

INIBIÇÃO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS POR EXTRATOS ALCOOLICOS DE DISTINTAS PARTES DA VIDEIRA (VITIS VINÍFERA)

Lucas Santos¹

Fernando Zocche²

Resumo:

Foram utilizados 7 cultivares diferentes de *Vitis vinifera*: Chardonnay, Pinot Noir, Touriga Nacional, Petit Verdot, Tannat, Alicante Bouschet e Merlot, das quais foram coletadas cascas de uva, ráquis e sarmentos. O material vegetal (cascas, ráquis e sarmentos) foi seco em estufa, após as amostras foram convertidas em pó vegetal e passaram por uma maceração etanólica durante 7 dias ao abrigo da luz, posteriormente o extrato foi filtrado e desidratado em banho maria até evaporação completa do solvente. O material seco foi reidratado com água destilada. *Staphylococcus aureus* foi desafiado com os distintos extratos com o método de difusão em ágar, as bactérias foram inoculadas em superfície de ágar com auxílio de swabs estéreis. Poços com um diâmetro de 9 mm foram perfurados no ágar onde extratos foram inoculados nos poços num volume de 50µL, as placas foram incubadas à 35°C/24h e os halos de inibição foram medidos com auxílio de uma régua. Os extratos alcoólicos inibiram o crescimento de *S. aureus*. Necessita-se mais pesquisa para buscar a purificação dos compostos e testes isolados de cada substância purificada. Dado o potencial efeito inibitório destes extratos, sugerem-se mais testes para a incorporação e uso destes extratos como agentes bioconservantes em alimentos ou potencializadores de inibição microbiana em ambientes onde *S. aureus* possa estar inserido.

Palavras-chave: uva, bactericida

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

INIBIÇÃO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS POR EXTRATOS ALCOOLICOS DE DISTINTAS PARTES DA VIDEIRA (VITIS VINÍFERA)

¹ Aluno de graduação. lvs272@gmail.com. Autor principal

² Docente. fernandozocche@unipampa.edu.br. Orientador

INIBIÇÃO DE *Staphylococcus aureus* POR EXTRATOS ALCOOLICOS DE DISTINTAS PARTES DA VIDEIRA (*Vitis vinífera*)

1. INTRODUÇÃO

Dentre os patógenos de importância alimentar destaca-se *Staphylococcus aureus*, classificado como bactéria Gram positiva, potencialmente capaz de produzir toxinas intimamente relacionadas com intoxicação alimentar, sendo responsável por 5,8% dos casos/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Brasil (ANVISA, 2016).

Doenças transmitidas por alimento (DTAs) são todas ocorrências clínicas consequentes à ingestão de alimentos que possam estar contaminados com micro-organismos patogênicos. O centro de controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos estima que a cada ano 48 milhões de pessoas são acometidas por doenças de origem alimentar, 128.000 são hospitalizadas e 3.000 morrem (CDC, 2017). O perfil epidemiológico brasileiro acena que entre os anos de 2007 à 2016 ocorreram 6.632 surtos de DTAs, com 17.186 hospitalizações e 109 mortes (ANVISA, 2016).

Vitis vinífera é uma espécie vegetal da família das *Vitaceas* e de gênero *Vitis* cujo fruto é conhecido principalmente por ser utilizado para elaboração de vinhos. Muito embora alguns frutos de espécies de *Vitis* sejam consumidos *in natura*, essa espécie é destinada a produção de uvas para elaboração de vinhos devido aos compostos de aroma e sabor que possuem e que geram através da fermentação alcoólica.

Reconhecidamente sabe-se que vinho tem um potencial antimicrobiano (RADOVANOVIĆ et al., 2016, SANHUEZA et al., 2017, TSUKADA et al., 2017), muito provavelmente associado aos polifenóis e taninos. Estes compostos presentes principalmente na casca da uva são transferidos ao vinho durante o processo de vinificação, principalmente nos vinhos tintos.

Buscando novos componentes que possam contribuir no controle de *Staphylococcus* nos ambientes onde essa bactéria está inserida, antimicrobianos de origem vegetal tem sido testados (DEHKORDI et al., 2015, ALMEIDA et al., 2017, TSUKADA et al., 2017, YADAV et al., 2017) em distintas escalas com relação ao potencial de inibição/morte deste agente patogênico.

Dessa forma, este trabalho objetivou novas alternativas para inibição de *Staphylococcus aureus in vitro* por meio de extratos vegetais de fragmentos de videira (*Vitis vinífera*).

