

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE BARDANA E SUAS FRAÇÕES EM COMBINAÇÃO COM A NISINA FRENTE A CEPAS DE *ALICYCLOBACILLUS* SPP.

Natalia Teles Pereira (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Benício Alves de Abreu Filho (Orientador), e-mail: baafilho@uem.br, Celso Vataru Nakamura (Co-orientador), e-mail: cvnakamura@uem.br

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

Ciência de Alimentos - Microbiologia de Alimentos

Palavras-chave: *Alicyclobacillus* spp., nisina, microbiologia de alimentos.

Resumo:

O Brasil encontra-se em primeiro lugar no ranking de produção e exportação de suco de laranja concentrado. Pensando neste produto o gênero *Alicyclobacillus* é um microrganismo deteriorante, Gram-positivo e ácido-termorresistente; além de ser formador de esporos, tornando sua remoção e inativação difícil de ser obtida. Buscando uma melhor qualidade e segurança dos alimentos o uso de antimicrobianos naturais vem se ampliando, neste sentido o uso de extratos naturais no combate a microrganismos patogênicos e deteriorantes. O extrato de Bardana, bem como suas frações, *Arctium lappa*, apresentam atividade antimicrobiana e antifúngicas. O presente trabalho avaliará o potencial antimicrobiano deste extrato e suas frações frente ao *A. acidoterrestris*, *A. herbarius* e *A. sendaiensis*, e seu efeito combinado com a enzima nisina, composto bactericida com atividade comprovada em fungos e bactérias, bem como seu potencial de aplicação em suco de laranja, visando uma melhor qualidade final do produto.

Introdução

O suco de laranja concentrado apresenta características de baixo pH (3,5 a 4,0), alta concentração de sólidos solúveis (65 °Brix) e baixo potencial redox. No entanto, alguns microrganismos possuem capacidade de adaptação a esses meios. Destaca-se as bactérias acidotermorresistentes: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus herbarius* e *Alicyclobacillus sendaienses*, aeróbicos, Gram-positivos, formadores de esporos e deteriorantes de alimentos (GOTO et al., 2003). *Alicyclobacillus acidoterrestris* 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) (CHANG & KANG, 2004). A Nisina é um composto bacteriocida que apresenta atividade em diversas espécies, células vegetativas e esporos de *Bacillus* e *Clostridium* (McAULIFE et al., 2001). É crescente os estudos relacionados ao descobrimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas além de outros produtos naturais. Holetz et al. (2002) estudou o extrato de Bardana, *Arctium lappa*,

conhecido pela sua ação antibacteriana e antifúngica, e encontrou um valor de concentração inibitória mínima (CIM) de 500 µg/mL para as cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Sendo a faixa de 500 a 1000µg/mL considerada baixa atividade inibitória. Entretanto, não há estudos sobre o uso do extrato de Bardana e suas frações em espécies de *A. acidoterrestris*, *A. herbarius* e *A. sendaiensis*.

Materiais e métodos

Cepas de Alicyclobacillus spp. e preparação do extrato de Bardana e suas frações

As cepas de *Alicyclobacillus* spp. utilizadas nos ensaios foram adquiridas do Laboratório de Microbiologia da Água, do Ambiente e de Alimentos. O extrato de Bardana e suas frações foram adquiridos do Laboratório de Microbiologia Aplicada de Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Estadual de Maringá - PR.

Na preparação do extrato de Bardana e suas frações, estes foram pesados 2 mg em balança analítica e em seguida diluídos em meio de cultura específico para os microrganismos para se obter a concentração desejada. O meio de cultura utilizado para todos os ensaios foi o meio BAT (Caldo *Bacillus acidoterrestris*) com pH padronizado em 4,0.

Metodologia “Checkerboard”

Foram utilizadas microplacas de 96 poços para obtenção do índice FIC da combinação do extrato e suas frações com a Nisina. A placa foi preenchida com 100 µL de BAT e 100 µL de nisina diluída em BAT ao longo do eixo X da placa, e o extrato ou suas frações diluídas em BAT também ao longo do eixo y.

Para o índice FIC, foi calculado utilizando a fórmula $FIC = FIC(A) + FIC(B)$, onde $FIC(A) = FIC(A) \text{ combinado} / FIC(A) \text{ sozinho}$, e $FIC(B) = FIC(B) \text{ combinado} / FIC(B) \text{ sozinho}$, definido como efeito sinérgico resultado $\leq 0,5$, aditivo $0,5 < \leq 1$, indiferente de $1 < \leq 4$ e antagonista > 4 .

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As células de *Alicyclobacillus* foram tratadas com os agentes antimicrobianos selecionados nos ensaios do *Checkerboard* realizados anteriormente, e incubados a 45 °C por 24 horas. Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), seguiu-se a metodologia segundo Haddad et al. (2007). As células de *Alicyclobacillus* foram lavadas em PBS pH 7,2 e fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e deixados em temperatura ambiente por 1 hora. Após este período, foram lavados com tampão cacodilato 0,1M. Posteriormente foi realizado a desidratação da célula em álcool e, então, foi realizado o ponto crítico, onde ocorreu a secagem com CO₂ e posterior metalização com ouro, podendo então ser realizada a leitura em microscópio eletrônico de varredura QUANTA 250.

Análise Estatística

Os ensaios foram conduzidos em triplicata. As médias dos resultados foram submetidas à análise de variância ANOVA. A diferença significativa foi confirmada pelo teste de Tukey com $\alpha=0,05$.

