

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE *BUTIA ODORATA* (Barb. Rodr.) CONTRA *Escherichia coli* O157:H7

PÂMELA INCHAUSPE CORRÊA ALVES¹; NATALIE RAUBER KLEINUBING²;
ADRIELE DE AZAMBUJA FAGUNDES²; ISABELA SCHNEID KRONING²;
GRACIELA VOLZ LOPES²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – pam.inchauspe@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – natalierk10@hotmail.com; adrieleazambuja97@gmail.com;
isabelaschneid@gmail.com; gracielavlopes@yahoo.com.br

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

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa, que geralmente reside no intestino e no trato intestinal de humanos e animais de sangue quente. Algumas estirpes patogênicas de *E. coli* podem causar infecções no trato intestinal (*E. coli* diarréiogênica, DEC) e infecções extraintestinais (ExPEC) (MENG et al., 2013). *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), patotipo pertencente ao grupo de DEC, destaca-se pela capacidade de causar complicações graves, como a síndrome hemolítica urêmica (SHU) e a púrpura trombocitopênica trombótica, que pode causar o óbito das pessoas acometidas (CLEMETS et al., 2012; GOMES et al., 2016).

Os bovinos são considerados os principais reservatórios naturais de *E. coli* patogênica e a principal fonte de contaminação de alimentos por esse micro-organismo, a qual pode ocorrer após contaminação fecal direta ou indireta. O sorotipo O157:H7 é o principal quando associado a doenças graves de origem hídrica e alimentar, além de possuir uma baixa dose infecciosa (<100 organismos) (TUTTLE et al., 1999; THORPE, 2004).

No que diz respeito a contaminação microbiana, considerando que as bactérias transmitidas por alimentos constituem um perigo à saúde humana, é crescente o interesse por novos antimicrobianos (CLEMENTE et al., 2016). Dessa forma, entre os antimicrobianos alternativos mais estudados, se destacam os compostos presentes em plantas, incluindo frutas nativas do Brasil (MEDINA et al., 2011; BELDA-GALBIS et al., 2015), os quais tem apresentado atividade contra bactérias patogênicas (SHEN et al., 2014; DANNENBERG et al., 2016).

Neste contexto, o *Butia odorata* Barb. Rodr. é uma fruta nativa da América do Sul que vem sendo estudada quanto ao seu potencial tecnológico e bioatividade (BESKOW et al., 2015; CRUXEN et al., 2017). Em pesquisas recentes, o extrato de *B. odorata* apresentou atividade antimicrobiana contra micro-organismos de importância em alimentos (HAUBERT et al., 2019; MAIA et al., 2017). Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *B. odorata* (EBO) contra um isolado de *E. coli* O157:H7 proveniente de abatedouro frigorífico de bovinos, localizado em Pelotas, Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foi utilizado um isolado de *E. coli* O157:H7 proveniente de fezes de bovinos durante a etapa de oclusão do reto no momento do abate, em abatedouro

frigorífico localizado em Pelotas-RS, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas.

O extrato foi elaborado conforme Maia, Haubert, Soares, Würfel, & Silva (2019). Em um Erlenmeyer foram adicionados 30 g de polpa liofilizada de *B. odorata* e 300 mL de acetona (Synth, Brasil), os quais foram colocados em shaker SL 223 (190 rpm) (Solab, Brasil) por 2 h. Em seguida, foi centrifugado (7.500 rpm por 20 min) e o sobrenadante foi filtrado em papel filtro e evaporado rotativamente (30 °C) (Heidolph Rotary Evaporator, Laborota 4000, Sigma-Aldrich, EUA) até peso constante. Em seguida, o extrato foi armazenado a - 80 °C na ausência de luz.

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de *B. odorata* (EBO) foi realizada através da técnica de disco-difusão em ágar (CLSI, 2018). O isolado de *E. coli* O157:H7 foi cultivado em ágar Triptona de Soja (TSA, Acumedia®) a 37 °C durante 24 h. Após esse período, foi diluído em solução salina 0,85% até a turbidez 0,5 na escala de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) e, com auxílio de um swab esterilizado, foi semeado em placas de Petri contendo ágar Mueller–Hinton (MH, Kasvi®). Posteriormente, 10 µL do extrato de butiá foram inoculados em discos de papel filtro esterilizados, com 6 mm de diâmetro e, após a secagem dos discos, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Como controle negativo foi utilizado 10 µL de água destilada esterilizada. Após a incubação, a presença de halos de inibição ao redor dos discos foi verificada, os quais foram medidos e expressos em milímetros (mm).

