

ATIVIDADE ANTIESTAFILOCÓCICA E ESTUDO DA CINÉTICA DE AÇÃO DO EXTRATO DE ARAÇÁ (*Psidium cattleianum* Sabine)

LAÍS ABREU ANASTÁCIO¹; ANDREIA SALDANHA DE LIMA²; DIEGO PERES
ÁVILA²; LUIZ GUSTAVO BACH²; TASSIANA RAMIRES²; WLADIMIR PADILHA
DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – anastacio.alais@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – andreaia@ufpel.edu.br; diiperes1@gmail.com;
lugubach@hotmail.com; tassianaramires@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorrem pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados por micro-organismos, parasitas, toxinas ou produtos químicos prejudiciais à saúde (FDA, 2020; EFSA, 2021). Entre as principais bactérias causadoras de DTA destaca-se *Staphylococcus aureus*, um patógeno alimentar importante, devido à combinação de virulência mediada por toxinas e resistência a diversos antimicrobianos (CASTRO PÉREZ et al., 2020; MOLINERI et al., 2021). Entre 2010 e 2019, *S. aureus* aparece como o terceiro principal patógeno envolvido em surtos de DTA no Brasil, sendo responsável por 9,5% dos casos relatados (Brasil, 2020).

A contaminação bacteriana em alimentos é considerada um grave problema de saúde pública (WHO, 2015; MOTA et al., 2021), além de representar um desafio à indústria quanto a conservação e segurança dos produtos (ERICKSON & DOYLE, 2017). Uma forma de controle microbiano tradicionalmente utilizada é a aplicação de conservantes sintéticos, como nitrito e nitrato (FLETCHER, 2014). Entretanto, mudanças no perfil do mercado consumidor aumentaram a busca por alimentos mais sustentáveis (BEDALE et al., 2016; MOTA et al., 2020). Sendo assim, os extratos naturais são uma alternativa aos conservantes sintéticos, devido ao seu potencial de atividade bioconservante (FALLEH et al., 2020; BATIHA et al., 2021).

As plantas sintetizam diversos metabólitos secundários como mecanismos de defesa e muitas dessas moléculas têm sido estudadas, na busca de novas opções de antimicrobianos que possam atender à essa demanda de mercado (DHIFI et al., 2016; FALLEH et al., 2020). Segundo o Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2021), o Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta, com fontes inexploradas de frutíferas nativas, ricas em compostos bioativos. O araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) é uma fruta da família *Myrtaceae*, rico em vitamina C, minerais, ácidos graxos, polissacarídeos, compostos voláteis, carotenoides e compostos fenólicos (PEREIRA et al., 2018), no entanto, o potencial antimicrobiano do araçá ainda é pouco explorado. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antiestafilocócia e a cinética de ação antibacteriana do extrato de araçá (EA) contra *S. aureus*.

2. METODOLOGIA

Frutos maduros de araçá foram colhidos do banco de acessos da Embrapa Clima Temperado – Pelotas, RS. As frutas foram lavadas, sanitizadas, as sementes removidas e as polpas, com as cascas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento do preparo do extrato. Para o preparo do EA, as amostras foram maceradas com auxílio de um gral com pistilo. Foram usadas 10 g de amostra e 40 mL de álcool etílico P.A. (Synth[®], Brasil) diluído a 75%. Esse extrato foi submetido à agitação (200 rpm / 2 h), a temperatura ambiente e protegido da luz. Após, permaneceu 15 min em banho ultrassônico (Quimis[®], Brasil), a 48 A, e foi filtrado em papel filtro qualitativo. O filtrado foi centrifugado a $6.000 \times g$ por 20 min, e o sobrenadante foi evaporado em rotaevaporador laborota 4000 Heidolph[®] (Schwabach, Alemanha) a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, até peso constante.

