



ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATO DE *Physalis* FRENTE A PATÓGENOS ALIMENTARES

A.M.B. Schultz¹, C. Ferronato², C.A. Poloni³, W.L. Priamo⁴, L. Pieta⁵

1- Discente do Curso de Engenharia de Alimentos - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – *Campus* Erechim – CEP: 99713-028 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: 55 (54) 3321-7500 – Fax: 55 (54) 3321-7525 – e-mail: (adrianeschultz@yahoo.com)

2- Discente do Curso de Engenharia de Alimentos - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – *Campus* Erechim – CEP: 99713-028 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: 55 (54) 3321-7500 – Fax: 55 (54) 3321-7525 – e-mail: (c.ferronato@hotmail.com)

3- Discente do Curso de Engenharia de Alimentos - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – *Campus* Erechim – CEP: 99713-028 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: 55 (54) 3321-7500 – Fax: 55 (54) 3321-7525 – e-mail: (polonicarine@gmail.com)

4- Docente área Alimentos - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – *Campus* Erechim – CEP: 99713-028 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: 55 (54) 3321-7500 – Fax: 55 (54) 3321-7525 – e-mail: (wagner.priamo@erechim.ifrs.edu.br)

5- Docente área Alimentos - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – *Campus* Erechim – CEP: 99713-028 – Erechim – RS – Brasil, Telefone: 55 (54) 3321-7500 – Fax: 55 (54) 3321-7525 – e-mail: (luiza.pieta@erechim.ifrs.edu.br)

RESUMO – A presente pesquisa visou o estudo da atividade antimicrobiana de extrato de *Physalis* sobre três microrganismos (*Salmonella sp.*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*), considerados importantes patógenos causadores de surtos alimentares no mundo todo. Após a ativação das cepas bacterianas e confirmação da sua pureza, a atividade antimicrobiana e o espectro de ação do extrato foram inicialmente avaliados pela técnica de Difusão em Ágar. Posteriormente, foram realizados experimentos para determinação da sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelas técnicas de Diluição em Ágar e Microdiluição em Caldo, de acordo com as normas preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Foram obtidos resultados satisfatórios quanto à ação antimicrobiana do extrato de *Physalis* frente a microrganismos de relevância em segurança de alimentos, cuja atividade antimicrobiana pode estar relacionada com a presença de compostos bioativos. Para a comprovação desta informação, surge como uma das perspectivas da pesquisa a realização futura de análises cromatográficas.

ABSTRACT – This research aimed to study the antimicrobial activity of *Physalis* extract on three microorganisms (*Salmonella sp.*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*), considered important pathogens that cause food outbreaks worldwide. After activating the bacterial strains and confirming their purity, the antimicrobial activity and the spectrum of action of the extract were initially evaluated by the Agar Diffusion technique. Subsequently, experiments were carried out to determine its Minimum Inhibitory Concentration (MIC) using the Agar Dilution and Broth Microdilution techniques, according to the standards recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Satisfactory results were obtained regarding the antimicrobial action of *Physalis* extract against microorganisms of relevance in food safety, whose antimicrobial



activity may be related to the presence of bioactive compounds. In order to confirm this information, the future performance of chromatographic analyzes appears as one of the research perspectives.

PALAVRAS-CHAVE: ação antimicrobiana; compostos naturais; patógenos alimentares; *Physalis*.

KEYWORDS: antimicrobial action; natural compounds; food pathogens; *Physalis*.

1. INTRODUÇÃO

O extrato de *Physalis* é obtido de plantas do gênero *Physalis*, pertencentes à família *Solanaceae*, que correspondem a um grupo abrangente e com grande importância econômica, uma vez que são utilizadas na alimentação humana (*P. peruviana*), na produção de substâncias de uso farmacêutico (*P. angulata*) e em ornamentação (*P. alkekengi*). Além disso, estudos realizados com extratos das folhas de diferentes espécies de *Physalis* têm revelado importantes atividades biológicas, como ação antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena e antiinflamatória (Muniz et al., 2015). Em virtude de existirem poucos estudos relacionados ao potencial antimicrobiano do extrato de *Physalis*, planta facilmente adaptável ao clima temperado do Estado do Rio Grande do Sul, se torna relevante o estudo do seu efeito frente ao desenvolvimento de importantes patógenos alimentares, de forma a avaliar a sua possível futura aplicabilidade na conservação de produtos alimentícios.

