

## ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE AMORA-PRETA (*Rubus spp.*) CV. TUPY FRENTE À MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS

TAIANE MOTA CAMARGO<sup>1</sup>; ELISA DOS SANTOS PEREIRA<sup>1</sup>; MARJANA RADÜNZ<sup>1</sup>; VALESKA RODRIGUES ROQUE<sup>1</sup>; MARCIA VIZZOTTO<sup>2</sup>; ELIEZER ÁVILA GANDRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFPel – tainemcamargo@gmail.com

<sup>2</sup>Embrapa Clima Temperado – marcia.vizzotto@embrapa.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – gandraea@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O uso de extratos de plantas como agentes com atividade antimicrobiana tem sido foco de diversos estudos nos últimos anos, em especial para alimentos, já que estes podem ser utilizados como aditivos alimentares, tendo, assim, efeitos benéficos para a saúde humana (AZEVEDO, 2011).

As amoras-pretas (*Rubus spp.*) pertencem a família Rosaceae, sendo que a fruta *in natura* é rica em diversos nutrientes (ANTUNES, 2002). A cultivar Tupy é a mais cultivada no Brasil, sendo que as mesmas são consideradas excelentes fontes de compostos fenólicos, existindo uma grande diversidade de características sensoriais, dependendo da cultivar, tanto no sabor quanto na coloração; estas diferenças estão associadas ao conteúdo de polifenóis e ao perfil da fruta (GUEDES, et al., 2017; TULIO, et al., 2013). A estes compostos bioativos, principalmente os compostos fenólicos e ácidos orgânicos, é atribuída a atividade antimicrobiana e antioxidante da fruta e seus extratos (AZEVEDO, 2011).

Se utilizados como aditivos alimentares, os extratos de frutas podem fornecer proteção contra micro-organismos deteriorantes e patogênicos (AZEVEDO, 2011). *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são micro-organismos patogênicos, estando entre as principais bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA's), que ocorrem devido à ingestão de alimentos contaminados por estes e outros patógenos, e pelas toxinas produzidas pelos mesmos. Considerando isto, este estudo teve como objetivo determinar a atividade antibacteriana de extratos de amora-preta (*Rubus spp.*), da cultivar Tupy, frente às bactérias patogênicas *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Obtenção das amostras e preparo dos extratos

Os genótipos de amora-preta (*Rubus spp.*) da cultivar Tupy foram adquiridos no Campo Experimental da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. As frutas foram liofilizadas, e triturados em moinho de bolas até obter-se a consistência de pó. Os extratos foram obtidos seguindo a metodologia proposta por Scherer e Godoy (2014). Na extração utilizou-se o solvente metanol, que foi evaporado e o extrato obtido foi ressuspensido em água destilada estéril na concentração de 1 g/mL.

#### 2. 2 Atividade antimicrobiana das amostras

A avaliação do efeito antimicrobiano das amostras foi realizada por meio de três metodologias: disco difusão, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Foram testados os efeitos antimicrobianos do extrato de amora-preta sobre as cepas padrão das espécies

de bactérias *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832).

### 2.3 Reativação dos microrganismos

As bactérias utilizadas no experimento foram mantidas sob congelamento em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v:v). Para realizar a reativação, uma alçada dessas bactérias foi transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB) e incubadas em estufa durante 24 h a 37°C. Após, uma alçada deste crescimento foi estriada em placas de Petri com meios seletivos, sendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli*, ágar Oxford para *L. monocytogenes* e ágar Baird-Paker para *S. aureus*, e incubadas por 24/48 h a 37°C, para o isolamento das colônias. Do crescimento bacteriano nas placas de Petri, foi extraída uma alçada e ressuspendida em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland (1,5 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

### 2.4 Disco difusão

A análise de disco difusão foi realizada de acordo com o método descrito pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (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 de extrato de amora-preta 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. Os resultados de disco difusão foram expressos em mm ± desvio padrão após três medidas equidistantes dos halos formados.

### 2.5 Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com o método descrito pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2015b), com pequenas modificações. Para tal, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde foram acrescentadas em cada poço 100 µL de caldo BHI, 100 µL de inóculo (80 µL de caldo BHI e 20 µL de água salina com crescimento bacteriano) e o extrato de amora-preta em três diferentes concentrações de amostra pura (100 µL extrato de amora-preta puro); 1:100 (1 µL de extrato de amora-preta e 99 µL de DMSO) e 1:1000 (0,1 µL de extrato de amora-preta e 99,9 µL de DMSO).

Após o preparo da amostra, as placas de microtitulação foram avaliadas em espectrofômetro 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, sendo expressa em µg mL<sup>-1</sup>.

