

1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Stevia* 2 *rebaudiana* CONTRA *Alicyclobacillus acidoterrestris*

3

4

5 Tatiane Viana Dutra¹, Jéssica Lima de Menezes¹, Amanda Gouveia Mizuta¹, Maysa
6 Formigoni¹, Silvio Claudio da Costa², Benicio Alves de Abreu Filho³

7

8 ¹ Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

9 ² Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica

10 ³ Universidade de Maringá, Departamento Básico de Saúde

11 E-mail para contato: eng.jessica.lima@gmail.com

12

13 RESUMO – *Alicyclobacillus acidoterrestris* é uma bactéria Gram-positiva,
14 termoacidófila, formadora de esporos e deteriorante de bebidas ácidas. Extratos de
15 plantas naturais vêm sendo investigados como alternativa de antimicrobiano,
16 como a *Stevia rebaudiana*, onde estudos revelam que extratos de suas folhas
17 possuem metabólitos com potencial bioativo. Dessa forma, o objetivo desse
18 trabalho, foi avaliar a atividade antimicrobiana da *Stevia rebaudiana* contra ao *A.*
19 *acidoterrestris*. O extrato etanólico das folhas de *Stevia rebaudiana* (EES) e
20 fração hexano das folhas de *Stevia rebaudiana* (FHS) foram testados para
21 verificar concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida
22 mínima (CBM) contra *A. acidoterrestris*. Fez-se a microscopia eletrônica de
23 varredura (MEV) do sub-CIM e CIM do EES e da FHS, e do controle (células de
24 *A. acidoterrestris* não tratadas). A atividade inibitória encontrada foi de 31,25
25 µg/ml para EES e FHS testados contra o *A. acidoterrestris*. Enquanto a CBM foi
26 de 1000 µg/ml para ambos. Com a MEV foi possível observar os danos causados
27 nas células vegetativas de *A. acidoterrestris*, além de verificar que houve redução
28 do crescimento das células vegetativas ao utilizar EES e FHS. Conclui-se que os
29 extratos testados foram efetivos contra *A. acidoterrestris*, demonstrando potencial
30 biotecnológico como antimicrobiano natural para controle de suas células
31 vegetativas em sucos de frutas cítricas industrializados.

32 Palavras-chave: deterioração, termoacidófila, bebidas ácidas, extratos naturais

33

34 ABSTRACT – *Alicyclobacillus acidoterrestris* is a gram-positive,
35 thermoacidophilous, spore-forming and acid-wicking bacterium. Natural plant
36 extracts have been investigated as an antimicrobial alternative, such as *Stevia*
37 *rebaudiana*, where studies reveal that extracts from its leaves have metabolites
38 with bioactive potential. Thus, the objective of this work was to evaluate the
39 antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* against *A. acidoterrestris*. The
40 ethanolic extract of *Stevia rebaudiana* leaves (EES) and hexane fraction of *Stevia*
41 *rebaudiana* leaves (FHS) were tested to verify minimum inhibitory concentration
42 (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against *A. acidoterrestris*.
43 Scanning electron microscopy (SEM) of the sub-CIM and CIM of the EES and
44 FHS, and of the control (untreated *A. acidoterrestris* cells) was performed. The
45 inhibitory activity found was 31.25 µg / ml for EES and FHS tested against *A.*

46 *acidoterrestris*. While the MBC was 1000 µg/ml for both. With SEM it was
 47 possible to observe the damage caused to the vegetative cells of *A.*
 48 *acidoterrestris*, in addition to verifying that there was a reduction in the growth of
 49 vegetative cells when using EES and FHS. It was concluded that the tested
 50 extracts were effective against *A. acidoterrestris*, showing biotechnological
 51 potential as a natural antimicrobial to control its vegetative cells in industrialized
 52 citrus juices.