A atividade antiestafilocócica do EA foi avaliada, inicialmente, por teste de disco difusão em ágar e, posteriormente, determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). No teste de difusão em ágar (CLSI, 2018), discos impregnados com 10 μL de EA foram colocados sobre ágar Mueller Hinton (Oxoid, UK), previamente inoculado em placas de Petri com a cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923. Para determinação da CIM e da CBM, foi utilizada a técnica de macrodiluição em caldo (CLSI, 2018). A cinética de ação antibacteriana foi realizada de acordo com protocolo descrito por Diao et al. (2014), com pequenas modificações. Após a determinação da CIM e CBM do EA, essas concentrações foram adicionadas a inóculos de *S. aureus* (10^5 UFC.mL⁻¹) em caldo BHI (Kasvi[®], Brasil), os quais foram incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 120 rpm por 24 h. No tempo 0 e, após 4, 8, 12 e 24 h, foram feitas diluições seriadas das amostras em água peptonada 0,1%, as quais foram inoculadas em ágar BHI e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Tubos de ensaio com o inóculo e sem o EA foram usados como controle. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram expressos como média (\pm desvio padrão). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O EA apresentou ação antiestafilocócica, com halos de 17 mm de diâmetro no teste de disco difusão em ágar. A CIM foi de 9 mg.mL⁻¹, e a CBM de 18 mg.mL⁻¹. Medina et al. (2011) avaliaram extratos aquosos e acetônicos de araçá contra *Salmonella* Enteritidis e encontraram atividade antibacteriana, com halos de inibição entre 8,6 e 17 mm e CIM de 5 a 16% da concentração do extrato. Os valores de atividade antimicrobiana encontrados nos diferentes estudos com extratos de vegetais são bastante variáveis e dependem, em grande parte, dos compostos bioativos presentes nesses vegetais, da escolha do solvente e do método de extração empregado (AZMIR et al., 2013; FALLEH et al., 2020).

Os resultados obtidos na análise de cinética de ação antibacteriana estão representados na Figura 1. É possível observar que, já nas primeiras 4 h de contato com o EA, houve redução de pelo menos quatro ciclos logarítmicos na multiplicação de *S. aureus* em relação ao controle. A presença do EA manteve a concentração de *S. aureus* estável, tendo em vista que não houve diferença estatística na contagem do micro-organismo nos tempos 0, 4 e 8 h, quando incubado na presença do EA.

Em relação às duas concentrações de EA utilizadas (CIM e CBM), houve diferença a partir de 8 h de incubação, sendo o micro-organismo completamente inibido em 24 h de incubação com a CBM. Com a utilização da CIM, ainda que *S. aureus* não tenha sido eliminado, a fase lag foi prolongada por 8 h e, após esse tempo, houve redução de 3 log do micro-organismo até as 24 h. Esse resultado é de grande importância, pois nos permite supor que, mesmo que o EA não elimine *S. aureus* em um alimento já contaminado, poderia prolongar a fase lag e evitar a síntese de enterotoxinas, uma vez que isso só ocorre quando o micro-organismo atinge a concentração bacteriana $\geq 10^5$ UFC.g⁻¹ de alimento (PINCHUK et al., 2010), mantendo o alimento seguro por mais tempo. A fase lag refere-se ao primeiro estágio da cinética de multiplicação bacteriana. Nesse momento os micro-organismos estão se adaptando ao ambiente e não se multiplicam, apenas aumentam o volume celular (MASOOD et al., 2020).

