

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE ARAÇÁ (*Psidium cattleianum* Sabine)

LUIZ GUSTAVO BACH¹; ANDRÉIA SALDANHA DE LIMA²; DIEGO PERES
ÁVILA²; LAÍS ABREU ANASTÁCIO²; TASSIANA RAMIRES²; WLADIMIR
PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – lugubach@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – andreia@ufpel.edu.br; diiperes1@gmail.com;
laisabr@gmail.com; tassianaramires@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Surtos e casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) são registrados em todo o mundo. Estima-se que, anualmente, em torno de 10% da população mundial adoça pelo consumo de alimentos contaminados (WHO, 2017). Entre 2016 e 2019, as principais bactérias envolvidas em surtos de DTA no Brasil foram *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* (Brasil, 2020). Na União Europeia, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* foram os principais responsáveis pelas zoonoses em humanos reportadas no ano de 2019 (EFSA, 2021). A resistência a antimicrobianos é um problema de saúde pública em nível global e que tem se agravado ao longo dos anos em virtude do uso indiscriminado desses agentes (Estrela, 2018). Com base nisso, existe a necessidade de novas pesquisas e desenvolvimento de alternativas para solucionar esse problema. O Brasil apresenta a maior biodiversidade do mundo e, portanto, uma grande variedade de compostos bioativos com potencial antimicrobiano (Souza, 2019). As plantas sintetizam diversos metabólitos secundários (fitoquímicos) como mecanismos de defesa, e muitas dessas moléculas têm sido estudadas por terem efeitos benéficos à saúde reconhecidos (Rempe et al., 2017). O araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) é uma fruta da família *Myrtaceae*, cultivado do sul ao nordeste do Brasil. É fonte de vitamina C, minerais, ácidos graxos, polissacarídeos, compostos voláteis, carotenoides e compostos fenólicos (Pereira et al., 2018). O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial antibacteriano de extratos de araçá.

2. METODOLOGIA

Frutos de araçá, com coloração amarela e vermelha, foram colhidos do banco de acessos da Embrapa Clima Temperado – Pelotas, RS. Foram coletados diferentes acessos e misturados por cor, gerando uma amostra de genótipos de araçá amarelos (AA) e uma amostra de genótipos de araçá vermelhos (AV). As frutas foram lavadas, higienizadas, as sementes removidas e as polpas com as cascas congeladas em nitrogênio líquido foram armazenadas a - 80 °C até o preparo dos extratos. Para o preparo dos extratos de araçá (EA), foram pesados 10 g de amostras de AA e 10 g de amostras de AV. As amostras foram maceradas com auxílio de um gral com pistilo e, para cada amostra, 40 mL de álcool etílico P.A. (Synth, Brasil) diluído a 75% (v/v) foram adicionados, gerando dois extratos: extrato de araçá amarelo (EAA) e extrato de araçá vermelho (EAV). Esses extratos ficaram sob agitação, a 200 RPM, durante 1 h, a temperatura

ambiente (23 ± 2 °C) e protegidos da luz. Após, permaneceram 15 min em banho ultrassônico (Quimis[®], Brasil), a 48 A, e foram filtrados em papel filtro qualitativo. Os filtrados foram centrifugados a 12.000 x g por 10 min e os sobrenadantes foram evaporados em rotaevaporador Laborota 4000 Heidolph[®] (Schwabach, Alemanha) a 40 °C, até peso constante.

