

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

CAMPUS LAGOA DO SINO

Maria Isabel de Oliveira

**EFEITO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON E NISINA SOBRE A
VIABILIDADE DE *Staphylococcus aureus* IN VITRO E EM LEITE**

Buri

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

CAMPUS LAGOA DO SINO

Maria Isabel de Oliveira

**EFEITO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON E NISINA SOBRE A
VIABILIDADE DE *Staphylococcus aureus* IN VITRO E EM LEITE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como exigência parcial para a obtenção do grau
de Bacharel em Engenharia de Alimentos na
Universidade Federal de São Carlos.

Orientação: Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel
Filho

Buri

2023

Oliveira, Maria Isabel de

Efeito de extratos de folhas de yacon e nisina sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus* in vitro e em leite / Maria Isabel de Oliveira -- 2023.

35f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus Lagoa do Sino, Buri

Orientador (a): Natan de Jesus Pimentel Filho

Banca Examinadora: Patrícia Érica Fernandes, Wemerson de Castro Oliveira

Bibliografia

1. Antimicrobiano natural. 2. Controle de crescimento microbiano. 3. Patógeno alimentar..

I. Oliveira, Maria Isabel de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Lissandra Pinhatelli de Britto - CRB/8 7539

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIA ISABEL DE OLIVEIRA

EFEITO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON E NISINA SOBRE A
VIABILIDADE DE *Staphylococcus aureus* *IN VITRO* E EM LEITE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como exigência parcial para a obtenção do grau
de Bacharel em Engenharia de Alimentos na
Universidade Federal de São Carlos. Buri, 03 de
março de 2023.

Orientador

Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Examinadora

Profa. Dra. Patrícia Érica Fernandes

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Alagoas - IFAL

Examinador

Prof. Dr. Wemerson de Castro Oliveira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-rio-grandense - IFSUL

RESUMO

DE OLIVEIRA, Maria Isabel. **Efeito de extratos de folhas de yacon e nisina sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus* em leite.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Lagoa do Sino, Buri, 2023.

Staphylococcus aureus é um patógeno oportunista sendo algumas cepas capazes de produzir toxinas, um importante fator de virulência. *S. aureus* é apontado como agente etiológico em 12,9 % dos surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil entre os anos de 2012 e 2021. O leite e seus derivados, dentre outros produtos de origem animal, estão entre os alimentos mais comumente envolvidos em casos e surtos de intoxicação estafilocócica. Além do monitoramento rigoroso das condições higiênico-sanitárias na obtenção e processamento de leite e derivados, o uso de antimicrobianos naturais como agentes sanitizantes tem demonstrado resultados promissores no controle do desenvolvimento microbiano em alimentos, o que também agrada os consumidores que cada vez mais buscam por alimentos mais naturais e seguros. Este trabalho objetivou verificar o efeito do extrato de folhas de yacon, um potencial antimicrobiano natural, e de nisina A e V, sobre o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 *in vitro* e em leite. A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada em microplacas de poliestireno contendo 96 poços por meio da técnica de microdiluição em caldo BHI. O efeito do extrato de yacon e nisina sobre a viabilidade de *S. aureus* em leite foi avaliado em pelo cultivo do patógeno na matriz alimentar suplementado com diferentes concentrações de ambos antimicrobianos a 37 °C. Nos tempos 0, 2, 4, 6 e 24 h alíquotas foram retiradas, diluídas e plaqueadas em ágar BHI. A CMI do extrato de yacon, nisina A e nisina V foi equivalente a 35 µg/mL, 1,4 µM e 1,8 µM, respectivamente. O efeito do extrato vegetal e da bacteriocina sobre a bactéria em leite não foi conclusivo e coerente com a literatura. Tanto o extrato de yacon quanto o isopropanol acidificado (IPA), utilizado para solubilizar o material vegetal, apresentaram comportamento semelhante na inibição de *S. aureus*. Nisina também não foi capaz de inibir o crescimento da bactéria em leite. Embora no leite o resultado não foi como o esperado, o potencial antimicrobiano do yacon e da nisina foi significativo em caldo BHI, necessitando de mais estudos acerca do tema para que se possa avaliar melhor sua eficiência em leite e derivados.

Palavras-chave: Antimicrobiano natural. Controle de crescimento microbiano. Patógeno alimentar.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Maria Isabel. **Effect of yacon leaf extract and nisin on the viability of *Staphylococcus aureus* in milk.** 2023. Completion of course work – Federal University of São Carlos, Lagoa do Sino campus, Buri, 2023.

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen and some strains are capable of producing toxins, an important virulence factor. *S. aureus* was identified as the etiological agent in 12.9% of outbreaks of Waterborne and Foodborne Diseases in Brazil between 2012 and 2021. Foods most commonly involved in cases and outbreaks of staphylococcal intoxication are milk and dairy products, among others animal products. In addition to rigorous monitoring of hygienic-sanitary conditions when handling milk and dairy products, the use of natural antimicrobials as sanitizing agents has shown promising results in controlling microbial development in foods, which also pleases consumers who are increasingly looking for food more natural and safe. This work aimed to verify the effect of yacon leaf extract, a potential natural antimicrobial, and nisin A and V, on the growth of *S. aureus* ATCC 25923 *in vitro* and in milk. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined in polystyrene 96-well plates using the microdilution technique in BHI broth. The effect of the yacon extract and nisin A on the viability of *S. aureus* in milk was evaluated by the pathogen cultivation in the food matrix supplemented with different concentrations of both antimicrobials at 37 °C. On time points 0, 2, 4, 6, and 24 h, aliquots were removed, diluted and plated on BHI agar. The MIC of yacon extract, nisin A and nisin V was 35 µg/mL, 1.4 µM and 1.8 µM, respectively. The effect of the plant extract and the bacteriocin on the bacteria in milk was not conclusive and consistent with results previously reported in the literature. Both yacon extract and acidified isopropyl alcohol showed similar behavior on the staphylococcal inhibition. Nisin also was not able to inhibit bacterial growth in milk. Although in milk results were not as expected, the antimicrobial potential of yacon and nisin is significant in BHI broth, requiring further studies on the subject so that its efficiency in milk and derivatives can be better evaluated.

Keywords: Natural antimicrobial. Microbial growth control. Foodborne pathogen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da organização das placas.....	21
Figura 2 – Exemplo de resultado do experimento de determinação da concentração mínima inibitória de extrato de yacon e soluções de nisina A e V.....	22
Figura 3 – Média de absorvância do cultivo de <i>S. aureus</i> na presença de diferentes concentrações de extrato de folha de yacon.....	22
Figura 4 – Média de absorvância do cultivo de <i>S. aureus</i> na presença de diferentes concentrações de nisina A.....	24
Figura 5 – Média de absorvância do cultivo de <i>S. aureus</i> na presença de diferentes concentrações de nisina V.....	24
Figura 6 – Exemplo de placa do experimento após incubação.....	26
Figura 7 – Contagem de UFC/mL ao longo do tempo – yacon.....	27
Figura 8 – Contagem de UFC/mL ao longo do tempo – nisina A.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração Mínima Inibitória.....	25
Tabela 2 – Log (UFC/mL) de <i>S. aureus</i> cultivado em leite integral UAT na presença de extrato de yacon.....	26
Tabela 3 – Análise de variância de fator único – extrato de yacon.....	28
Tabela 4 – Análise de variância de fator único desconsiderando C+ (Leite) – extrato de yacon.....	28
Tabela 5 – Log (UFC/mL) de <i>S. aureus</i> cultivado em leite integral UAT na presença de nisina A.....	30
Tabela 6 – Análise de variância de fator único – Nisina A.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1 BUSCA POR ALIMENTOS MAIS SEGUROS E SAUDÁVEIS.....	12
2.2 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS.....	12
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.3 SEGURANÇA DE ALIMENTOS EM LEITE.....	14
2.4 COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS NATURAIS.....	15
2.4.1 Extrato de folhas de yacon	16
2.4.2 Nisina	16
3 METODOLOGIA	18
3.1 MICRO-ORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	18
3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON.....	18
3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE NISINA A E V.....	18
3.4 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI).....	18
3.5 EFEITO DO EXTRATO DE YACON E NISINA A SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>S. aureus</i> EM LEITE.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
4.1 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI).....	22
4.2 EFEITO DO EXTRATO DE YACON E NISINA A SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>S. aureus</i> EM LEITE.....	25
5 CONCLUSÕES	32
6 REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