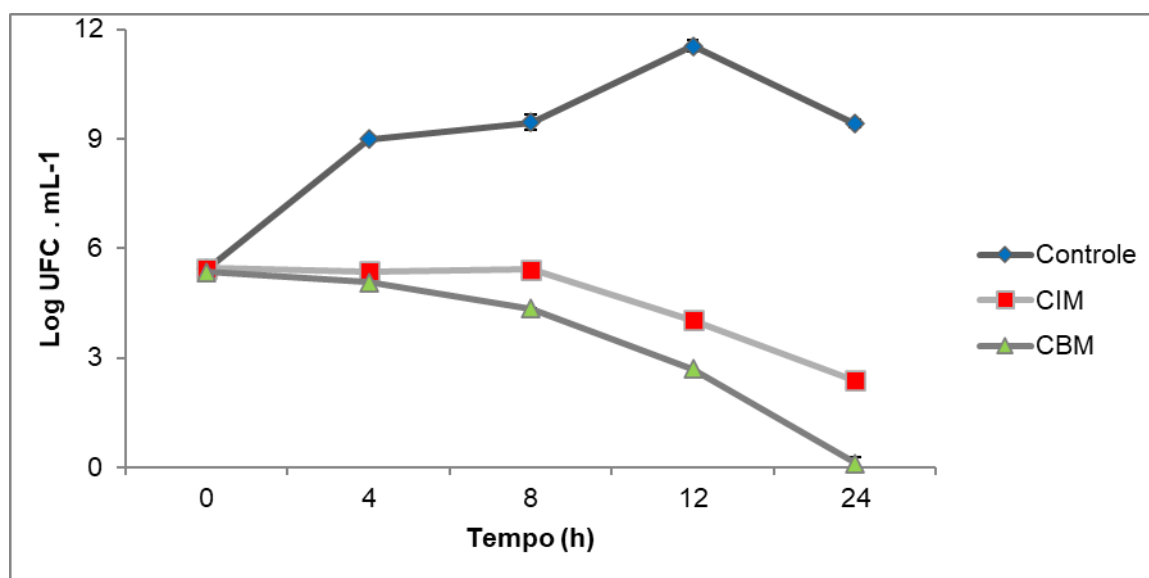


Figura 1: Cinética de ação antibacteriana de extrato de araçá contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; resultados expressos como média (n=3) ± desvio padrão

4. CONCLUSÕES

O extrato de araçá apresenta atividade antiestafilocócica. A avaliação da cinética de ação do EA contra *S. aureus* revelou importantes informações sobre a ação bacteriostática e bactericida contra esse micro-organismo, evidenciando que esse extrato foi capaz de inibir a multiplicação do patógeno, além de antecipar a fase de morte celular, quando em comparação com o controle, sem adição do extrato.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZMIR et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v117, p426-436, 2013.
BRASIL (2019). Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Acessado em 22 de julho de 2021. Online. Disponível em:

<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>

BATIHA et al. Application of natural antimicrobials in food preservation: Recent views. **Food Control**, v130, p108324, 2021.

BEDALE et al. Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions. **Meat Science**, v120, p85–92, 2016.

DIAO et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, v35, p109–116, 2014.

DHIFI et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medecines**, v3, p1-16, 2016

CASTRO PÉREZ et al. Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v22, p792-802, 2020.

EFSA (European Food Safety Authority), 2021. **Food Zoonotic Diseases**. Acessado em 22 de julho de 2021. Online. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/foodborne-zoonotic-diseases>

ERICKSON, M. C., & DOYLE, M. P. The Challenges of Eliminating or Substituting Antimicrobial Preservatives in Foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, v8(1), p371–390, 2017.

FALLEH et al. Essential Oils: A Promising Eco-Friendly Food Preservative. **Food Chemistry**, v330, p127268, 2020.

FLETCHER, N. Food Additives: Preservatives. **Encyclopedia of Food Safety**, v2, p471–473, 2014.

FDA (Food and Drug Administration), 2020. **Foodborne Pathogens**. Acessado em 23 de julho de 2021. Online. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/foodborne-pathogens>

MASOOD et al. Chapter 30 - Growth of bacterial cultures and preparation of growth curve. **Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology - A Practical Lab Manual**, v1, p163-166, 2021.

MEDINA et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v128, n4, p916–922, 2011.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2021. **Biodiversidade Brasileira**. Acessado em 23 de julho de 2021. Online. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira.html>

MOLINERI et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: Systematic review and meta-analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, v188, p105261, 2021.

MOTA, et al. Natural-based consumer health nanoproducts: medicines, cosmetics, and food supplements. **Handbook of Functionalized Nanomaterials for Industrial Applications**, p527–578, 2020.

PEREIRA et al. *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v258, p95–103, 2018.

PINCHUK et al. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, v2(8), p2177–2197, 2010.

WHO (World Health Organization). **Who estimates of the global burden of foodborne diseases**, 2015. Acessado em 23 de julho de 2021. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf