

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA *Matricaria chamomilla*, NISINA E ASSOCIAÇÃO FRENTE AO *Alicyclobacillus* spp.

Julia Rabassi Parpinelli (PIBIC/FA/UEM), Benício Alves de Abreu Filho (Orientador).
E-mail: ra124821@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Programa de Pós-graduação em
Ciência de Alimentos, Maringá, PR.

Ciências Biológicas, Microbiologia, Biologia/ Microbiologia Industrial e de fermentação.

Palavras-chave: *Matricaria chamomilla* L.; Nisina; *Alicyclobacillus* spp.

RESUMO

Alicyclobacillus spp. é um microrganismo, formador de esporos, termoresistente, Gram-positivo, que é um potencial deteriorante para a indústria de alimentos, mais especificamente a indústria de bebidas cítricas. A *Matricaria chamomilla* é uma planta muito conhecida e utilizada na medicina popular devido a suas propriedades terapêuticas, entre elas o potencial antimicrobiano. A nisina é uma bacteriocina já utilizada na indústria como conservante, e possui potencial antimicrobiano contra microrganismos Gram-positivos. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto de *Matricaria chamomilla* (EB), nisina (N) e sua combinação (EB+N) contra espécies de *Alicyclobacillus* spp. através do método de disco-difusão, pesquisa de concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM), além da pesquisa do potencial antioxidante do EB. Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), observou-se os danos que o tratamento traz as células vegetativas de *A. acidoterrestris*, e através da análise estáticas observou-se que existe uma diferença significativa entre os diferentes tipos de tratamento, com destaque para EB+N.

INTRODUÇÃO

Alicyclobacillus spp. é um gênero composto por bacilos gram-positivos que contém ácidos graxos cíclicos como principais componentes da membrana celular, são também formadores de esporos, sendo estes os principais fatores que propiciam sua resistência aos processos térmicos empregados em alimentos. São termófilas (25 °C a 60 °C) e acidófilas (pH 2,5 a 6,0) (DUTRA *et al.*, 2019). Essas bactérias podem alterar as características sensoriais de alimentos como sucos cítricos, além de outros produtos derivados de citrus, como chás e isotônicos, pois produz um composto chamado guaiacol que caracteriza odor e sabor desagradáveis ao produto. (ANJOS *et al.*, 2016).

A nisina é uma bacteriocina produzida pelo microrganismo *Lactococcus lactis* subsplactis, e tem efeitos antimicrobianos contra uma ampla gama de bactérias

Gram-positivas, incluindo espécies de *Alicyclobacillus* spp. (Stevens *et al.*, 1991). Dessa forma, o uso do extrato de camomila sozinho ou em combinação com a nisina apresenta um potencial a ser explorado no sentido de inibir as espécies de *Alicyclobacillus* spp.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção das cepas

Todas as cepas utilizadas nesse estudo estão estocadas no Laboratório de Água, Ambiente e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá – UEM em freezer a 120 °C, sendo elas: *Alicyclobacillus acidoterrestris* (CBMAI 0244^T), *A. herbarius* (CBMAI 0246^T), *A. hesperidum* (CBMAI 0298^T), *A. acidiphilus* (CBMAI 0247^T) e *A. sendaiensis* (KCTC 3843^T).

Cultivo microbiano

Para a parte experimental, primeiramente foi necessário o cultivo dos microrganismos, respeitando as condições ideais para seu crescimento, com uso de meio de cultura BAT (*Bacillus acidoterrestris*). As cepas de *Alicyclobacillus* spp. foram cultivadas em meio BAT com pH ajustado entre 4,0 e 3,8 incubadas durante 24 horas a 45°C.

Obtenção do Extrato Bruto de Matricaria chamomilla

O material foi macerado com o líquido extrator, etanol 96%, em uma proporção de 15g de capítulos florais para cada 175 mL do solvente, utilizando no total 1000 g de capítulos florais. A droga vegetal foi mantida envasilhada com o solvente por um período de 12 dias, em ambiente resguardado de luz. Após essa etapa, a filtração da solução foi realizada, seguida da rotaevaporação do solvente, com posterior liofilização, sendo por fim acondicionada em local apropriado.

Obtenção da Nisina

A Nisina foi preparada uma a partir de uma solução estoque de nisina purificada (sigma-Aldrich), dissolvendo 2 mg de nisina em 1 ml de HCl 0,002 N.

Avaliação da atividade antioxidante

Foram testadas a capacidade antioxidante frente aos radicais DPPH^{*} e ABTS^{**}.

Método de disco-difusão

Em meio BAT foi realizada a ativação e a prepara da suspensão bacteriana de acordo com a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$) e o experimento foi realizado conforme o que é descrito pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* M02 - A9 (CLSI, 2012).

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

A fim de testar a eficácia do EB, N e EB+N, foram realizados, ensaios de CIM e CBM. A CIM foi determinada utilizando a técnica de microdiluição em microplaca de 96 poços, de acordo com a metodologia CLSI –M07 – A11 (2018).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras que obtiveram os melhores resultados foram tratadas e submetidas ao MEV.