53

541. INTRODUÇÃO

55 *Alicyclobacillus acidoterrestris* é uma bactéria Gram-positiva, termoacidófila,
 56 formadora de esporos e deteriorante de bebidas ácidas, como sucos de laranja, maçã, uva,
 57 abacaxi, pêssego e vários tipos de chá gelado (Pascoli *et al.*, 2018). Seus esporos podem
 58 resistir ao processo de pasteurização realizado pelas indústrias de bebidas como um método
 59 de conservação, podendo germinar e se proliferar, resultando na produção de guaiacol,
 60 responsável pelo odor medicinal ou anti-séptico. Assim, é de grande importância para os
 61 produtores inibir o crescimento dessa bactéria, pois causa perdas na produção e prejuízos
 62 econômicos (Pascoli *et al.*, 2018; Cai *et al.*, 2015).

63 Extratos de plantas naturais vêm sendo investigados como uma alternativa aos agentes
 64 antimicrobianos químicos, sintéticos, e antioxidantes, ganhando cada vez mais significância
 65 para a indústria de alimentos. Várias espécies mostram possuir propriedades medicinais e
 66 desempenham importantes atividades biológicas. O uso de antimicrobianos naturais contra o
 67 *A. acidoterrestris* tem sido utilizado como estudo e mostram bons resultados, entre eles estão
 68 cinamaldeído, eugenol, limoneno e lisozima, folhas de eucalipto e extratos cítricos, como
 69 extratos da semente da uva (Molva e Baysal, 2015; Piskernik *et al.*, 2016; Pascoli *et al.*,
 70 2018).

71 *Stevia rebaudiana* é um arbusto ramificado pertencente à família *Asteraceae*, natural do
 72 Norte do Paraguai, essa espécie também é encontrada no Brasil, Argentina, Canadá, Estados
 73 Unidos, China, Japão e alguns lugares da Europa. É famosa, por possuir um sabor agradável
 74 doce e refrescante, podendo substituir a sacarose. Isso ocorre devido aos seus extratos
 75 apresentarem glicosídeos esteviol (SGs) (Kovačević *et al.*, 2018; Formigoni *et al.*, 2018).
 76 Além das propriedades edulcorantes, estudos revelam que extratos de suas folhas também
 77 possuem outros metabólitos com potencial bioativo, como alcalóides, clorofilas solúveis em
 78 água, xantofilas, derivados de hidroxicinolano, oligossacarídeos solúveis, açúcares livres,
 79 aminoácidos, lipídios, óleos essenciais e oligoelementos (Formigoni *et al.*, 2018).

80 Dessa forma, o objetivo desse trabalho, foi avaliar a atividade antimicrobiana da *Stevia*
 81 *rebaudiana* contra *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

82

832. MATERIAL E MÉTODOS

842.1. Linhagem microbiana e *Stevia*

85 O *A. acidoterrestris* 0244^T utilizado foi da Coleção Brasileira de Micro-organismos de
 86 Ambiente e Indústria (CBMAI), localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas,
 87 Biológicas e Agrícolas – CPQBA/UNICAMP.

88 As folhas de *S. rebaudiana* foram obtidas do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais
89(NEPRON) localizado na Universidade Estadual de Maringá.

90

912.2. Extrato etanólico e fração hexano das folhas da Stevia

92 Os extratos foram obtidos conforme Formigoni (2018). As folhas de *S. rebaudiana*
93foram secadas em forno de ar de circulação forçada até obter umidade abaixo de 10%, em
94seguida foram prensadas e armazenadas.

95 O tratamento etanólico das folhas de *S. rebaudiana* foi realizado por meio de uma
96coluna. Aproximadamente 300 g das folhas foram acondicionadas com etanol absoluto.
97Posteriormente, o mesmo solvente foi eluído usando-se gravidade e 14 frações etanólicas de
98350 ml foram obtidas. As frações foram secadas e armazenadas, obtendo assim o EES.

99 A partir do extrato etanólico, fez-se a seguinte sequência de fracionamento para obter a
100fração hexano: uma amostra de extrato etanólico rotoevaporado foi dissolvida com água
101destilada e deionizada. A solução aquosa foi extraída com hexano (1/10 v/v) e a mistura foi
102separada em funil de separação, assim as frações aquosas e hexânicas foram obtidas. As
103frações hexano foram reunidas e rotoevaporadas a 50 °C sob vácuo e armazenadas, obtendo a
104FHS.

