL dessa solução foi adicionada em 100mL de TSB resultando em uma concentração final de 100µg de óleo por mL. Como controle, o etanol puro foi adicionado ao TSB. Alíquotas de 1mL da cultura de *S. Rubislaw* diluída até 10⁻³ foram inoculadas em TSB adicionado do óleo e no TSB controle. Após incubação do caldo a 35°C por 18/24h, foi retirada uma alíquota de 1mL para ser realizada a contagem padrão em placas, de acordo com SWANSON et al.¹¹.

Cada experimento foi repetido três vezes. Os resultados não demonstraram diferença significativa entre os meios controles e os meios testes, mostrando assim que a pimenta do reino moída e o seu óleo essencial não foram eficientes para inibir o desenvolvimento de *S. Rubislaw*, quando em concentrações de 1% (experimento 1 – Tabela 1) e 100µg/mL (experimento 2 – Tabela 2).

A composição do óleo essencial de pimenta é complexa⁵. É importante ressaltar que os níveis dos compostos que possuem ação antibacteriana podem variar em função da espécie de pimenta, das condições de cultivo da mesma e da forma de extração, o que afeta diretamente a atividade inibitória do óleo essencial². Os componentes dos óleos essenciais exercem atividade antibacteriana por 1) interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular por aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; 2) alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos, incluindo aqueles envolvidos na produção de energia celular e síntese de componentes estruturais e 3) inativação ou destruição do material genético⁸.

Alguns fatores citados por diferentes autores podem explicar os resultados obtidos no presente trabalho: a quantidade de óleo essencial presente na pimenta pode variar²; o óleo essencial pode não se solubilizar de forma adequada⁷, a variação na composição do óleo em função das condições de cultivo¹⁰. Além disso, estudos têm demonstrado que, de maneira geral, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação do óleo essencial^{3,4,9}.

Observa-se que nesse estudo foi testada apenas uma cepa e sorotipo de *Salmonella* e que pode existir diferença no comportamento de outras cepas, assim como de sorotipos, no que se refere à sensibilidade frente a estes compostos naturais.

Tabela 1 – Contagem padrão (UFC/mL) e número (em Log10) de *S. Rubislaw* em meio de cultura adicionado de três tipos de pimenta do reino preta moída e de seu óleo essencial na concentração final de 1%.

CEPA	MEIOS DE CULTURA SÓLIDOS				
	TSB controle	TSB + pimenta (Amostra A)	TSB + pimenta (Amostra B)	TSB + pimenta (Amostra C)	TSB + óleo essencial
<i>S. Rubislaw</i>	1,6x10 ⁹	8,8x10 ⁸	2,2x10 ⁸	3,9x10 ⁸	3,0x10 ⁹
UFC/mL					
(Log 10)	(9,20)	(8,94)	(8,34)	(8,59)	(9,48)

Tabela 2 - Contagem padrão (UFC/mL) e número (em Log₁₀) de *S. Rubislaw* em meio de cultura adicionado de óleo essencial de pimenta do reino moída preta em concentração de 100µg/mL.

CEPA	MEIOS DE CULTURA LÍQUIDOS	
	TSB controle	TSB + óleo essencial
<i>S. Rubislaw</i>	9,0x10 ⁸	1,1x10 ⁹
UFC/mL		
(Log 10)	(8,95)	(9,04)

RIALA6/929

Ristori, C. A., Pereira, M. A. dos S., Gelli, D. S. The effect in vitro of ground black pepper on contamination with *salmonella* rubislaw. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(2):131-133, 2002

ABSTRACT. Spices and their derivatives have been used in food housekeeping for thousands of years, bringing about differentiated flavor and aroma. Inhibitory action of the spices and their extracts on the different microorganisms has been reported. The objective of this work was to evaluate the antibacterial action of the ground black pepper (*Piper nigrum* L.) and of its essential oil on *Salmonella* Rubislaw strain culture. The effect of the pepper and its oil addition in culture medium was evaluated in two experiments. In the first one two types of solid culture medium had been prepared, one with 1% of ground black pepper and the other with 1% ethanol oil solution, added to broth tripticase soy (TSB) and agar. Sowings of dilutions (10⁻¹ up to 10⁻⁷) of the *Salmonella* strain, in stationary phase had been made in agar surface. After incubation at 35°C for 24/48h, standard count method was carried out. In a second experiment, 1mL of the same strain dilution 10⁻³, in stationary phase, was added to 100ml of TSB with the oil diluted in ethanol, to a final concentration of 100µg/mL. Standard count was carried out after 24h of incubation at 35°C. The results gotten in the experiments had not demonstrated inhibitory effect of the ground black pepper and its essential oil for the studied strain.

KEY WORDS: ground black pepper, *Salmonella* Rubislaw, antibacterial activity

REFERÊNCIAS

1. Beuchat, L.R. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. **J. Food Sci.** 41:899-902,1976.
2. Deans, S.G.; Ritchie, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **Int. J. Food Microbiol.** 5:165-180,1987.
3. Dorantes, L. et al. Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. **Int. J. Food Microbiol.** 57:125-128,2000.
4. Farag, R.S. et al. Antimicrobial Activity of Some Egyptian Spice Essential Oils. **J. Food Protect.** 52 (9):665-667, 1989.
5. Ferreira, S.R.S. et al. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **J. Superc. Fluids** 14:235-245, 1999.
6. Ismaiel, A.; Pierson, M.D. Inhibition of Growth and Germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by Essential Oil of Spices. **J. Food Sci.** 55(6): 1676-1678,1990.
7. Juven, B.J. et al. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **J. Appl. Bacteriol.** 76:626-631,1994.
8. Kim, J.M. et al. Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol against *Salmonella typhimurium* in Culture Medium and on Fish Cubes. **J. Food Sci.** 60(6):1364-1368,1995.
9. Ouattara, B. et al. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **Int. J. Food Microbiol.** 37:155-162,1997.
10. Sivropoulou, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **J. Agric. Food Chem.** 44:1202-1205,1996.
11. Swanson, K.M.J. et al. "Colony count methods". In: Vanderzant, C. & Splittstoesser, D.F., ed. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, Washington, D.C.; 1992, p.75-95.

Recebido em 27/02/2002; Aprovado em 05/12/2002