Com vistas às propriedades apresentadas pelo extrato de *Physalis*, a presente pesquisa buscou avaliar a potencial ação antimicrobiana deste composto sobre três microrganismos (*Salmonella sp.*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*), considerados importantes patógenos causadores de surtos alimentares que, conseqüentemente, afetam a segurança de alimentos global.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas

Foram utilizadas cepas de *Salmonella sp.*, *E. coli* e *S. aureus* causadoras de surtos alimentares ocorridos no Estado do Rio Grande do Sul. O início dos experimentos se deu com a ativação destas cepas através de cultivo em caldo tripton de soja (TSB) por 18 a 24 horas a 35-37 °C, uma vez que elas permanecem estocadas congeladas em meio TSB com 40% de glicerol. Para a confirmação da pureza das culturas, estas foram submetidas à técnica de Coloração de Gram e ao cultivo em meios sólidos seletivos, observando-se características morfológicas pertinentes para todos os microrganismos estudados.

2.2 Obtenção do extrato de *Physalis*

As frutas foram cedidas pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – Campus Sertão (28° 02' 43.2" S x 52° 16' 28" W). As amostras foram lavadas e cortadas ao meio para separação da semente, polpa e casca. A polpa foi submetida à secagem em estufa com circulação de ar por 24 h

a 38 °C e posteriormente reduzida em moinho de facas. A extração foi realizada em frasco erlenmeyer através da adição de uma determinada massa de *Physalis* em etanol (53:27 v/v) sob aquecimento (40 °C) por 2 horas, obtendo-se um extrato com concentração de 0,04 g/mL.

Foram obtidas três amostras do extrato de *Physalis*, filtradas em papel filtro e mantidas em frascos âmbar sob refrigeração: uma “natural” não submetida a nenhum processo para eliminação do solvente etanol; outra que permaneceu em capela protegida com papel alumínio, em local escuro e temperatura ambiente por 24 horas para volatilização do etanol; e outra submetida à rotavapor e protegida com papel alumínio (rotavapor Marconi e bomba de vácuo SL60 Solab; temperatura de 45 °C, rotação entre 4 e 5) para eliminação do etanol. Este etanol se refere àquele utilizado na obtenção do extrato de *Physalis*, de acordo com metodologia descrita.

2.3 Screening inicial da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana e o espectro de ação do extrato de *Physalis* foram avaliados pela técnica de Difusão em Ágar com poços em meio de cultura sólido. Após ativação em caldo TSB, os inóculos foram ajustados em caldo TSB estéril a uma concentração em torno de 10^8 - 10^9 UFC/mL (correspondente à turbidez 0,5 na escala McFarland). As suspensões microbianas preparadas foram inoculadas no meio ágar Müller-Hilton (MH) pela técnica de plaqueamento em profundidade. Após secagem e solidificação das placas, foram feitos manualmente poços de aproximadamente 5 mm de diâmetro, os quais foram preenchidos com 32 µL das amostras de *Physalis*. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico ciprofloxacino e como controle negativo água destilada estéril. Após a incubação das placas a 35-37 °C por 24 a 48 h, a atividade antimicrobiana foi avaliada pela média dos diâmetros das zonas de inibição formadas contra os microrganismos testados. O teste foi realizado em duplicata.

2.4 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima

A avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com normas preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, com algumas modificações. Primeiramente foi realizado o teste de Diluição em Ágar, o qual consiste na incorporação de concentrações seriadas e logarítmicas de um antimicrobiano em meio de cultura na forma de ágar e distribuição em placas de Petri individuais. Cada placa representa uma única concentração de antimicrobiano. As amostras bacterianas foram inoculadas (100 µL) sobre a superfície do ágar com posterior espalhamento pela técnica de plaqueamento em superfície com o auxílio de alça de Drigalski. As placas inoculadas foram incubadas por 18 a 24 horas, a 35-37 °C. Após este período, a CIM foi determinada como a menor concentração dos agentes testados que não permitiu o crescimento macroscópico bacteriano. Os testes foram realizados em duplicata.

Além disso, para a determinação da CIM em meio líquido, foi realizada a técnica de Microdiluição em Caldo pela utilização de microplacas de poliestireno de 96 poços. Cem microlitros das soluções do extrato de *Physalis* foram adicionadas a um volume igual do meio de cultura (caldo TSB) nos primeiros poços da microplaca, seguido de diluições seriadas nos poços subsequentes a fim de se obter um gradiente de concentração de 50% a 6,25%. Dez microlitros da suspensão microbiana (concentração final 1×10^6 UFC/mL) foram adicionados em cada poço, com posterior incubação das placas a 35-37 °C por 18 a 24 horas. Como controles positivos foram utilizadas soluções de etanol 99,8% P.A. e hipoclorito de sódio 1%, enquanto que meio de cultura (caldo TSB) estéril foi utilizado como controle negativo do experimento. O teste foi realizado em duplicata.