1052.3. Atividade antimicrobiana

106 Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM): Para
107os ensaios de CIM, utilizou-se uma concentração inicial de 2000 µg/ml do EES e FHS,
108separadamente, em um volume total de 100 µl da solução (meio de cultura e EES ou FHS) e
109adicionados 5 µl do inóculo bacteriano na concentração de 10⁴ UFC/ml em cada poço da
110microplaca e incubado por 24 horas a 45 °C. A menor concentração capaz de inibir o
111crescimento do micro-organismo estabelece a CIM, visivelmente observada no poço sem
112turvação. Enquanto que para a CBM, 20 µl em triplicata do último poço sem turvação foram
113plaqueados em ágar YSG (yeast extract, starch, glucose) das concentrações da microplaca
114contendo meio de cultura e incubados a 45 °C/24 h. Não havendo crescimento define-se como
115CBM (CLSI, 2012).

116

1172.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

118 O inóculo de *A. acidoterrestris* 0244^T foi tratado com o EES e FHS nas concentrações
119definidas pela atividade antimicrobiana referentes ao sub-CIM (um poço antes da CIM), CIM
120(menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do micro-organismo no poço da
121placa de 96 poços) e controle (apenas com células de *A. acidoterrestris*, sem adição do EES e
122FHS). Após incubação das amostras a 45 °C por 24 h, foi feita a fixação com glutaraldeído
1232,5 % em tampão cacodilato 0,1 M e adesão em lamínulas pré tratadas com poli-L-lisina
124(Sigma-Aldrich). A desidratação foi realizada em seguida utilizando etanol de 50% a 100%, e
125seguiu-se para ponto crítico de CO₂, metalização em ouro e por fim fez-se a análise em
126microscópio eletrônico de varredura Quanta-250 (Endo *et al.*, 2010).

127

1283. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1293.1. Atividade antimicrobiana

130 No presente estudo, investigou-se o potencial antimicrobiano do EES e FHS contra *A.*
131 *acidoterrestris*. Os resultados obtidos demonstraram atividade antimicrobiana, onde a CIM foi
132 de 31,25 µg/ml tanto para EES quanto para FHS testados contra o *A. acidoterrestris*.
133 Enquanto a CBM foi de 1000 µg/ml para ambos.

134 Conforme descrito por Oliveira e Abreu-Filho (2012), a atividade inibitória de materiais
135 vegetais pode ser classificada em forte, moderada e fraca, que corresponde a CIM (µg/ml) de
136 até 500, entre 600 e 1.500, e acima de 1.600, respectivamente. Os resultados obtidos para EES
137 e FHS apresentaram atividade inibitória forte (31,25 µg/ml) contra *A. acidoterrestris*.

138 Piskernik *et al.* (2016) testaram a atividade antimicrobiana de dois extratos de alecrim
139 comercial, V20 e V40, e os resultados mostraram que ambos os extratos de alecrim foram
140 efetivos contra *A. acidoterrestris*, *A. hesperidum* e *A. cycloheptanicus*, com CIM de 7,8 µg/ml
141 para V20 e 3,9 µg/ml para V40, contra as três cepas. Anjos *et al.* (2016) ao testar a atividade
142 antimicrobiana da papaína e bromelina contra *A. acidoterrestris*, obtiveram resultados de CIM
143 30,98 e 62,5 µg/ml, respectivamente. Já Oliveira e Abreu-Filho (2012), apresentaram para a
144 mesma bactéria resultado de CIM de 533,2 µg/ml ao avaliar a atividade antimicrobiana do
145 eugenol. Isso mostra, que dependendo do material a ser utilizado como antimicrobiano pode
146 haver resultados distintos, pois o composto bioativo de cada um é diferente, e dependendo da
147 extração utilizada também pode variar os resultados a serem obtidos.

