

EFEITO ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS DE FRUTOS DE *Psidium cattleianum* S. E *Eugenia uniflora* L. CONTRA PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS

MARCELLE OLIVEIRA GARCIA¹; GABRIELE BENATTO DELGADO²; FLÁVIA LIÉGE SCHÜTZ VOLOSKI³; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS CONCEIÇÃO⁴; EDUARDA HALLAL DUVAL⁵

^{1,3} Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Pelotas – marcelle_garcia@hotmail.com; fla_voloski@hotmail.com

² Graduanda em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Pelotas – gabriele_delgado@hotmail.com;

^{4,5} Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal/Departamento de Veterinária Preventiva/ Universidade Federal de Pelotas – ritinhaconceicao@hotmail.com; eduardahd@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, constituindo um problema de saúde pública e afetando o desenvolvimento econômico dos países (WHO, 2015).

Para controlar as alterações desenvolvidas por micro-organismos patogênicos, indesejáveis em alimentos, frequentemente as indústrias envolvem a aplicação de conservantes sintéticos (BAJPAI et al., 2012). Contudo, seu uso tem sido reconhecido por causar alguns perigos à saúde humana (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009). Embora os antimicrobianos sintéticos sejam aprovados em muitos países, a tendência recente tem sido o uso de conservantes naturais, devido aos efeitos adversos daqueles aditivos para a saúde. Portanto, fontes alternativas de conservantes naturais precisam ser exploradas (NEGI, 2012).

Nesse contexto, estudos relatam a atividade antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais das espécies da família Myrtaceae, como *Eugenia uniflora* L. (BRUN; MOSSI, 2010) e *Psidium cattleianum* S. (MACHADO et al., 2008), conhecidos popularmente por pitanga e araçá, respectivamente, frente a diferentes micro-organismos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de sensibilidade das cepas padrões de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus* frente a extratos aquoso e etanólico de *E. uniflora* L. e *P. cattleianum* S.

2. METODOLOGIA

O material vegetal foi obtido através da coleta manual de frutos de plantas adultas de *P. cattleianum* S. e *E. uniflora* L.. As amostras dos frutos de ambas as plantas, foram congeladas em ultrafreezer, sendo posteriormente, liofilizadas e maceradas, para produção dos extratos aquoso (LIN et al., 1999, modificado) e etanólico (MIDORIKAWA et al., 2001, modificado). Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram filtrados. Na sequência, o extrato etanólico foi evaporado em rotaevaporador a vácuo e o extrato aquoso foi liofilizado, para que toda a água fosse removida. Posteriormente, ambos extratos foram ressuspensos em solução salina estéril na concentração de 1:1, sendo logo armazenados sob refrigeração a -4 °C até serem utilizados.

Para o teste microbiológico foram utilizadas 6 cepas de referência, sendo elas *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 12900, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Typhimurium ATCC 00150 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311. As cepas foram semeadas em 5 mL de caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) e incubadas overnight a 37°C. Após, procedeu-se a padronização dos inóculos até atingir 0,5 de DO (10^8 CFU / mL) utilizando o espectrofotômetro.

Para a realização do ensaio de disco-difusão em ágar dos extratos vegetais, foi utilizada a técnica proposta pela CLSI (2015). Semeou-se em toda a superfície de placas contendo ágar Müller-Hinton, 0,1 mL de cada inóculo padronizado. Em seguida, discos de papéis filtro esterilizados (5 mm de diâmetro) foram dispostos na superfície do ágar contendo o inóculo. Após, 5 µL dos extratos em estudo foram adicionados sobre os discos. As placas foram incubadas a 37°C/24 horas. O experimento foi realizado em triplicata para cada isolado. O teste de difusão em disco foi avaliado pela presença de um halo inibitório ao redor do disco, indicando sua ação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foi verificado que todas as cepas testadas mostraram algum grau de sensibilidade aos extratos etanólicos de *P. cattleianum* S. e de *E. uniflora* L.. Em relação aos extratos aquosos, apenas o extrato de *P. cattleianum* S. apresentou halo de inibição frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644, conforme pode ser analisado na tabela 1. MEDINA et al. (2011) obtiveram um potencial antimicrobiano em todos os extratos aquosos de frutos de *P. cattleianum* S. (diâmetro médio da zona de inibição [DIZ] = 15,5 e 17 mm) frente a *S. enteritidis*, resultados que vão contra os apresentados em nosso trabalho, pois o extrato aquoso teve halo de 6,3 mm apenas para a cepa de *Listeria monocytogenes*, dentre todas testadas.

Segundo ALVES et al. (2000) ao analisar o extrato metanólico de *Eugenia pitanga*, percebeu algum grau de atividade contra todas as cepas bacterianas testadas, incluindo *E. coli*. Além disso, no ensaio de difusão em ágar usando quatro diferentes cepas bacterianas, mais de 60% das espécies de plantas apresentaram extratos etanólicos com algum grau de atividade, particularmente contra as bactérias Gram-positiva. O mesmo foi verificado na pesquisa de NAIR; CHANDA (2007) quando analisaram extratos de *P. guajava* L. com metanol, acetona, N-dimetilformamida e obtiveram uma ação antimicrobiana mais pronunciada contra bactérias Gram-positivas quando comparada a Gram-negativas, assim como os resultados apresentados para o extrato etanólico de *P. cattleianum* S. no nosso estudo.