Dentre os 6.347 surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) ocorridos no Brasil entre 2012 e 2021, *Staphylococcus aureus* foi o agente etiológico de 12,9 % (BRASIL, 2022). A doença geralmente não é fatal, exceto em indivíduos imunocomprometidos e debilitados, e são principalmente com estes que a indústria de alimentos se preocupa (FRANCO; LADGRAF, 2008).

Alimentos perecíveis como leite e derivados necessitam de métodos que auxiliem em sua conservação para impedir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes. De acordo com a IN nº 76 de 2018, o uso de aditivos ou coadjuvantes de tecnologia no leite cru refrigerado é proibido. Também de acordo com a mesma instrução normativa, o leite pasteurizado não deve conter substâncias como agentes inibidores de crescimento microbiano, entre outros compostos estranhos à sua composição que auxiliem na conservação e regulação de acidez, porém, em alguns tipos de queijos e produtos lácteos, o uso é permitido. Entretanto, os consumidores têm apresentado uma tendência em optar por produtos mais naturais com ausência de aditivos sintéticos, sendo assim, começou-se a investir em formas alternativas de conservar alimentos, o que incentivou a busca por antimicrobianos naturais, que possam ser aplicados em alimentos (BRASIL FOOD TRENDS 2020, 2010).

A nisina é um antimicrobiano natural amplamente empregado na indústria de alimentos, porém, apresenta um alto valor agregado devido aos processos de obtenção da mesma. Deste modo, a combinação de nisina com outros antimicrobianos naturais mais acessíveis, pode trazer uma redução de custos (ALVES, 2014). As folhas de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) apresentam características antimicrobianas por serem fonte de compostos bioativos, como ácidos fenólicos, que acidificam o citoplasma de células gram-positivas, como *S. aureus*, que pode levar à morte celular, o que demonstra alto potencial do seu extrato apresentar resultados promissores contra esta bactéria (VILLALOBOS-DELGADO et al., 2019).

O foco principal do projeto foi a determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) de extrato de folhas de yacon e de nisina, capazes de interferir no desenvolvimento de *S. aureus in vitro* bem como o efeito dos antimicrobianos sobre o crescimento do patógeno em leite. Além disso, o projeto apresentou uma fonte vegetal promissora de compostos antimicrobianos naturais, a fim de promover maior disseminação, inclusive na indústria de alimentos, com viabilidade de aplicação total ou parcial combinada a outros processos em alimentos para promover a segurança microbiológica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 BUSCA POR ALIMENTOS SEGUROS E MAIS NATURAIS

Em tempos passados, as movimentações e demonstrações de mudança nos hábitos alimentares dos consumidores levavam anos ou até mesmo décadas para surtir algum efeito nos produtos oferecidos. Hoje em dia é notável que a indústria vem se adaptando às tendências transparecidas pelo mercado de forma ágil, evidenciando a transformação no pensamento daqueles que produzem (BRASIL FOOD TRENDS 2020, 2010).

Com o novo desafio de viver constantemente se adaptando às necessidades dos consumidores, é fundamental levar em consideração previsões de exigências e tendências dos consumidores mundiais de alimentos, para que a indústria compreenda os fatores que as promovem. Sendo assim, o Brasil Food Trends 2020 (2010) agrupou as tendências para o ramo de alimentação em cinco categorias: Sensorialidade e Prazer; Saudabilidade e Bem-estar; Conveniência e Praticidade; Confiabilidade e Qualidade; e Sustentabilidade e Ética.