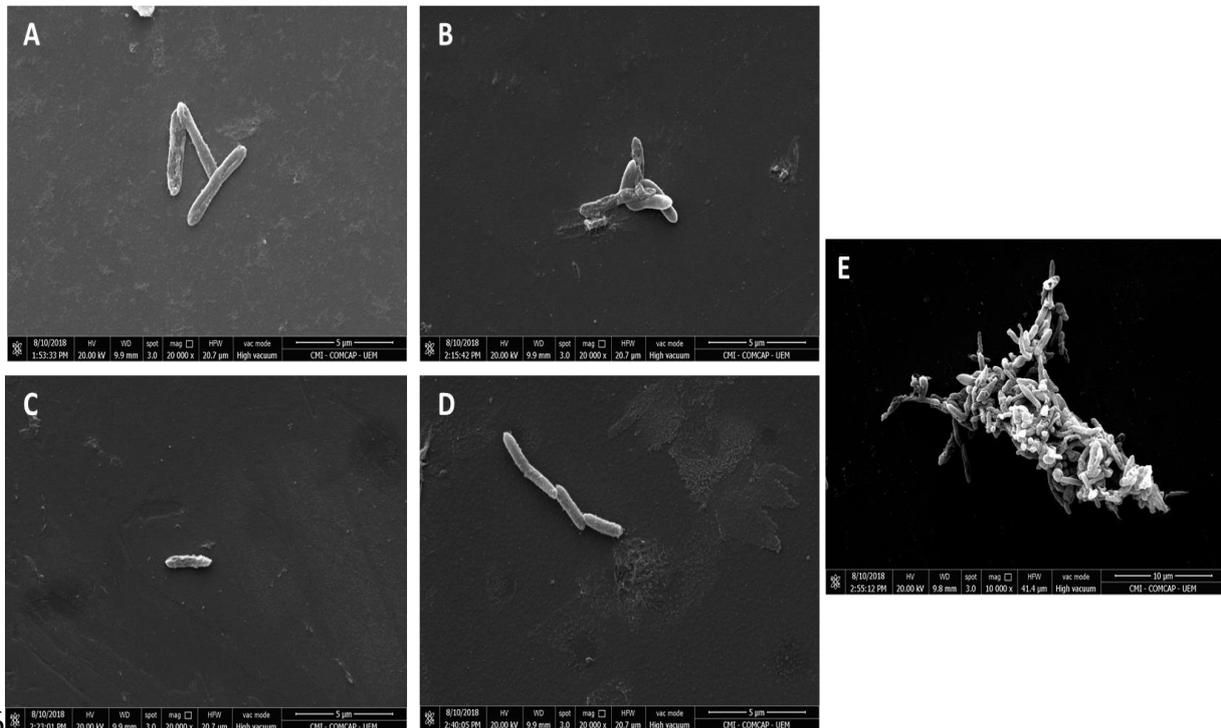
148 Esses resultados demonstram o potencial biotecnológico de EES e da FHS como
149 antimicrobianos contra *A. acidoterrestris*.

150

1513.2. Microscopia eletrônica de varredura

152 A Figura 1 apresenta as imagens da microscopia eletrônica de varredura, em que se
153 pode observar diferenças nas estruturas das células tratadas com EES e FHS quando
154 comparadas ao controle (bactérias não tratadas).

155



156
157

158 Figura 1 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura. (A) Sub-CIM do EES com células
159 vegetativas de *A. acidoterrestris*. (B) CIM do EES com células vegetativas de *A.*
160 *acidoterrestris*. (C) Sub-CIM da FHS com células vegetativas de *A. acidoterrestris*. (D) CIM
161 da FHS com células vegetativas de *A. acidoterrestris*. (E) Controle não tratado de células
162 vegetativas de *A. acidoterrestris*.
163

164 Observa-se que as células controle (Figura 1 E) estão em maior quantidade e
165 apresentam superfície lisa e intacta. Após os tratamentos com EES (Figura 1 A e B) e FHS
166 (Figura 1 C e D), observa-se alterações morfológicas e estruturais, além de apresentar poucas
167 células quando comparadas ao controle. É possível observar que as imagens do sub-CIM
168 (Figura 1 A e C) apresentam maiores alterações estruturais e maior redução do crescimento
169 celular, visto que a concentração do EES e FHS são maiores do que as concentrações da CIM
170 (Figura 1 B e D).