No teste de difusão em ágar, discos impregnados com 10 µL de EA foram colocados sobre ágar Mueller Hinton (Oxoid, UK), previamente inoculado em placas de Petri com as cepas *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* ATCC 19114, *E. coli* ATCC 8739, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14020 e *Campylobacter jejuni* ATCC 33291. A concentração bacteriana usada foi de 10^8 UFC.mL⁻¹, padronizada pela escala 0,5 de McFarland. As placas foram incubadas a 35 °C por 20 h, com exceção de *C. jejuni*, onde foi usado ágar Mueller Hinton com 5% de sangue equino desfibrinado, e incubação em jarra de anaerobiose a 42 °C, por 48 h, em microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) (CLSI, 2018). Para determinação da CIM e da CBM, foi utilizada a técnica de macrodiluição em caldo. Foram feitos cultivos *overnight*, e a concentração dos micro-organismos foi padronizada em 10^5 UFC.mL⁻¹. Realizaram-se diluições nos EA, os quais foram adicionadas em tubos de ensaio com igual volume do inóculo bacteriano. Como controle, água ultrapura (Milli-Q[®]) foi utilizada no lugar dos EA. Os tubos foram incubados a 35 °C por 20 h, com exceção de *C. jejuni*, que foi incubado em microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) (White Martins[®]) a 42 ± 1 °C por 44 ± 4 h. A CIM foi determinada como sendo a menor concentração sem multiplicação bacteriana visível. De todos os tubos sem multiplicação bacteriana visível, foram removidos 100 µL para semeadura em placas contendo ágar Infusão Cérebro e Coração (BHI - Oxoid, UK) ou ágar Columbia (Oxoid, UK), para *C. jejuni*, de forma a determinar a menor concentração sem multiplicação bacteriana (CBM) (CLSI, 2018). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram expressos como média (\pm desvio padrão). Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os EA apresentaram ação antibacteriana, formando halos de inibição entre 11 e 17 mm de diâmetro no teste de disco difusão em ágar (Tabela 1). A presença de halos menores de 7 mm caracteriza os compostos como não ativos frente a bactéria avaliada, enquanto halos superiores a 12 mm representam efeito inibitório satisfatório (ARORA & KAUR, 1999).

Tabela 1: Atividade antibacteriana do extrato de araçá avaliada pelo teste de disco difusão em ágar

Bactéria	EAA	EAV
	halo de inibição (mm)	
<i>E. coli</i>	11	14
<i>L. monocytogenes</i>	12	13
<i>S. Typhimurium</i>	12	14
<i>S. aureus</i>	14	17
<i>C. jejuni</i>	12	12

EAA: extrato de araçá amarelo; EAV: extrato de araçá vermelho

Pereira et al. (2019), também avaliaram a ação inibitória do extrato de araçá vermelho frente a diferentes patógenos e descreveram halos de inibição de 7,4 e 9,1 mm para *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respectivamente. Porém, diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo, Pereira et al. (2019) não verificaram atividade inibitória do extrato de araçá vermelho contra *E. coli*, uma vez que não foram formados halos de inibição (0,0 mm). O teste de disco difusão em ágar permitiu realizar uma avaliação qualitativa da atividade antibacteriana, no entanto, foi apenas com as avaliações da CIM e CBM que essa atividade pôde ser quantificada (Tabela 2).

Tabela 2: CIM e CBM de extratos de araçá

Bactéria	CIM (mg .mL ⁻¹)		CBM (mg .mL ⁻¹)	
	EAA	EAV	EAA	EAV
<i>E. coli</i>	18,38 ^a	18,38 ^a	36,75 ^b	36,75 ^b
<i>L. monocytogenes</i>	36,75 ^b	36,75 ^b	73,5 ^c	73,5 ^c
<i>S. Typhimurium</i>	73,5 ^c	73,5 ^c	147 ^d	147 ^d
<i>S. aureus</i>	8,97 ^d	8,78 ^d	17,94 ^a	17,56 ^a
<i>C. jejuni</i>	36,75 ^b	36,75 ^b	73,5 ^c	73,5 ^c

EAA: extrato de araçá amarelo; EAV: extrato de araçá vermelho; CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima; valores apresentados como médias (n = 3) ± desvio padrão; Letras diferentes indicam diferença significativa (P < 0.05) pelo teste de Tukey

Em relação às bactérias avaliadas, *S. aureus*, seguida por *E. coli*, foram as mais sensíveis ao EAA e ao EAV, apresentando CIM e CBM significativamente menores que as demais. *Listeria monocytogenes* e *C. jejuni* não apresentaram diferença entre si, enquanto *S. Typhimurium* foi a bactéria menos sensível aos EA. O EAV havia gerado halos de inibição maiores que o EAA para *E. coli* no teste de disco difusão em ágar, entretanto, não foram observadas diferenças entre os extratos com os dois genótipos quando se determinou as CIM e CBM. Já para *S. aureus*, houve relação entre o teste de disco difusão em ágar e CIM e CBM, pois esse micro-organismo apresentou os maiores halos de inibição e os menores valores de CIM e CBM.