A tendência de Saudabilidade e Bem-estar é refletida pelo envelhecimento das populações e pela relação de dietas com algumas doenças, influenciando em um estilo de vida mais saudável. Além disso, a busca pela Confiabilidade e Qualidade de alimentos também ganha espaço, uma vez que consumidores mais conscientes e informados demandam por produtos que transpareçam segurança através dos rótulos e selos de qualidade que demonstram o uso das boas práticas de fabricação e controle de riscos por parte das empresas (NITZKE et al., 2012).

2.2 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

Sabendo-se da obrigação em oferecer somente alimentos seguros e do aumento na busca dos mesmos, é imprescindível se atentar aos riscos de contaminação que os alimentos podem ser susceptíveis. Dentre as diversas formas de contaminação, uma das mais importantes é a microbiológica, causada principalmente por contato com água, objetos ou mão de manipuladores contaminados. Os microrganismos que causam este tipo de contaminação podem ser deteriorantes, provocando a deterioração precoce nos alimentos, e também patogênicos, que de alguma forma podem prejudicar a saúde do consumidor (WELKER et al., 2010).

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é um dos principais patógenos oportunistas pertencentes à família *Staphylococcaceae*, que coloniza humanos. As bactérias deste gênero possuem formato esférico

(por isso a nomenclatura “*coco*”) com diâmetro médio de 1 μm , são anaeróbias facultativas com maior crescimento em condições aeróbias, não esporuladas e Gram-positivas (FERREIRA et al., 2021). Durante o processo de multiplicação, estes microrganismos se organizam em grupo, formando um aglomerado semelhante a cachos de uva (a nomenclatura “*staphyle*” significa cacho de uvas em grego). O epíteto “*aureus*” advém da coloração amarelo-dourado das colônias, devido a presença de carotenoides em sua membrana celular (em latim, “*aureus*” quer dizer dourado) (ADAMS, 2009).

Esta bactéria é encontrada naturalmente em humanos, principalmente em cavidades nasais e na pele. Se trata de um microrganismo mesófilo, com temperatura de crescimento entre 6,5 °C e 45 °C, com ótimo em 37 °C e pH entre 4 e 9,8, com ótimo entre 6 e 7. A faixa de temperatura em que a mesma produz toxinas (enterotoxinas) é de 10 °C a 46 °C (FERREIRA et al., 2021). Além disso, é tolerante a altas concentrações de NaCl, variando de 10 % a 20 %, e a atividade de água mínima em seu desenvolvimento é de 0,86, sendo um valor inferior ao encontrado para outras bactérias não-halófilas (FERREIRA et al., 2021).

As enterotoxinas são proteínas de cadeia curta produzidas na matriz alimentar quando *S. aureus* se multiplica. Possuem baixo peso molecular, entre 26.000 e 30.000 daltons, com quantidades consideráveis de lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e tirosina nas cadeias polipeptídicas. São higroscópicas, ou seja, absorvem a umidade do ar, além de serem facilmente solúveis em água e soluções salinas. Seu ponto isoelétrico encontra-se em torno de 7,0 a 8,6 e são resistentes à presença de enzimas como tripsina, quimiotripsina, renina, papaína e pepsina. Além disso, as enterotoxinas são termoresistentes, sendo assim, resistem a temperaturas elevadas. Portanto, durante um processo de pasteurização por exemplo, a bactéria, *S. aureus*, é inativada, mas a toxina permanece no alimento. A enterotoxina mais comum responsável por causar surtos é a do tipo A. A forma mais comum de contaminação de alimentos por *S. aureus* é quando o manipulador com epidermes ou feridas infectadas entra em contato com o alimento. Os surtos de intoxicação são provocados por alimentos que permanecem por temperaturas de 10 a 46 °C (SCHELIN et al., 2011).