171 Pascoli *et al.* (2018) observaram alterações morfológicas das células vegetativas de *A.*
172 *acidoterrestris* ao utilizar extratos vegetais de *Piper marginatum* e *P. peltatum*. Molva e
173 Baysal (2015) ao utilizar extrato de semente de uva contra o *A. acidoterrestris* também
174 apresentaram tais alterações da estrutura e inibição das células vegetativas.

175 Os resultados do presente estudo mostram uma alternativa para utilização de EES e FHS
176 como antimicrobiano para indústrias de sucos de frutas cítricas que enfrentam problemas
177 devido a presença de *A. acidoterrestris*.

178

179 4. CONCLUSÃO

180 Os extratos de Stevia apresentaram resultados efetivos contra *A. acidoterrestris*,

181 demonstrando potencial biotecnológico como antimicrobiano natural para controle de suas
182 células vegetativas em sucos de frutas cítricas industrializados.

183

184 5. REFERÊNCIAS

- 185 ANJOS, M. M.; SILVA, A. A.; PASCOLI, I. C.; MIKCHA, J. M. G.; MACHINSKI-JR, M.;
186 PERALTA, R. M.; ABREU-FILHO, B. A. Antibacterial activity of papain and
187 bromelain on *Alicyclobacillus* spp. *Inter. J. of Food Microb.*, v. 216, p. 121-126, 2016.
- 188 CAI, R.; YUAN, Y.; WANG, Z.; GUO, C.; LIU, B.; PAN, C.; LIU, L.; YUE, T. Effects of
189 preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* growth and guaiacol production. *Inter.*
190 *J. of Food Microb.*, v. 214, p. 145-150, 2015.
- 191 CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial
192 Susceptibility. Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 9 th ed. Approved Standard.
193 CLSI Document M7-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2012.
- 194 ENDO, H.E., CORTEZ, D.A.G., UEDA-NAKAMURA, T., NAKAMURA, C.V., DIAS
195 FILHO, B.P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from
196 pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res.*
197 *Microbiol.*, v. 161, p. 534–540, 2010.
- 198 FORMIGONI, M.; MILANI, P. G.; AVÍNCOLA A. S.; SANTOS, V. J.; BENOSSI, L.;
199 DACOME, A. S.; PILAU, E. J.; COSTA, S. C. Pretreatment with ethanol as an
200 alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety
201 of stevia. *Food Chem.*, v. 241, p. 452-459, 2018.
- 202 KOVAČEVIĆ D. B.; MARAS, M.; BARBA, F. J.; GRANATO, D.; ROOHINEJAD, S.;
203 MALLIKARJUNAN, K.; MONTESANO, D.; LORENZO, J. M.; PUTNIK, P.
204 Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from *Stevia*
205 *rebaudiana* Bertoni leaves: A review. *Food Chem.*, v. 268, p. 513-521, 2018.
- 206 MOLVA, C.; BAYSAL, A. H. Antimicrobial activity of grape seed extract
207 on *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 vegetative cells and spores in apple juice.
208 *LWT - Food Sci. and Techn.*, v. 60, p. 238-245, 2015.
- 209 OLIVEIRA, J. G.; ABREU-FILHO, B. A. Propriedade antimicrobiana do eugenol frente às
210 amostras de *Alicyclobacillus* spp. isoladas de suco de laranja. *Rev Inst Adolfo Lutz.* v.
211 71, p. 410-414, 2012.
- 212 PASCOLI, I. C.; ANJOS, M. M.; SILVA, A. A.; LORENZETTI, F. B.; CORTEZ, D. A. G.;
213 MIKCHA, J. M. G.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; ABREU-FILHO, B.
214 A. *Piperaceae* extracts for controlling *Alicyclobacillus acidoterrestris* growth in
215 commercial orange juice. *Ind. Crops and Prod.*, v. 116, p. 224-230, 2018.
- 216 PISKERNIK, S.; KLANCNIK, A.; DEMSAR, L.; MOZINA, S. S.; JERSEK, B. Control
217 of *Alicyclobacillus* spp. vegetative cells and spores in apple juice with rosemary
218 extracts. *Food Control*, v. 60, p. 205-214, 2016.
- 219