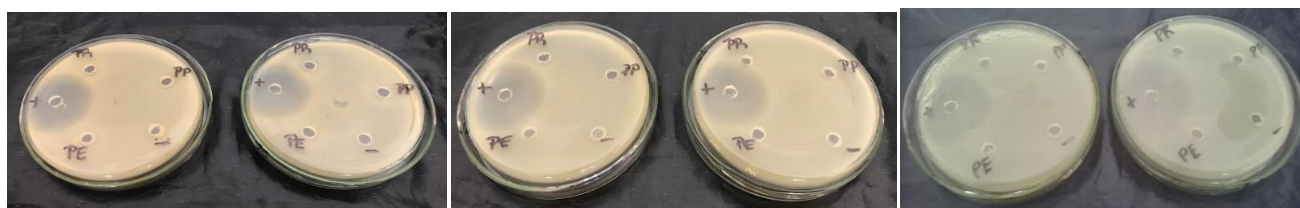
Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), 50 µL da solução de todos os poços que não apresentaram crescimento visível foram inoculados sobre a superfície de placas de MH com posterior incubação a 35-37 °C por 18 a 24 horas. A amostra com a menor concentração de agente que não apresentou crescimento foi considerada a CBM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 *Screening* inicial da atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos nos experimentos de *screening* inicial da atividade antimicrobiana seguem demonstrados nas figuras abaixo para as seguintes amostras: extrato de *Physalis* submetido à rotavapor (PR); extrato de *Physalis* natural (PP); e extrato de *Physalis* mantido em capela (PE). Para os três microrganismos analisados, foi possível verificar halos de inibição do crescimento microbiano apenas nos poços que apresentavam o controle positivo após 24 e 48 horas de incubação, nos dois experimentos realizados (Figura 1).

Figura 1 - Resultados do *screening* inicial de atividade antimicrobiana de extrato de *Physalis* contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*, respectivamente.



Resultados similares em relação a não formação de halo de inibição no caso dos microrganismos analisados na presença de extrato de *Physalis* também foram detectados por Henz e Santim (2007). Estes autores analisaram a bactéria *Salmonella sp.* e verificaram a inexistência de zona de inibição quando extratos e óleos essenciais de plantas foram testados contra este microrganismo. Importante ressaltar que é imprescindível realizar a determinação da composição química de óleos essenciais e demais extratos de plantas, a fim de se entender quais suas potencialidades para saber como melhor aplicá-las. Ainda, fatores tais como quimiotipo, época de colheita, impacto do clima e região de plantio das plantas são apontados como influenciadores da atividade antimicrobiana de óleos e extratos vegetais.

3.2 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima

Técnica de Diluição em Ágar: Foi analisada a ação de dois extratos de *Physalis* (amostra submetida à rotavapor e amostra mantida em capela) sob os microrganismos *S. aureus*, *Salmonella sp.* e *E. coli*. O extrato natural não foi utilizado nestes experimentos devido aos teores de etanol presentes na sua formulação que poderiam influenciar nos resultados da ação frente aos microrganismos estudados. Foram testados os extratos nas concentrações de 5%, 10%, 20% e 40%. Em relação aos resultados, verificou-se que a partir de 20% de extrato de *Physalis* mantido em capela houve inibição do crescimento dos microrganismos nas placas (Figura 2), enquanto que apenas a partir de 40% de extrato de *Physalis* submetido à rotavapor houve visível inibição do crescimento microbiano (Figura 3, resultados demonstrados para *Salmonella sp.*).

Soluções de hipoclorito de sódio e de etanol foram utilizadas como controles positivos e inibiram o desenvolvimento microbiano, enquanto que meio de cultura sem nenhum dos agentes estudados foi considerado o controle negativo do experimento.

Figura 2 - Ação do extrato de *Physalis* mantido em capela sob a) *Staphylococcus aureus*; b) *Salmonella sp.*; c) *Escherichia coli* quando aplicado em diferentes concentrações no meio de cultura equivalentes a 5%, 10%, 20% e 40%, respectivamente.



Figura 3 - Ação do extrato de *Physalis* submetido à rotavapor sob *Salmonella sp.* quando aplicado em diferentes concentrações no meio de cultura equivalentes a 5%, 10%, 20% e 40%, respectivamente.



Observou-se que foi necessária o dobro da concentração do extrato de *Physalis* submetido à rotavapor para o impedimento do desenvolvimento microbiano, em comparação à concentração necessária do extrato mantido em capela para a obtenção do mesmo resultado. Isto ocorreu possivelmente pelo fato de que a eliminação do etanol do extrato de *Physalis* é maior quando se trata do sistema em rotavapor se comparado à manutenção em capela.

