

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATO DE MIRTILO (*Vaccinium ashei* Reade)

MARJANA RADÜNZ¹; PÂMELA INCHAUSPE CORRÊA ALVES²; ELISA DOS SANTOS PEREIRA³; TAIANE MOTA CAMARGO⁴; VALESKA RODRIGUES ROQUE⁵; ELIEZER AVILA GANDRA⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – marjanaradunz@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – pam.inchauspe@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – lisaspereira@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – taianemcamargo@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – lekaroque@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – gandraea@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas observa-se uma mudança no perfil alimentar da população, cada vez mais preocupada como uma alimentação saudável e livre de compostos com potencial carcinogênico, tais como nitritos e nitratos. Em razão disto, estudos tem se voltado para o desenvolvimento de novas alternativas a estes conservantes químicos tradicionalmente utilizados para o controle microbiano, como os sistemas naturais presentes em extratos e óleos vegetais (TASSOU et al., 1995; CARVALHO et al., 2006).

Os compostos antimicrobianos são substâncias que podem eliminar ou impedir o desenvolvimento dos microrganismos, podendo ser sintéticos ou naturais oriundos de bactérias ou fungos. A maioria das plantas também sintetizam compostos antimicrobianos que os protegem de microrganismos (RAMOS et al., 2007).

O mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) pertence à família Ericaceae e é originário da Europa Central e do Norte sendo introduzido no Brasil no Rio Grande do Sul em 1983 na região de Pelotas, RS (KIM et al., 2014). É conhecida como a fruta da longevidade por ser rica em fenóis, taninos, flavonóis e antocianinas que possuem diversos benefícios a saúde, tais como atividade antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória e antimicrobiana, por este motivo têm sido amplamente estudados (Wang et al., 2012; SILVA et al., 2013).

Diante disto, o objetivo do presente estudo é avaliar o potencial antimicrobiano de extrato de mirtilo frente as bactérias de três espécies associadas a doenças transmitidas por alimentos, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

2. METODOLOGIA

2.1 Aquisição da amostra e preparo do extrato

Os genótipos de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) da variedade O'neal foram adquiridos no Campo Experimental da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Para o preparo dos extratos as amostras foram liofilizadas e trituradas em moinho de bolas. Os extratos foram obtidos seguindo a metodologia proposta por Scherer e Godoy (2014) com algumas modificações. Na extração utilizou-se o solvente metanol, que foi evaporado e o extrato obtido foi ressuscitado em água destilada estéril na concentração final de 1000 mg/mL.

2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a realização da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas padrão de *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832) previamente reativadas (de um cultivo recente em caldo Soja Tripticaseína - TSB incubado por 24 horas a 37°C). A partir da reativação, foi extraída uma alçada e ressuspensa em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹).

2.2.1 Disco difusão

A análise de disco difusão foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2015a) com pequenas modificações. A solução salina padronizada contendo o inóculo foi semeada com auxílio de um swab estéril na superfície de placas com ágar Muller-Hinton, em seguida foram adicionados discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de 6 mm. Após, 5 µL do extrato foram impregnados sobre os discos de papel e as placas incubadas por 24 h a 37 °C. Logo após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição, sendo os resultados expressos em centímetros.

2.2.2 Concentração inibitória mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com o protocolo proposto pelo Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2015b) com pequenas modificações. Para isto foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion), inóculo bacteriano e o extrato de mirtilo puro e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações 3,33 e 0,33 mg mL⁻¹. Após o preparo da amostra, as placas de microtitulação foram avaliadas em espectrofotômetro a 620 nm. Em seguida, procedeu-se a incubação por 24 h a 37 °C, e após, foi realizada nova leitura em espectrofotômetro. A CIM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

2.2.3 Concentração bactericida mínima

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada de acordo com o método descrito por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações. Após a realização da CIM, foram retirados 15 µL dos poços das amostras que tiveram inibição e estriados em placas de Petri com ágar PCA (Plate Count Agar) e incubados por 24 h a 37 °C. Foi considerada a mínima concentração bactericida as placas onde não houve crescimento bacteriano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Disco difusão

A presença e o tamanho dos halos de inibição indicam a suscetibilidade das bactérias frente a uma amostra; halos menores que 0,7 cm são considerados não-ativos frente a bactéria enquanto superiores a 1,2 cm apresentam efeito inibitório satisfatório (ARORA & KAUR, 1999), deste modo pode-se observar que as bactérias testadas foram suscetíveis ao extrato, conforme resultado expresso na tabela 1.

Tabela 1. Halos de inibição obtidos pelo método de disco difusão por aplicação de extrato de mirtilo frente as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Bactérias	Halo de inibição (cm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,85±0,07
<i>Escherichia coli</i>	0,73±0,03
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,75±0,03

*Média das triplicatas

Estes resultados corroboram com a faixa de inibição encontrada na literatura, onde os halos formados frente a *S. aureus* variaram de 0,16 a 1,20 cm; *E. coli* entre 0,20 a 0,80 cm e *L. monocytogenes* entre 0,16 e 0,80 cm (SANTOS & SANTANA, 2016; PERVIN et al., 2013; LACOMBE et al., 2012).

