

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE BARDANA FRENTE À *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS*

Vicky Cristine Bragante Thumaz (PIBIC/CNPq), Tatiane Viana Dutra, Fabiana Richard, Karina Miyuki Retamiro, Benício Alves de Abreu Filho (Orientador), Celso Vataru Nakamura (Co-orientador)
E-mail: thumazv@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Ciência e Tecnologia de alimentos, Microbiologia de alimentos.

Palavras-chave: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Arctium lappa*, Antimicrobianos naturais

Resumo:

O Brasil é o maior exportador mundial de suco de laranja, tendo como destaque o suco de laranja concentrado e congelado. *A. acidoterrestris* é um bacilo Gram-positivo deteriorante de alimentos com características acidotermorresistentes. Por ser um micro-organismo formador de esporos, sua inativação torna-se muitas vezes ineficiente. Esta bactéria tem sido isolado de diversos produtos industrializados, como extrato de tomate e suco de frutas cítricas. Devido a constante procura pela melhor qualidade do produto e extensão da vida de prateleira, agentes antimicrobianos naturais têm sido alvo de pesquisas, uma vez que podem auxiliar no combate a micro-organismos de origem alimentar. O extrato de Bardana, *Arctium lappa*, conhecido pela atividade antimicrobiana e antifúngica, testado frente ao *A. acidoterrestris*, obteve um valor de 125 µg/mL para a fração hexano, enquanto as demais frações, clorofila *in natura*, Hidroalcoólico 80% *in natura* e sem clorofila *in natura* apresentaram valor de 1000 µg/mL.

Introdução

O Brasil é o maior produtor e exportador de suco de laranja, tendo como destaque o suco de laranja concentrado e congelado – frozen concentrated orange juice (FCOJ), em 2017, foram exportadas cerca de 420 toneladas (CITRUSBR, 2018). O suco de laranja concentrado possui baixo pH (3,5 a 4,0), alta concentração de sólidos solúveis (65 °Brix). Entretanto, alguns micro-organismos têm capacidade de adaptação a esses meios. Em destaque, encontra-se a bactéria, acidotermorresistente, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, um micro-organismo aeróbico, Gram-positivo, formador de esporos e não patogênico. Devido sua capacidade de esporulação, são facilmente encontrados em produtos à base de frutas, pois seus esporos são capazes de sobreviverem a etapas do processamento térmico do suco de

frutas cítricas. Esses micro-organismos têm sido associados à deterioração de sucos, com capacidade de produzir sabor e odor desagradáveis, atribuídos à produção de compostos 2,4-dibromofenol e 2-metoxifenol (guaiacol), respectivamente (HIPPECHEN et al., 1981; SMIT et al., 2011; OLIVEIRA e ABREU FILHO, 2012; CHANG & KANG, 2004; CONCINA et al., 2010; WALKER & PHILLIPS, 2008).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos para o descobrimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas e outros produtos naturais, como forma de prevenir a contaminação e desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes. A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste, esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM) (HOLETZ et al., 2002).

Contudo, até o presente momento, não há conhecimento da ação do extrato de Bardana sobre a espécie *A. acidoterrestris*, o que motiva o estudo para auxiliar o desenvolvimento de medidas de controle e eliminação desta espécie nos ambientes de produção industrial.

Material e métodos

Preparação dos extratos

Os extratos de Bardana foram armazenados sob congelamento em recipiente fechado, para assegurar suas características. O preparo das soluções de extratos foi realizado pouco antes do início dos ensaios das microdiluições. Primeiramente, o extrato foi pesado em balança analítica e, em seguida diluído em meio de cultura específico para o micro-organismo, neste caso, o *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Meio BAT) para se obter a concentração desejada.

*Preparo da célula vegetativa *A. acidoterrestris* para realização das microdiluições*

Primeiramente, foi preparada a suspensão bacteriana em solução salina a 0,85% para obter uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland que contém aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida, uma diluição 1:10 em salina a 0,85% foi realizada, deixando a suspensão bacteriana em uma concentração de 10^7 UFC/mL, sendo que ao ser adicionada no poço contendo o meio de cultura, a concentração foi de aproximadamente 10^4 UFC/mL.

Ensaio das microdiluições seriadas

Para cada poço foi preenchido com volume final de 100µL (meio de cultura mais óleo essencial) e mantida uma concentração diferenciada para cada substância avaliada. Por fim foram adicionados 5 µL do inóculo (célula vegetativa) e incubado a 45 °C/24 horas.