### 2.6 Concentração Bactericida Mínima

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada de acordo com o método proposto por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações. Após a realização da CIM, foram retirados 15 µL dos poços dos extractos de amora-preta que tiveram inibição, os mesmos foram estriados em placas de Petri com ágar BHA (*Brain Heart Infusion 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

Os resultados obtidos na análise de disco difusão são apresentados na Tabela 1, enquanto os resultados obtidos na análise concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) são mostrados na Tabela 2.

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

Bactérias	Halo de inibição (mm)*
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,7±0,06
<i>Escherichia coli</i>	6,8±0,06
<i>Listeria monocytogenes</i>	7,3±0,06

\*Média das triplicatas ± desvio padrão

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

Bactérias	Concentração* ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	
	CIM	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i>	330	+
<i>Escherichia coli</i>	330	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	330	-

\*Concentração diluída com dimetilsulfóxido; + Crescimento do micro-organismo; - Não crescimento do micro-organismo.

Como podemos observar (Tabela 1) os extratos de amora-preta (*Rubus spp.*) obtiveram halos de inibição de 7,7, 6,8 e 7,3 (mm) para os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, respectivamente. A maior inibição foi observada do extrato em relação ao micro-organismo *Staphylococcus aureus* (7,3 mm). ARORA & KAUR (1999) relatam que halos menores do que 7 mm são considerados não-ativos, e halos superiores a 12 mm possuem inibição satisfatória frente à micro-organismos.

Em relação à concentração inibitória mínima, o extrato de amora-preta foi testado em três diferentes concentrações (amostra pura, 1:100 e 1:1000), sendo que o mesmo apresentou inibição na menor concentração em todos os micro-organismos.

O extrato apresentou ação bactericida frente aos micro-organismos *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, não havendo crescimento destes micro-organismos, enquanto a *Staphylococcus aureus* apresentou crescimento, mostrando, assim, que o extrato não possui ação bactericida frente a este micro-organismo.

RADOVANOVIC e colaboradores (2013) realizaram as análises de disco difusão, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de extratos de amoras-pretas provenientes da Sérvia e encontraram valores para disco difusão, de 16 mm e 13,7 mm para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente, valores estes superiores aos encontrados neste estudo. A concentração inibitória mínima encontrada por estes autores foi de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para *Escherichia Coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. As concentrações de inibição mínima encontrada neste estudo, para *Escherichia Coli* foi inferior (330 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), e para *Staphylococcus aureus* foi superior (330 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), porém, devemos salientar que esta foi a menor concentração

testada, portanto, novos estudos devem ser realizados a fim de elucidar em que concentração o extrato é capaz de cessar a inibição.

PEREIRA (2008) salienta que embora valores encontrados por outros autores seja objeto de comparação, a composição e sua consequente atividade dependem de variáveis como tipo de planta, estado de terra, clima, local de permanência da fruta desde a colheita, preparação, entre outros.

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que os extratos de amora-preta obtiveram atividade antibacteriana frente aos micro-organismos estudados, apresentando halos de inibição dentro da faixa considerada inibitória na maioria dos micro-organismos testados, atividade inibitória em todas as concentrações testadas, e atividade bactericida frente aos micro-organismos *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, L. E. C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 151-158, 2002.
- ARORA, D.S.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. Internation. **Journal of Antimicrobials Agents**, v. 12, p.257-262, 1999.
- AZEVEDO, M. L. **Perfil fitoquímico, atividades antioxidante e antimicrobiana de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy em diferentes estádios de maturação cultivada em clima temperado.** 2011, 76F. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.
- 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.
- GUEDES, M. N. S.; PIO, R.; MARO, L. A. C.; LAGE, F. F.; ABREU, C. M. P.; SACZC, A. A. Antioxidant activity and total phenol content of blackberries cultivated in a highland tropical climate. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 39, n. 1, p. 43-48, Jan.-Mar., 2017.
- PEREIRA, Vinicius Rodrigues. **Ácido Ascórbico – características, mecanismos de atuação e aplicações na indústria.** 2008. 39f. Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- RADOVANOVIC, B. C.; ANDELCOVIC, A. S. M.; RADOVANOVIC, A. B.; ANDELCOVIC, M. Z. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenol Extracts from Wild Berry Fruits Grown in Southeast Serbia. **Tropical Journal Pharmaceutical Research**, Serbia, October 2013;12 (5): 813.
- SCHERER, R.; GODOY, H.T. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16, n.1, p. 41-46, 2014.
- TULIO, L.; AYUB, R. A. Production of blackberry cv tupy, depending on the intensity of pruning. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1147-1152, maio/jun. 2013.