É interessante destacar que não houve uma linearidade na atividade inibitória do EA quando levada em consideração a comparação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Foi possível observar melhor eficácia do EA contra *S. aureus* (Gram-positiva), seguido por *E. coli* (Gram-negativa). Resultados semelhantes, obtidos por Krummenauer et al. (2019), também demonstraram ação do EA contra isolados e a cepa ATCC 12026 de *S. aureus*. Os autores relataram que uma concentração de 2 mg.mL⁻¹ do composto foi capaz de inibir a multiplicação de alguns isolados do micro-organismo, enquanto que, numa concentração de 8 mg.mL⁻¹, a multiplicação foi completamente inibida. Em contrapartida, Garcia (2018) observou melhor atividade do extrato contra bactérias Gram-negativas, uma vez que todos isolados apresentaram zona de inibição, ao passo que somente três (3/10) isolados Gram-positivos foram sensíveis.

4. CONCLUSÕES

O extrato de araçá apresenta atividade antibacteriana, independente do genótipo estudado (vermelho ou amarelo). Esses resultados possibilitam, em estudos futuros, a utilização de um mix de araçás amarelos e vermelhos, visando assim, a otimização da produção e potencialidade da ação inibitória dos extratos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARORA, D. S.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. **International journal of antimicrobial agents**, v. 12, n. 3, p. 257-262, 1999.
- BRASIL. **Boletim epidemiológico SVS 32**. Ministério da Saúde. Acessado em: 24 jul. 2021. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/17/Boletim-epidemiologico-SVS-32.pdf>
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th ed. CLSI Supplement M100. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- EFSA. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, União Europeia, v. 19, n. 2, p. 17-19, 2021.
- ESTRELA, T. S. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. Brasil, Ministério da Saúde, **Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde**. Saúde e Política Externa: v. 20, p. 307-327, 2018.
- GARCIA, M. O. **Atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de araçá (*Psidium cattleianum* S.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.) sobre patógenos de origem alimentar**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.
- KRUMMENAUER, A.; PONZILACQUA, B.; & ZANI, J. L. Atividade antibacteriana de extratos naturais sobre agentes causadores de mastite bovina. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 15, n. 4, 2019.
- PEREIRA, E. D. S.; CAMARGO, T. M.; RADÜNZ, M.; RIBEIRO, J. A.; ALVES, P. I. C.; VIZZOTTO, M.; GANDRA, E. A. Determinação de atividade antimicrobiana do araçá vermelho (*Psidium cattleianum* L.). In: ZUFFO, A. M. **A produção do Conhecimento nas Ciências Agrárias e Ambientais 2**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. Cap. 26, p. 217-226.
- PEREIRA, E. S.; VINHOLES, J.; C. FRANZON, R.; DALMAZO, G.; VIZZOTTO, M.; NORA, L. *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 258, p. 95–103, 2018.
- REMPE, C. S.; BURRIS, K. P.; LENAGHAN, S. C.; STEWART C. N. The Potential of Systems Biology to Discover Antibacterial Mechanisms of Plant Phenolics. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-12, 2017.
- SOUSA, A. C. D. J.; OLIVEIRA, J. D. S.; PORCY, C.; SOUZA, M. J. C.; MENEZES, R. A. D. O. Potencial antimicrobiano de extratos vegetais frente a cepas bacterianas de interesse médico em Macapá. **Diagn Tratamento**, Amapá, v. 28, n. 3, p. 85-90, 2019
- WHO. Estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization, 2017.