Tomassini et al. (2000) constataram a ação antibacteriana de extrato de *Physalis* em ensaios frente a cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Outro ponto a ser destacado, em relação aos resultados relevantes de ação antimicrobiana do presente estudo, é que esta pode ter sido influenciada de forma significativa pela presença de etanol, uma vez que este, em virtude de sua atividade bacteriostática, impacta consideravelmente nas propriedades antimicrobianas de extratos vegetais (Michelin et al., 2005).

Técnica de Microdiluição em Caldo: Para todos os microrganismos estudados, a CIM de cada um dos três extratos foi 50% (100 µL da solução de extrato em 100 µL do meio de cultura TSB no poço da microplaca; maior concentração analisada), exceto para *S. aureus* cultivado na presença de extrato de *Physalis* mantido em capela, em que a concentração de 25% do extrato foi capaz de inibir visivelmente o crescimento microbiano. Ainda, para todos os extratos testados, quanto menor a sua concentração, maior o crescimento microbiano visível. Aparentemente, os três microrganismos se comportaram de forma muito similar frente ao cultivo na presença dos diferentes extratos de *Physalis*.

A partir destas observações foi possível realizar a determinação da CBM através do plaqueamento em meio MH de parte do volume contido nos poços das microplacas que não aparentavam crescimento bacteriano visível. Após o plaqueamento e incubação, apenas as placas referentes aos poços codificados como A4 (*S. aureus*; 50% extrato de *Physalis* natural), A7 (*E. coli*; 50% extrato de *Physalis* natural), A10 (*Salmonella sp.*; 50% extrato de *Physalis* natural) e E3 (*S. aureus*; 50% extrato de *Physalis* mantido em capela) não apresentaram Unidades Formadoras de Colônia (UFC) indicativas do desenvolvimento microbiano (Figura 4). Ressalte-se que todos estes poços possuíam a maior concentração testada (50%) de extrato de *Physalis*, com possível presença de quantidade de etanol dissolvida nestas soluções (extrato de *Physalis* natural; extrato de *Physalis* mantido em capela). Novamente a presença de etanol parece ter influenciado nos resultados obtidos, haja vista que o etanol possui atividade contra bactérias, vírus, micobactérias e fungos (Santos et al., 2002).

Figura 4 - Resultados do experimento para determinação de Concentração Bactericida Mínima para as placas referentes aos poços A4, A7, A10 e E3, respectivamente, sem o desenvolvimento de Unidades Formadoras de Colônia.





4. CONCLUSÕES

Para os extratos de *Physalis*, o enfoque foi a determinação de CIM para àqueles submetidos à rotavapor ou mantidos em capela para volatilização do etanol. O extrato natural, devido a possível maior presença de etanol na sua composição (oriundo da técnica de obtenção do extrato de *Physalis*), não apresentou tanta relevância de estudo. Através das técnicas de Diluição em Ágar e Microdiluição em Caldo foi possível a determinação de CIM para os diferentes extratos de *Physalis* frente aos microrganismos testados. Os valores obtidos variaram entre 20 e 25% para o extrato mantido em capela e entre 40 e 50% para o extrato submetido à rotavapor, indicando uma boa realização de ambas as técnicas devido à proximidade dos resultados obtidos.

Como uma etapa futura deste trabalho sugere-se a realização de análises cromatográficas, com enfoque no estudo de substâncias com potencial antimicrobiano extensivamente relatadas na literatura, para comprovação e maior veracidade dos dados aqui apresentados.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela estrutura física e auxílio financeiro que proporcionaram a realização deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Henz, S. M., Santim, N. C. (2007) Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. *Revista Evidência*, 7(2), 93-100.

Michelin, D. C., Moreschi, P. E., Lima, A. C., Nascimento, G. G. F., Paganelli, M. O., Chaud, M. V. (2005) Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4), 316-320.

Muniz, J., Molina, A. R., Muniz, J. (2015) *Physalis*: Panorama produtivo e econômico no Brasil. *Horticultura Brasileira*, 33(2), <https://doi.org/10.1590/S0102-053620150000200023>

Santos, A. A. M., Verotti, M. P., SanMartin, J. A., Mesiano, E. R. A. B. (2002) Importância do álcool no controle de infecções em serviços de saúde. *Revista Administração & Saúde*, 4(16), 7-14.

Tomassini, T. C. B., Barbi, N. S., Ribeiro, I. M., Xavier, D. C. D. (2000) Gênero *Physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. *Revista Química Nova*, 23 (1), <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100011>