

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO SUBPRODUTO DA JABUTICABA FERMENTADO COM KEFIR FRENTE A *Alicyclobacillus* spp.

Ayla Rodrigues Trindade (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Jéssica Lima de Menezes, Caroline Wolf Trentini Schipfer Benício, Alves de Abreu Filho (Orientador) e-mail:baafilho@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Básicas da Saúde /Maringá, PR.

### Área e subárea- Ciência/Tecnologia de Alimentos

**Palavras-chave:** biopreservação, subproduto, micro-organismos.

### Resumo:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antimicrobiana do extrato de subproduto de jabuticaba fermentado com kefir contra *Alicyclobacillus* spp.. Bactérias deteriorantes são de grande importância para a indústria de alimentos, pois as mesmas trazem prejuízos econômicos para a indústria. Foi preparado o extrato a partir do subproduto de jabuticaba e fermentado com os grãos de kefir a 30 °C durante 7 dias. Avaliou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato de jabuticaba fermentado com kefir contra *A. acidoterrestris* e *A. acidocaldarius* subsp. *rittmanni*. Foi realizada a análise da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) que demonstrou danos causados pelo extrato em *A. acidoterrestris*. O extrato fermentado com grãos de kefir apresentou potencial antimicrobiano contra *Alicyclobacillus* spp. com uma concentração baixa de 0,39% de extrato. Assim, o extrato de subproduto de jabuticaba fermentado com kefir apresentou atividade antibacteriana.

### Introdução

*Alicyclobacillus* spp. são bactérias termoacidófilas, bacilos Gram-positivos, não patogênicas que podem crescer em ambientes altamente ácidos de pH 2,5-6,0 e temperaturas de 25-60 °C. A pasteurização aplicada na indústria alimentar é ineficaz contra esse micro-organismo, já que seus esporos podem germinar. O *Alicyclobacillus acidoterrestris* se destaca pela produção de guaiacol, responsável pelo gosto adstringente nos alimentos (ANJOS et al., 2018).

O uso de compostos naturais para controle de micro-organismos está cada vez mais presente, tais como a aplicação de agentes antimicrobianos naturais nos alimentos, fornecendo uma estratégia potencial para inibir uma ampla variedade de micro-organismos, sem risco para a saúde dos consumidores (ANJOS et al., 2018). Sendo os grãos de kefir são constituídos por polissacarídeos em associação com uma microbiota complexa entre bactérias e leveduras, que funcionam como cultura starter para a fermentação, produzindo ácidos orgânicos, etanol e compostos formadores de aroma durante a fermentação (FIORDA et al., 2016).

A jabuticaba é rica em compostos bioativos, além de sua polpa, a casca e sementes também são ricas em compostos bioativos, como antocianinas, flavonoides, carotenoides, taninos, ácidos fenólicos, dentre outros compostos (GASPAROTTO-JUNIOR et al, 2019). Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade antimicrobiana do extrato de subproduto da jabuticaba fermentado com kefir contra *Alicyclobacillus* spp.

## Materiais e métodos

### Obtenção de cepas

As cepas de *Alicyclobacillus* utilizadas foram *A. acidoterrestris* 0244<sup>T</sup> e *A. acidocaldarius* subsp. *rittmanni* 0245<sup>T</sup> estocadas a -20 °C no Laboratório de Microbiologia de Água, Ambiente e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá.

### Obtenção do extrato de jabuticaba fermentado com kefir

A obtenção do extrato foi baseada na metodologia descrita por Menezes et al. (2020) com algumas alterações. O extrato de jabuticaba foi preparado usando subproduto de jabuticaba e água na proporção de 1:2. Posteriormente, foi acrescentado 2% de açúcar mascavo e 10% de grãos de kefir de água. A fermentação ocorreu em estufa BOD a 30 °C por 7 dias. Após este período, o centrifugou-se o extrato a 10.000 rpm por 10 min, por conseguinte, o sobrenadante foi filtrado em membrana filtrante (0,22 µm).

### Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As concentrações inibitórias e bactericidas mínimas foram determinadas utilizando a técnica de microdiluição em microplaca de 96 poços, de acordo com a metodologia CLSI – M07 – A11 (2018), com o caldo BAT (*Bacillus Acidoterrestris*) como meio de cultura. As cepas de *A. acidoterrestris* 0244<sup>T</sup> e *A. acidocaldarius* subsp. *rittmanni* 0245<sup>T</sup>, foram ativadas no caldo BAT 48 h antes do experimento e incubadas a 45 °C. Em seguida, foi realizado o plaqueamento com estrias simples em Ágar BAT e novamente incubado a 45 °C, por mais 24 h, que foi utilizado para o preparo da solução padrão com salina. Foi realizada a diluição seriada de dois extratos do subproduto da jabuticaba (fermentado com kefir; extrato 1 e não fermentado; extrato 2) com concentrações variando entre 50 a 0,1%, e a inoculação do micro-organismo de 5 µL da suspensão padrão de acordo com a escala Mc Farland 0,5 em cada poço. As microplacas foram incubadas a 45 °C por 24 h. Após esse período, com base na menor concentração que inibiu visualmente o crescimento bacteriano, foi realizado o CBM através do plaqueamento de cada poço com 20 µL em ágar BAT e incubação a 45 °C por 24 h.

### Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata, dessa forma, utilizando o programa Excel (Microsoft Corp, EUA) os dados foram tratados através do Teste t de Student ao nível de 5 % de significância (p<0,05).

## Resultados e Discussão

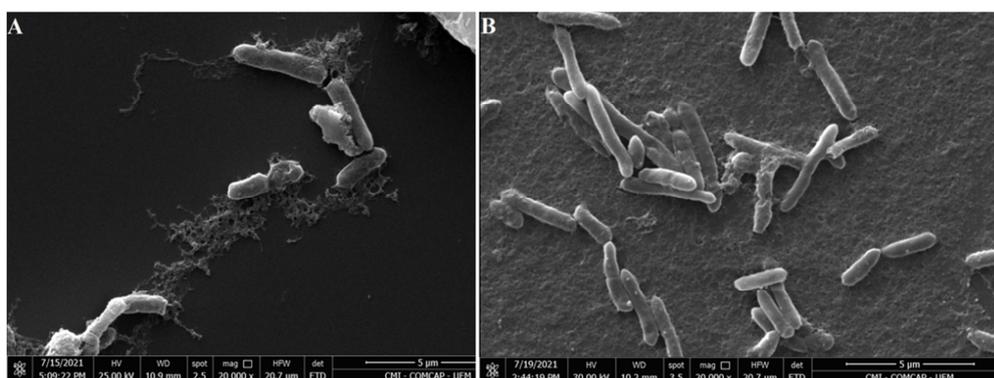
As análises CIM e CBM demonstraram um potencial antimicrobiano dos extratos de jabuticaba que estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1-** Valores de CIM e CBM dos extratos de subprodutos de jabuticaba

Micro-organismo	Extrato 1		Extrato 2	
	CIM (%)	CBM (%)	CIM (%)	CBM (%)
<i>A. acidoterrestris</i>	0,39	0,39	25	25
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmanni</i>	0,39	3,12	12,5	25

Extrato 1: extrato do subproduto da jabuticaba fermentado com grão de kefir; Extrato 2: extrato do subproduto da jabuticaba sem fermentar.

O Extrato 1 se mostrou mais eficaz contra as duas cepas de *Alicyclobacillus*, em comparação ao Extrato 2, isso porque foi necessária uma baixa concentração do Extrato 1 para ser antimicrobiano, visto que a fermentação do extrato do subproduto da jabuticaba com kefir resultou na formação de compostos secundários com potencial antimicrobiano (MENEZES et al., 2020). O Teste t de Student comprovou que o Extrato 1 possui uma variação significativa em relação ao Extrato 2 (valor-p < 0,05). Na análise de MEV (Figura 1), nota-se lesões na parede celular e na membrana plasmática da célula (A) causadas pelo Extrato 1, que pode ter ocorrido pelos compostos fenólicos e taninos presentes na casca da jabuticaba. Esses compostos contribuem para esse efeito na célula bacteriana por possuírem a capacidade de modular a atividade de enzimas e afetar o comportamento celular, formando complexos com as proteínas solúveis da parede celular e rompendo as membranas celulares (SALAS et al., 2011). Diferente das células do controle (B), apresentando em maior quantidade, com aspectos homogêneos, superfície lisa e características uniformes.



**Figura 1-** Imagens da Microscopia eletrônica de varredura. Em A está o efeito do CIM do Extrato 1 nas células do *A. acidoterrestris*. Em B apenas caldo BAT e células de *A. acidoterrestris* sem tratamento (controle).

## Conclusões

Ambos os extratos testados apresentaram potencial antimicrobiano em baixas concentrações frente a bactéria do gênero *Alicyclobacillus* spp., entretanto, o Extrato 1, apresentou um melhor desempenho visto que conseguiu modificar a estrutura celular, e com 0,39% da concentração demonstrou potencial antimicrobiano contra *A. acidoterrestris* e *A. acidocadarius* subsp. *rittmani*, que foi demonstrado através do Teste t de Student, no qual apresentou valor-p < 0,05.

## Agradecimentos

A Universidade Estadual de Maringá, o CNPq e a Fundação Araucária por ter me oferecido a bolsa PIBIC. Ao meu orientador, coordenadora e todos que me ajudaram na realização do projeto com suporte, aprendizado e seus incentivos, meu muito obrigado.

## Referências

ANJOS, M. M. *et al.* Preservation of the antibacterial activity of enzymes Against *Alicyclobacillus* spp. through microencapsulation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 88, n. 1, p. 18-25, 2018.

FIORDA, F. A. *et al.* Evaluation of a potential lyprobiotic non-dairy beverage developed with honey and kefir grains: fermentation kinetics and storage study. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 8, p. 732-742, 2016.

GASPAROTTO-JUNIOR, A.; SOUZA, P.; LÍVERO, F. A. R. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel: A comprehensive ethnopharmacological review of a genuinely Brazilian species. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 245, n. 5, p. 245-255, 2019.

MENEZES, J. L. *et al.* Antimicrobial activity of fermented kefir with a by production of grape fruit to *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n. 3, p. 9900-9911, mar, 2020.

SALAS, P. M. *et al.* Antifungal activity and enzymatically – modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, Buenos Aires, v. 124, n. 4, p. 1411 – 1415, fev, 2011.