Para avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizou-se a técnica de micro-diluição em caldo em placas de poliestireno. Primeiramente, o EBO foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, Brasil) para 400 mg.mL⁻¹. Em seguida, foram preparadas diluições seriadas de EBO em caldo MH (Kasvi®) com $\sim 1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ do inóculo bacteriano adicionado e incubado a 37°C por 24 horas. A CIM foi definida como a concentração mais baixa que não apresentou multiplicação bacteriana visível. Para a Concentração Bactericida Mínima (CBM), foi feita a semeadura em placas contendo ágar MH e incubação a 37 °C por 24 h. A CBM foi definida como a concentração mais baixa em que 99,9% das células inicialmente inoculadas estavam mortas (MAIA, et al., 2019).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana do EBO foi avaliada pelos testes de disco-difusão em ágar, CIM e CBM. No teste de disco-difusão em ágar, o isolado de *E. coli* O157:H7, avaliado neste estudo, demonstrou suscetibilidade ao EBO, apresentando um halo de 13 mm de diâmetro. A CIM do EBO foi de 26,6 mg.mL⁻¹, do mesmo modo a CBM, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de butiá contra *E. coli* O157:H7 por Disco-Difusão em Ágar, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Bactéria	Disco-difusão em ágar (mm)	CIM (mg.mL ⁻¹)	CBM (mg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> O157:H7	13	26,6	26,6

Estudos relataram que bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis a extratos vegetais, incluindo extratos de frutas, do que bactérias Gram-negativas (SHEN et al., 2014; YONG et al., 2018). No entanto, os resultados são variáveis de acordo com o fruto estudado. Extratos de casca de laranja, limão amarelo e banana, por exemplo, apresentaram melhor atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas do que Gram-positivas (SALEEM & SAEED, 2019).

Em um estudo anterior, o extrato hexânico de *B. odorata* apresentou melhor atividade inibitória contra bactérias Gram-negativas do que Gram-positivas (MAIA et al., 2017). Maia et al. (2020) também avaliaram a atividade antimicrobiana do EBO contra *E. coli*, utilizando acetona como solvente, o qual apresentou o valor de MIC de 15 mg mL⁻¹ e CBM de 29-58 mg mL⁻¹, resultados distintos dos encontrados neste estudo.

A atividade antimicrobiana do EBO contra *E. coli* O157:H7 pode ter ocorrido devido a sua afinidade com o lipolissacarídeo (LPS) da membrana externa dessa bactéria, uma vez que as bactérias gram-negativas são constituídas por uma membrana externa composta por uma camada dupla de LPS, que confere às bactérias maior resistência à passagem de pequenas moléculas antimicrobianas (RAI et al., 2017). Além disso, o tipo de solvente utilizado no processo de extração também influencia, uma vez que interfere no tipo de composto que será extraído (MAIA et al., 2017).

4. CONCLUSÕES

O extrato de *B. odorata* possui atividade antimicrobiana contra a bactéria *E. coli* O157:H7, um importante patógeno de origem alimentar. Dessa forma, demonstra potencial para ser utilizado como um agente bioconservante em alimentos, sendo necessários estudos para avaliar seu comportamento em sistemas alimentares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELDA-GALBIS, C. M. et al. Antimicrobial activity of açai against *Listeria innocua*. **Food Control**, v. 53, p. 212–216, jul. 2015.
- BESKOW, G. T. et al. Bioactive and yield potential of jelly palms (*Butia odorata* Barb. Rodr.). **Food Chemistry**, v. 172, p. 699–704, abr. 2015.
- CLEMENTE, I. et al. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 26–33, ago. 2016.
- CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71–87, mar. 2012.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- CRUXEN, C. E. D. S. et al. Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. **LWT**, v. 75, p. 379–385, jan. 2017.
- DANNENBERG, G. D. S. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 120–127, ago. 2016.

- GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3–30, dez. 2016.
- HAUBERT, L. et al. Tolerance to benzalkonium chloride and antimicrobial activity of *Butia odorata* Barb. Rodr. extract in *Salmonella* spp. isolates from food and food environments. **Food Research International**, v. 116, p. 652–659, fev. 2019.
- MAIA, D. S. V. et al. Antibacterial activity of *Butia odorata* Barb. Rodr. extracts. *Trends in Phytochemical Research*, 1, 169-174, 2017. MAIA, D. S. V. et al. *Butia odorata* Barb. Rodr. extract inhibiting the growth of *Escherichia coli* in sliced mozzarella cheese. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 3, p. 1663–1668, mar. 2019.
- MAIA, D. S. V. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food poisoning outbreaks and effect of *Butia odorata* Barb. Rodr. Extract on planktonic and biofilm cells. **LWT**, v. 117, p. 108685, jan. 2020.
- MEDINA, A. L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 916–922, out. 2011.
- MENG, J. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Em: DOYLE, M. P.; BUCHANAN, R. L. (Eds.). **Food Microbiology**. Washington, DC, USA: ASM Press, 2014. p. 287–309.
- SALEEM, M.; SAEED, M. T. Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 805–810, jan. 2020.
- SHEN, X. et al. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 159–165, jan. 2014.
- SPERANDIO V.; HOVDE C. J.; editors. **Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and other Shiga toxin-producing *E. coli***. Washington, DC: ASM Press, 2015, 553.
- TUTTLE, J. et al. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. **Epidemiology and Infection**, v. 122, n. 2, p. 185–192, abr. 1999.
- YONG, Y. Y. et al. Effect of refrigerated storage on betacyanin composition, antibacterial activity of red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and cytotoxicity evaluation of betacyanin rich extract on normal human cell lines. **LWT**, v. 91, p. 491–497, maio 2018.