Os sintomas causados pela intoxicação vão desde náusea, vômitos, câimbras abdominais, diarreia e sudorese até dores de cabeça, calafrios, queda da pressão arterial e em raros casos, febre, variando com o grau de susceptibilidade do indivíduo, a concentração de enterotoxina no alimento e a quantidade de alimento consumido. A gravidade da doença está associada à condição de vida do indivíduo sendo mais severa em pessoas com sistema imune deficiente (RODRIGUES et al., 2004).

Alimentos mais comumente envolvidos em casos e surtos de intoxicação estafilocócica são o leite e derivados, creme, atum, frango, presunto e outras carnes cozidas. Existem também relatos de intoxicação através de queijos que são fabricados por estabelecimentos que não adotam as boas práticas de fabricação e outros critérios de higiene (FRANCO; LADGRAF, 2008).

2.3 SEGURANÇA DE ALIMENTOS EM LEITE

O leite é um alimento de grande importância na alimentação devido a sua elevada disponibilidade de nutrientes, uma vez que é fonte de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas. Sob o ponto de vista nutricional, o leite apresenta excelente qualidade em suas proteínas, que são divididas entre caseínas (α_1 , α_2 , β , γ e κ) e proteínas do soro (albumina, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulinas e proteose-peptonas), além do alto teor de cálcio, fósforo, magnésio, vitamina A, riboflavina e niacina (MENEZES et al., 2014).

Sua qualidade é influenciada por vários fatores, dentre eles, o manejo dos animais, alimentação e saúde da glândula mamária (DIZERÓ, 2019). Um estudo realizado por Santana et al. (2004) apontou diversos pontos no processamento do leite que podem ser responsáveis pela contaminação. Deste modo, constatou-se que a principal forma de contaminação é por meio de água residual em latões, tanques e tetos mal higienizados, demonstrando a necessidade da adoção de boas práticas de higiene e limpeza durante a ordenha. Além das más condições higiênicas, outra fonte de contaminação é por meio de animais doentes com mastite subclínica.

A mastite é caracterizada por uma inflamação nas glândulas mamárias, juntamente com danos ao epitélio glandular, que além de diminuir a produção de leite, altera sua composição e aumenta a contagem de células somáticas (CCS). A contaminação dos tetos das vacas normalmente se dá através da colonização de bactérias através do canal do teto, principalmente por *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae*, quando a ordenha é feita com pouca higiene e sem os cuidados necessários. Contudo, é comum que a vaca libere essas bactérias no momento da ordenha, promovendo a contaminação do leite (BRITO, 2022; MENEZES et al., 2014).

O leite é um alimento que apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos. Sua atividade de água, disponibilidade de nutrientes servindo como substrato, acidez em torno de 6,5, juntamente com uma temperatura de armazenamento inadequada em torno de 20 °C a 45 °C, promovem todas as condições que os microrganismos, inclusive *S. aureus*, precisam para se desenvolver, sendo assim, o leite é um produto que apresenta altos riscos de contaminação se tratado de forma inadequada (GUIMARÃES; ANDRADE, 2008).

Uma forma de minimizar o risco é por meio dos tratamentos térmicos aplicados ao leite, como a pasteurização, que é uma exigência da legislação (BRASIL, 1997), entretanto, muitos produtores não seguem esta exigência. Embora a legislação exija que o leite destinado a consumo humano e a produção de derivados lácteos fosse pasteurizado, nem toda a produção é submetida a inspeção, e aproximadamente entre 5 e 9 bilhões de litros não são devidamente vistoriados por órgão competente. Estima-se que 2 bilhões de litros de leite tenham sido destinados a fabricação de queijos diversos não inspecionados (SORIO, 2018).

Afim de evitar a contaminação e surtos por *S. aureus*, o controle da qualidade do leite e derivados se dá principalmente por meio de monitoramento rigoroso das condições higiênico-sanitárias, tanto no ambiente de ordenha quanto no de transformação da matéria-prima, tratamento térmico do leite, bem como pela aplicação de métodos de sanitização efetivos (DIAS et al., 2020). Dentre as formas de prevenção de contaminação, o uso de antimicrobianos naturais como forma de sanitização tem demonstrado resultados promissores no controle do desenvolvimento microbiano em alimentos.