2. METODOLOGIA

2.1 Material vegetal

Foram utilizados 7 cultivares diferentes de *Vitis vinífera*: Chardonnay, Pinot Noir, Touriga Nacional, Petit Verdot, Tannat, Alicante Bouschet e Merlot, das quais foram coletadas cascas de uva, rãquis e sarmentos.

2.2 Bactérias

Staphylococcus aureus ATCC 25923 foi utilizada como padrão. O micro-organismo foi mantido em caldo BHI (infusão de cérebro e coração), repicadas a cada 7 dias para manutenção, sendo utilizado para os testes um cultivo recente de 18-24h.

2.3 Preparação dos extratos

O material vegetal (cascas, ráquis e sarmentos) foi seco em estufa à 60°C durante 7 dias. Após, as amostras foram convertidas em pó vegetal. De cada um dos pós foram separados 5g e adicionados 13mL de álcool 70%, deixando-os em maceração etanólica durante 7 dias ao abrigo da luz. Após, o extrato foi filtrado e desidratado em banho maria até evaporação completa do solvente. O material seco foi reidratado com água destilada obtendo-se uma concentração aproximada de 3.850µg.µL⁻¹.

2.4. Teste de sensibilidade aos extratos

Staphylococcus aureus foi desafiado com os distintos extratos com o método de difusão em ágar. Partindo do cultivo da bactéria em caldo BHI (infusão de cérebro coração) diluiu-se com auxílio de solução salina 0,85% estéril até obtenção de uma turbidez equivalente a 0,5 da escala de MacFarland. Após, as bactérias foram inoculadas em superfície de ágar Mueller Hinton com auxílio de swabs estéreis. Poços com um diâmetro de 9 mm foram perfurados no ágar. Os extratos foram inoculados nos poços num volume de 50µL, as placas foram incubadas à 35°C/24h e os halos de inibição foram medidos com auxílio de uma régua.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados da inibição de *Staphylococcus aureus* frente aos distintos extratos podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1: Inibição, em milímetros, de *Staphylococcus aureus* frente aos extratos alcoólicos de distintos fragmentos de *Vitis vinifera*.

<i>Vitis vinifera</i> /fragmentos vegetais	Chardonnay	Pinot Noir	Touriga Nacional	Petit Verdot	Tannat	Merlot	Alicante Bouschet
Cascas	0	13	12	13	12	14	17
Ráquis	14	15	15	14	14	17	16
Sarmentos	14	15	16	11	15	13	13
Controle positivo Azitromicina - 15µg	19	19	19	19	20	20	20

Observou-se que foi necessária uma massa aproximada de 12.830 vezes maior do que a do antibiótico para visualização de efeitos de inibição parecidos. Nesse sentido vale ressaltar que: 1. Houve inibição de *Staphylococcus aureus* com os extratos alcoólicos; 2. Os extratos alcoólicos foram testados na forma bruta, sem purificação de nenhum composto; 3. O antibiótico utilizado como padrão está com o princípio ativo purificado.

Comparando os resultados das cascas entre as variedades de *Vitis vinifera* foi possível observar maior inibição de *S. aureus* quando utilizada a variedade Alicante

Bouschet. Isso pode ser atribuído à característica de maior quantidade de polifenóis nas cascas desta variedade, uma propriedade que faz com que sua utilização se dê principalmente na incorporação em outros tipos de vinhos com o objetivo de dar corpo e cor ao produto. Nesse mesmo sentido não foi observado inibição quando se utilizaram cascas de uma variedade de uva branca, a Chardonnay. Diante do observado, pode-se sugerir que o efeito inibitório de *S. aureus* deveu-se à compostos fenólicos (cascas) e taninos (raquis e sarmentos) presentes nos fragmentos vegetais, corroborando as pesquisas de YADAV et al. (2017) que observaram inibição de 22 mm contra *Staphylococcus aureus* pelo método de difusão em poço de ágar utilizando uma massa de 1080mg de extrato de casca de uva. Estes mesmos autores obtiveram resultados de inibição contra outras bactérias como *Enterococcus faecalis* e *Enterobacter aerogenes*.

Quando os extratos alcoólicos de videira foram testados contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis não foi possível evidenciar inibição (dados não mostrados). Assim, é possível inferir que os agentes inibitórios possam estar interagindo com elementos de membrana plasmática e parede celular de *S. aureus*, dados a peculiar composição destas estruturas, com fragilização da célula, não permitindo a multiplicação do micro-organismo.