Análise estatística

A aplicação do extrato bruto de *Matricaria chamomilla*, nisina e associação foram avaliadas por análise de variância e teste de Tukey ($P < 0,05$), para comparação de médias foi utilizado o software estatístico SASM - Agri ver.8.2. Média e desvio padrão foram calculados para cada variável.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antioxidante do EB apresentou resultado de 0,43 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ de EB para o DPPH e de 173,04 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ de EB para ABTS.

No teste de disco-difusão a espécie *A. acidoterrestris* apresentou 21mm para EB+N, e 24 mm para N, já EB e o controle não apresentaram halos de inibição. A *A. hesperidum* também apresentou bons resultados, tendo 22 mm para EB+N e 22 mm para N, assim como na *A. acidoterrestris*, não houve a formação de halo para EB e controle negativo.

Os resultados da CIM e CBM (Tabela 1) foram resultados satisfatórios pois apresentaram valores de CIM e CBM que variaram de 1,95 $\mu\text{g/mL}$ a 500 $\mu\text{g/mL}$.

A MEV mostrou os danos causados às células nos diferentes tratamentos.

O tratamento estatístico de ANOVA, que mostrou diferença significativa entre os tratamentos confirmada pelo teste de Tukey.

Tabela 1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de Extrato Bruto de *Matricaria chamomilla* (FR), Nisina (N) e combinação (EB+N) frente a *Alicyclobacillus* spp.

Tratamento	Teste (mg/mL)	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i>
EB	CIM	500 ^a \pm 0,00	250 ^a \pm 0,00	1000 ^a \pm 0,00	125 ^a \pm 0,00	500 ^a \pm 0,00
EB	CBM	500 ^a \pm 0,00	250 ^a \pm 0,00	1000 ^a \pm 0,00	125 ^a \pm 0,00	500 ^a \pm 0,00
N	CIM	31,25 ^b \pm 0,00	15,6 ^b \pm 0,00	31,25 ^b \pm 0,00	15,6 ^b \pm 0,00	62,5 ^b \pm 0,00
N	CBM	31,25 ^b \pm 0,00	15,6 ^b \pm 0,00	62,5 ^b \pm 0,00	15,6 ^b \pm 0,00	125 ^b \pm 0,00
EB+N	CIM	0,9 ^c \pm 0,00	1,95 ^c \pm 0,00	1,95 ^c \pm 0,00	3,9 ^c \pm 0,00	3,9 ^c \pm 0,00
EB+N	CBM	0,9 ^c \pm 0,00	1,95 ^c \pm 0,00	1,95 ^c \pm 0,00	3,9 ^c \pm 0,00	3,9 ^c \pm 0,00

Resultados expressos em média \pm desvio padrão; ^{a, b, c} diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa entre diferentes tratamentos para espécies de *Alicyclobacillus* pelo teste de Tukey (P < 0,05).

CONCLUSÕES

Este trabalho possibilitou a avaliação da capacidade antimicrobiana do extrato de camomila sozinho e em combinação com a nisina, contra o *Alicyclobacillus* spp. Para isso, usamos a combinação de ambos contra a *A. acidoterrestris*, *A. herbarius*, *A. hesperidum*, *A. sendaiensis* e *A. acidiphilus*. Com isso, os resultados de MEV mostraram a diferença do controle com os tratamentos. É possível concluir que a pesquisa apresenta resultados animadores para todos os tipos de tratamentos, com potencial de ser explorado mais a fundo com a realização de mais testes para avaliar o tipo de interação que os compostos apresentam entre si e também qual a viabilidade de aplicação na indústria em grande escala.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho, ao Pablo e aos colegas do laboratório pela oportunidade de me passar um pouco dos seus conhecimentos. Não poderia deixar de agradecer também ao CNPQ e a Fundação Araucária pelo incentivo financeiro nessa jornada e ao COMCAP por disponibilizar seus equipamentos em prol da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ANJOS, M. M.; ENDO, E. H.; LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H.; BENEDITO, D. F. P.; ABREU-FILHO, B. A. Preservation of the antibacterial activity of enzymes against *Alicyclobacillus* spp. through microencapsulation. *LWT - Food Science and Technology*, v. 88, p. 18-25, 2018. BIRMAN, J. **Cartografias do avesso**: escrita, ficção e estéticas de subjetivação. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 2019.

CASTRO, J.C.; ENDO, E.H.; SOUZA, M.R.; ZANQUETA, E.B.; POLONIO, J.C.; PAMPHILE, J.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P.; ABREU-FILHO, B.A. Bioactivity of essential oils in the control of *Alternaria alternata* in Dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.). *Industrial Crops & Products*, v. 97, p. 101-109, 2017. 1.

CARVALHO, A.; SILVA, D.; SILVA, T.; SCARCELLI, E.; MANHANI, M. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólicos e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla*). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, p. 521-526, 2014.

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