Com os resultados destes ensaios, foram obtidas as concentrações mínimas capazes de inibir visivelmente o crescimento bacteriano na microplaca. Sendo desta forma determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de *A. acidoterrestris* após sua inoculação e incubação a 45 °C/24 horas.

A partir dos poços com o não crescimento visível do inóculo, foi realizado um microcultivo de 10µL (em triplicata) em placa com meio BAT solidificado para avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). O não crescimento bacteriano indica que a concentração da droga teste foi eficaz como agente bactericida frente ao micro-organismo avaliado.

Resultados e Discussão

Através dos ensaios realizados foram obtidos valores de CIM e CBM para cada um dos extratos de Bardana avaliados, utilizando o meio de cultura BAT. Os resultados são apresentados na tabela 1.

Tabela 1- Resultados de CIM e CBM obtidos através dos ensaios com os extratos de Bardana realizados no meio de cultura BAT

Extratos de Bardana	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
Clorofila <i>in natura</i>	1000	1000
Hidroalcoólico 80% <i>in natura</i>	1000	1000
Folha seca fração hexano	125	1000
Sem clorofila <i>in natura</i>	1000	1000

Segundo Holetzet al. (2002), os extratos que apresentam valores de CIM inferiores a 100 µg/mL são considerados com boa atividade antimicrobiana, valores entre 100 e 500 µg/mL apresentam atividade antimicrobiana moderada, enquanto valores de 500 a 1000 µg/mL apresentam fraca atividade antimicrobiana. Segundo os autores, o extrato de Bardana hidroalcoólico (90-10%), apresentou um valor de concentração inibitória mínima de 500 µg/mL para as cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Dessa forma, o extrato de Bardana folha seca fração hexano, avaliado no presente estudo, frente à cepa de *A. acidoterrestris* apresentou atividade antimicrobiana moderada, 125 µg/mL, enquanto os extratos clorofila *in natura*, Hidroalcoólico 80% *in natura* e sem clorofila *in natura* apresentaram 1000 µg/mL. Todavia, todos os extratos avaliados apresentaram o valor de 1000 µg/mL para Concentração Bactericida Mínima.

Conclusões

No presente estudo, o extrato de Bardana folha seca fração hexano apresentou moderada atividade antimicrobiana, 125 µg/mL, frente à espécie *A. acidoterrestris*, enquanto os demais extratos apresentaram valores de 1000 µg/mL.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

Referências

CHANG, S.S. E KANG, D.H. *Alicyclobacillus* spp. in the Fruit Juice Industry: History, Characteristics, and Current Isolation/Detection Procedures. **Critical Reviews in Microbiology**, v.30, p.55 -74, 2004.

CITRUSBR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos, 2018. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/mercadoexterno/?me=01>> Acesso em 05 jun. 2018.

CONCINA, I., BORNŠEK, M., BACCELLIERE, S., FALASCONI, M., GOBBI, E., SBERVEGLIERI, G. *Alicyclobacillus* spp.: detection in soft drinks by electronic nose. **Food Research International**, v.43, p. 2108-2114, p. 2010.

GENTIL, M., PEREIRA, J. V., SOUSA, Y. T. C. S., PIETRO, R., NETO, M. D. S., VANSAN, L. P., FRANÇA, S. C. **In vitro evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings**. *Phytother. Res.* 20: 184–186, 2006.

HIPPECHEN, B.; ROLL, A.; PORALLA, K. Occurrence in soil of thermoacidophilic bacilli possessing π -cyclohexane fatty acids and hopanoids. **Archives of Microbiology**, v.129, p.53-55, 1981.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, p.1027-1031, 2002.

SMIT, Y.; CAMERON, M.; VENTER, P.; WITTHUHN, R. C. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation - **A review**. **Food Microbiol** v. 28:331, p. 349, 2011.

OLIVEIRA, J.G., ABREU FILHO, B.A. Propriedade antimicrobiana do eugenol frente às amostras de *Alicyclobacillus* spp. isoladas de suco de laranja. **Rev Inst Adolfo Lutz**. v. 71, p. 410-4, 2012.

WALKER, M.; PHILIPS, C.A. The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. **Food Control**, v. 19, p. 974-981, 2008.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, p.1027-1031, 2002.