Resultados e Discussão

A partir dos resultados obtidos do índice FIC (Tabela 1) da combinação do extrato de Bardana e suas frações com a Nisina, nota-se que os testes feitos com as três espécies de *Alicyclobacillus* spp. apresentaram resultados sinérgicos na fração folha seca com clorofila e folha seca sem clorofila. As outras frações “in natura” sem clorofila, “in natura com clorofila e hidroalcoólico 80% “in natura” tiveram resultados sinérgicos apenas nas combinações de *A. herbarius* e *A. sendaiensis*, enquanto na *A. acidoterrestris* teve-se resultados indiferentes. Já na folha seca fração hexano, as combinações dos três tipos de bactéria obtiveram resultados indiferentes.

Nos testes feitos com *A. acidoterrestris* houve diferença significativa entre os extratos folha seca fração hexano, “in natura” sem clorofila, “in natura” com clorofila e hidroalcoólico 80% “in natura”; enquanto entre os extratos folha seca com clorofila e folha seca sem clorofila não houve diferença significativa. Em relação à *A. herbarius* houve diferença significativa apenas entre os extratos folha seca com clorofila e folha seca fração hexano, enquanto entre folha seca sem clorofila e hidroalcoólico 80% “in natura”, e “in natura” sem clorofila e “in natura” sem clorofila não houve diferença significativa. Já nas cepas de *A. sendaiensis* há diferença significativa entre os extratos folha seca com clorofila, folha seca fração hexano, “in natura” com clorofila e hidroalcoólico 80% “in natura”, porém a mesma não ocorre entre os extratos folha seca sem clorofila e “in natura” sem clorofila.

Tabela 1 – Índice FIC da combinação do extrato e suas frações com a Nisina.

Extrato	Folha seca com clorofila	Folha seca sem clorofila	Folha seca fração hexano	“in natura” sem clorofila	“in natura” com clorofila	Hidroalcoólico 80% “in natura”
Bactéria						
<i>A. acidoterrestris</i>	0,50 ^a	0,50 ^a	0,53 ^b	0,65 ^c	1,00 ^d	1,00 ^e
<i>A. herbarius</i>	0,50 ^a	0,50 ^b	0,56 ^c	0,50 ^d	0,50 ^d	0,50 ^b
<i>A. sendaiensis</i>	0,25 ^a	0,25 ^b	0,56 ^c	0,25 ^b	0,25 ^d	0,50 ^e

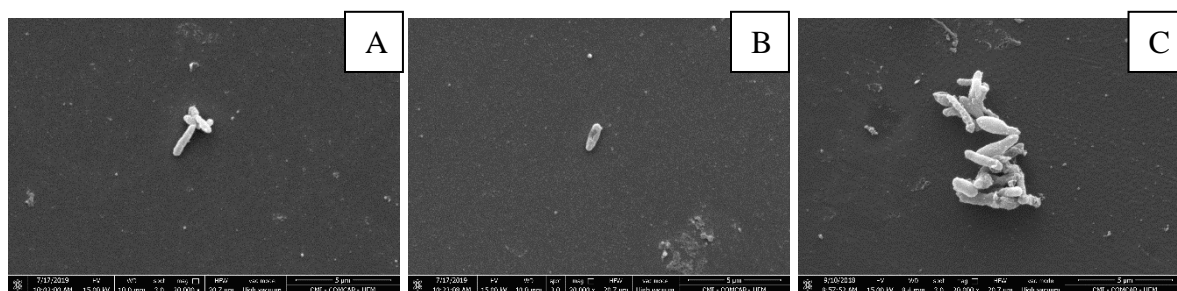


Figura 1 – MEV de células vegetativas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, após 24 horas de tratamento utilizando o extrato “in natura” com clorofila como antimicrobiano: (A) célula tratada com o extrato de Bardana “in natura” com clorofila a 1,95 µg/mL; (B) célula tratada com o extrato de Bardana “in natura” com clorofila a 1,95 µg/mL; (C) controle – célula vegetativa.

Com as imagens obtidas através da microscopia de varredura das células de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Figura 1) selecionadas nos ensaios das CIMs, nota-se que as células do mesmo não são lisas igual às bactérias do controle, mas tem curvas levemente enrugadas apresentando depressões superficiais e perfurações estruturais nitidamente visíveis.

Conclusões

Através dos resultados obtidos pelo método do *checkerboard*, conclui-se que a combinação do extrato de Bardana e suas frações com a Nisina teve potencial na atividade antimicrobiana das células de *Alicyclobacillus* spp, porém indiferentes quanto à associação.

Agradecimentos

Agradecimento ao CNPq pelo financiamento do projeto de iniciação científica.

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.

GOTO, K.; MOCHIDA, K.; ASAHARA, M.; SUZUKI, M.; KASAI, H. E YOKOTA, A. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess ω -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.53, p.1537-1544, 2003.

HADDAD, A.; SESSOS, A.; ATTIAS, M.; FARINA, M.; NAZARETH, M. M.; SILVEIRA, M.; BENCHIMOL, M.; SOARES, M. J.; BARTH, M. O.; MACHADO, D. R.; SOUTO-PATRÓN, T.; SOUZA, W. **Técnicas de Microscopia Eletrônica aplicada as Ciências Biológicas**. 3º ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007.

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.

MCAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; HILL, C. Lantibiotics: Structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**, 25, p. 285-308, 2001.