3.2 Concentração Inibitória mínima e Concentração Bactericida Mínima

Uma amostra deve apresentar CIM de até 0,5 mg mL⁻¹ para ter uma forte atividade antimicrobiana; entre 0,6 a 1,5 mg mL⁻¹ para moderada e acima de 1,6 mg mL⁻¹ para fraca atividade (DUARTE et al., 2007). Em razão disto pode-se observar que o extrato de mirtilo possui uma forte atividade antimicrobiana frente as bactérias testadas, conforme expresso na tabela 2. Os resultados do presente trabalho corroboram com os encontrados na literatura que demonstram a forte atividade antimicrobiana do extrato de mirtilo, Khalifa et al. (2015) observaram CIM para *E. coli* de 0,0025 mg mL⁻¹, para *L. monocytogenes* de 0,00125 mg mL⁻¹ e para *S. aureus* de 0,005 mg mL⁻¹, Shen et al. (2014) verificaram CIM de 300 mg mL⁻¹ para *L. monocytogenes*, e Lacombe et al. (2012) encontraram 0,001 mg mL⁻¹ para *E. coli* e *L. monocytogenes*.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato de mirtilo a frente as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Bactérias	Concentração* (mg mL ⁻¹)	
	CIM	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,33	+
<i>Escherichia coli</i>	0,33	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,33	+

*Concentração diluída com dimetilsulfóxido; + presença de crescimento microbiano ; - ausência de crescimento microbiano

Quando avaliada a CBM observou-se que ocorreu morte bacteriana apenas para as cepas de *E. coli* na concentração de 0,33 mg mL⁻¹, Khalifa et al. (2015) e Lacombe et al (2012) verificaram que o extrato possui atividade bactericida frente a *E. coli* e *L. monocytogenes* em concentrações variando de 0,0025 a 0,002 mg mL⁻¹ e *S. aureus* de 0,01 mg mL⁻¹.

As diferenças encontradas entre os valores de CIM e CBM do presente com o encontrado na literatura podem ser em razão do tipo de cultivo da amostra, concentrações das substâncias e diferenças de métodos de extração e análise da atividade antimicrobiana (RIOS & RECIO, 2005).

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o extrato de mirtilo possui efeito antimicrobiano frente a *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* podendo ser utilizado como alternativa viável natural em substituição aos conservantes químicos, entretanto novas estudos devem ser realizados para avaliar concentrações para aplicação em alimentos, bem como avaliar seu potencial *in situ*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARORA, D.S.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. Internation. **Journal of Antimicrobials Agents**, v. 12, p. 257-262, 1999.
- CABRAL, I. S. R.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

- CLSI, 2015a. M02-A12: **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition**. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35.
- CLSI, 2015b. M07-A10: **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition**. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35. DUARTE, M. C. T.; LEME, C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec Escherichia coli. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 139-143, 2006.
- KHALIFA, H.O.; KAMIMOTO, M.; SHIMAMOTO, T.; SHIMAMOTO, T. Antimicrobial Effects of Blueberry, Raspberry, and Strawberry Aqueous Extracts and their Effects on Virulence Gene Expression in Vibrio cholera. **Phytotherapy Research**, v.29, p. 1791-1797, 2015.
- KIM, J.; LEE, K.; LEE, H.; WATSON, R. R.; PREEDY, V. R.; ZIBADI, S. Polyphenols suppress and modulate inflammation. **Polyphenols in Human Health and Disease**, v. 1, p. 393-408, 2014.
- LACOMBE, A.; WU, V.C.H.; WHITE, J.; TADEPALLI, S.; ANDRE, E.E. The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic Lactobacillus rhamnosus. **Food Microbiology**, v.30, p. 124-131, 2012.
- PERVIN, M.; HASNAT, M.A.; LIM, B.O. Antibacterial and antioxidant activities of *Vaccinium corymbosum* L. leaf extract. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n.6, p. 444-453, 2013.
- RAMOS, E.; MACHADO, A.; LOPES, J.G.; COSTA, S.H.M. **Antimicrobianos em ginecologia e obstetrícia**. Porto Alegre: Artmed, 2007, 373 p.
- RIO, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80 – 84, 2015.
- SANTOS, T.R.J.; SANTANA, L.C.L.A. Potencial antimicrobiano de diferentes extratos da casca de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*). In: **VII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TECHNOLOGICAL INNOVATION**. Sergipe: 2016. Proceeding of ISTI/SIMTEC, v. 3, n.1, p.247-251.
- SCHERER, R.; GODOY, H.T. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.1, p. 41-46, 2014.
- SHEN, X.; SUN, X.; XIE, Q.; LIU, H.; ZHAO, Y.; PAN, Y.; HWANG, C.; WU, V.C.H. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. **Food Control**, v.35, p. 159-165, 2014.
- SILVA, S.; COSTA, E.M.; PEREIRA, M.F.; COSTA, M.R.; PINTADO, M.E. Evaluation of the antimicrobial activity of aqueous extracts from dry *Vaccinium corymbosum* extracts upon food microorganism. **Food Control**, n. 34, p. 645-650, 2013.
- TASSOU, C. C.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish filests in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere on air. **Journal of Food Protection**, n. 59, p. 31-34, 1995.