KIM et al. (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana de 12 extratos etanólicos de vegetais (*T. chebula*; *S. flavescens*; *H. anthelmintica*; *R. officinalis*; *C. sativa*; *C. molmol*; *M. alba* L.; *A. pilosa*; *A. sieboldii*; *P. densiflora*; *S. aromaticum*; *T. orientalis* L.) contra *S. Typhimurium*, *E. coli* O157: H7 e *L. monocytogenes* usando o ensaio de difusão de disco e o resultado mostrou a grande variação na atividade antimicrobiana de extratos de plantas. Dos extratos testados 10 apresentaram zona de inibição (DIZ = 10,5 mm) frente a *S. Typhimurium*, e níveis relativamente altos na inibição (DIZ= 10,1 a 15,8 mm) para *L. monocytogenes*, enquanto no presente estudo os halos variaram de 6,2 a 8,8 mm. Apenas 7 extratos possuíram ação

inibitória para *E. coli* O157: H7 com DIZ variando entre 8,6 a 10,0, sendo que, no nosso trabalho os dois extratos etanólicos obtiveram halos quando testados contra *E. coli* (7,5 para o extrato de araçá e 6,8 para o extrato de pitanga).

Tabela 1. Zona de inibição apresentando a atividade antimicrobiana de cada um dos extratos testados contra patógenos de origem alimentar.

Extratos	Zona		De	Inibição* (mm)		
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 12900	<i>L. monocytogene</i> s ATCC 7644	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Salmonella</i>	<i>Typhimurium</i>	
				ATCC 14028	ATCC 00150	ATCC 13311
Aq. A ^a	-	6,3	-	-	-	-
Aq. P ^b	-	-	-	-	-	-
ETOH A ^c	7,5	8,8	8,3	6,8	6,8	6,6
ETOH P ^d	6,8	6,5	7,0	6,5	6,6	6,2

* Média dos halos de inibição da triplicata

- Sem halo de inibição

^a Extrato aquoso de *P. cattleianum* S. (Araçá)

^b Extrato aquoso de *E. uniflora* L. (Pitanga)

^c Extrato etanólico de *P. cattleianum* S. (Araçá)

^d Extrato etanólico de *E. uniflora* L. (Pitanga)

A atividade antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais de plantas é associada à presença de compostos químicos resultantes do seu metabolismo secundário (DUARTE, 2006). O mecanismo para a atividade antimicrobiana de muitos extratos de plantas foram atribuídos a compostos fenólicos que podem reagir com a membrana celular, e inativar enzimas essenciais e/ou que formam complexos com íons metálicos, limitando sua disponibilidade ao metabolismo microbiano (MEDINA et al., 2011). A literatura mostra que espécies de *P. cattleianum* S. e *E. uniflora* L. são ricas em compostos fenólicos (AURICCHIO; BACCHI, 2003; SUN et al., 2002) e como pode ser percebido o presente estudo mostrou halos maiores nos extratos etanólicos, esses resultados podem ser explicados devido a presença de compostos fenólicos nos frutos que poderiam atuar na membrana do micro-organismo impedindo a proliferação de células bacterianas.

4. CONCLUSÕES

Portanto, conclui-se que os extratos etanólicos de *P. cattleianum* S. e *E. uniflora* L. apresentaram halos maiores quando comparado aos demais extratos testados.

Novos estudos necessitam ser realizados para potencializar a ação antimicrobiana dos extratos dos dois frutos para que possam ser utilizados como fonte de antimicrobianos naturais a ser aplicado em alimentos contra diversos patógenos de importância alimentar.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, T. M. de A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. de F. A.; JÚNIOR, A. S.; ZANI, C. L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants.

- Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 95, n. 3, p. 367-373, May/Jun. 2000.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, vol. 62, n. 1, p. 55-61, 2003.
- BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734, 2012.
- BRUN, G. R.; MOSSI, A. J. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Perspectiva**. Erechim, vol. 34, n. 127, p. 135-142, 2010.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement**. CLSI document M100-S25, 2015.
- DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência: Construindo a história dos Produtos Naturais**. v.7, out. 2006.
- GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, p. 142-150, 2009.
- KIM, S.-Y.; KANG, D.-H.; KIM, J.-K.; HA, Y.-G.; HWANG, J. Y.; KIM, T.; LEE, S.-H. Antimicrobial Activity of Plant Extracts Against *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on Fresh Lettuce. **Journal of Food Science**. vol. 76, n. 1, 2011.
- LIN, J.; OPOKU, A. R.; GEHEEB-KELLER, M.; HUTCHINGS, A.D.; TERBLANCHE, S. E.; JÄGER, A. K.; STADEN, J. van. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 68, p. 267-274, 1999.
- MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**. Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33 – 39, 2008.
- MEDINA, A. L.; HASS, L. I. R.; CHAVES, F. C.; SALVADOR, M.; ZAMBIAZI, R. C.; SILVA, W. P. da; NORA, L.; ROMBALDI, C. V. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**. v.128, p. 916-922, 2011.
- MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A. G.; KADOTAI, S. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Propolis. **Phytochemical Analysis**. v. 12, p. 366 – 373, 2001.
- NAIR, R.; CHANDA, S. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38,p.452-458, 2007.
- NEGI, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 7-17, 2012.
- SUN, J.; CHU, Y.; WU, X.; LIU, R. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.50, n. 25, p. 7449 - 7454, 2002.
- WHO (World Health Organization), 2015. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. Disponível em: <
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf> Acesso em: 30 set. 2017.