Em estudos semelhantes, RADOVANOVIC et al. (2009) acharam resultados semelhantes com a variedade Cabernet Sauvignon encontrando uma inibição de *Staphylococcus* de 22mm enquanto que QABAHA (2013) conseguiram uma inibição de 22.3mm utilizando 25mg de extrato de semente de uva por poço. BAYDAR et al. (2004) observaram um resultado semelhante, demonstrando inibição de 26-30 mm contra *S. aureus* pelo método de difusão em disco. SHRESTHA et al. (2012) conseguiram uma inibição de 7-12.5 mm contra *S. aureus* utilizando extrato de semente de uva.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos alcoólicos inibiram o crescimento de *S. aureus*. Necessita-se mais pesquisa para buscar a purificação dos compostos e testes isolados de cada substância purificada.

Dado o potencial efeito inibitório destes extratos, sugerem-se mais testes para a incorporação e uso destes extratos como agentes bioconservantes em alimentos ou potencializadores de inibição microbiana em ambientes onde *S. aureus* possa estar inserido.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. C.; RODRIGO, M. P.; ERNANE R. M.; FONSECA, F. S. A.; CINTYA, N. S.; PRATES, J. P. B.; OLIVEIRA, F. D.; SILVA, L. V. Atividade antisséptica do óleo essencial de *Lippia origanoides* Cham. (Alecrim-pimenta) na presença de leite bovino. *Pesq. Vet. Bras.* [online]. v.36, n.9, p.905-911. 2016. [acesso em 17 set 2017]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2016000900905&script=sci_abstract&tlng=pt

BAYDAR, N.G.; ÖZKAN, G.; SAĞDIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, V. 15, N. 5, P. 335-339,

2004. [acesso em 24 set 2017]. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713503000835>

BRASIL, 2016. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. [acesso em 17 set 2017]. Disponível em <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>

DEHKORDI, N. V.; KACHOUIE, M. A.; PIRBALOUTI, A.G.; MALEKPOOR, F.; RABEI, M. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of the extract of *ephedra procera* fisch. Et mey Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, V. 72 N. 2 P. 341-345, 2015 [acesso em 17 set 2017]. Disponível em: http://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2015/2/341.pdf

Estados Unidos da América. Centers for Disease Control and Prevention. [acesso em 14 set 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>

QABAHA, K. I. Antimicrobial and Free Radical Scavenging Activities of Five Palestinian Medicinal Plants. Qabaha Afr J Tradit Complement Altern Med, V. 10, N. 4, P. 101-108, 2013. [acesso em 24 set 2017]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3794399/#R27>

RADOVANOVIĆ, A.; ARSIĆ B; RADOVANOVIĆ V; JOVANČIČEVIĆ B; NIKOLIĆ V. Broad-spectrum of antimicrobial properties of commercial wines from different *Vitis vinifera* L. varieties. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 33, n. 1, p. 1-18, 2017 [acesso em 17 set 2017]. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-016-2183-4>

RADOVANOVIĆ, A.; RADOVANOVIĆ B.; JOVANČIČEVIĆ, B. Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. Food Chemistry, V. 117, N. 2, P. 326-331, 2009 [acesso em 17 set 2017]. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609004592?via%3Dihub>

SANHUEZA, L.; MELO, R.; MONTERO, R.; MAISEY, K.; MENDOZA, L.; WILKENS, M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. PLOS ONE. [online]. V. 12(2) [acesso em 17 set 2017]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5325233/>

TSUKADA, M.; SHENG, H.; KAMACHI, T.; NIWANO, Y. Microbicidal action of photoirradiated aqueous extracts from wine lees. Journal of Food Science and Technology, V. 53, n. 7, p. 3020-3027, 2016 [acesso em 17 set 2017]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27765972>

YADAV, D.; KUMAR, A.; KUMAR, P.; MISHRA, D. Antimicrobial properties of black grape (*Vitis vinifera* L.) peel extracts against antibiotic-resistant pathogenic bacteria and toxin producing molds. Indian J Pharmacol. V. 47, N. 6, P. 663-667, 2015 [acesso em 17 set 2017]. Disponível em: <http://www.ijp-online.com/article.asp?issn=0253-7613;year=2015;volume=47;issue=6;spage=663;epage=667;aualast=Yadav>