2.4 COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS NATURAIS

Como citado anteriormente, os consumidores têm apresentado uma tendência em consumir produtos mais naturais com ausência de aditivos sintéticos, devido à possibilidade de causar riscos à saúde (BRASIL FOOD TRENDS 2020, 2010).

Tendo em vista o grau de conhecimento da população sobre a importância de consumir alimentos de qualidade, o aumento na demanda por produtos mais naturais, livres de conservantes sintéticos e com a vida de prateleira estendida, a indústria de alimentos juntamente com a comunidade científica da área de ciência e tecnologia de alimentos começou a investir em estudos sobre formas alternativas de conservar alimentos, o que incentivou a busca por antimicrobianos (conservantes) de origens naturais, que possam ser aplicados diretamente em alimentos, nas embalagens e nas superfícies de contato com alimentos, seja de forma individual ou combinado a outras tecnologias (GLASS; DOYLE, 2010).

Os antimicrobianos naturais podem ser obtidos a partir de microrganismos, vegetais e animais e apresentam a capacidade de inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, que prejudicariam a qualidade do produto, garantindo uma melhor conservação e diminuindo os riscos à saúde do consumidor. Contudo, vale ressaltar que o tipo de antimicrobiano selecionado deve ser compatível com as características sensoriais e químicas do produto, além da sua efetividade contra microrganismos (SETTANNI; CORSETTI, 2008; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

Dentre os principais antimicrobianos obtidos a partir de vegetais, encontram-se os compostos fenólicos, que são caracterizados por possuírem um anel aromático com um grupo hidroxil. Mais de 8000 compostos fenólicos já foram identificados em plantas. Sua principal função está relacionada com inibição ou inativação de diversos sistemas enzimáticos, ação antioxidante natural, atividade antimicrobiana e ação citotóxica (SCHAFRANSKI, 2019). Estes compostos aromáticos podem ser divididos em duas classes: flavonoides e não-flavonoides, sendo que os flavonoides podem ser subdivididos em outras seis classes: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, antocianinas e isoflavonas. Com relação aos não-flavonoides, estes são formados por ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico, como ácido gálico, e ácidos derivados do ácido cinâmico, como ácido cafeico (VILLALOBOS-DELGADO et al., 2019).

2.4.1 Extrato de folhas de yacon

As folhas de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) apresentam compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos, como ácido ferúlico e ácido cafeico, além de flavonoides como a quercetina, que apresentam capacidade antimicrobiana (GUSSOL; MATTANNA; RICHARDS, 2015). Os ácidos fenólicos são eficientes contra bactérias Gram-positivas, levando à acidificação do citoplasma das células, podendo levar à morte celular, portanto, como *S. aureus* são Gram-positivos, existe grande potencial do extrato apresentar resultados promissores contra esta bactéria (VILLALOBOS-DELGADO et al., 2019).

Ao se comparar com demais tubérculos, as raízes de yacon apresentam elevadas concentrações de compostos fenólicos, cerca de 200 mg/100 g de matéria fresca comestível (SANTANA; CARDOSO, 2008).

2.4.2. Nisina

As bacteriocinas são peptídeos biologicamente ativos ribossomicamente sintetizados por bactérias que tem ação bactericida sobre bactérias Gram-positivas. Elas são divididas em três classes: Classe I (antibióticos), Classe II e Classe III. A Classe I é subdividida entre Ia e Ib. A subclasse Ia tem como mecanismo de ação a formação de poros na membrana e tem sua estrutura mais flexível e é composta por peptídeos catiônicos e hidrofóbicos. Dentre as bacteriocinas desta subclasse, a mais conhecida é a nisina (RAMOS DE MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005).

A nisina é um peptídeo antimicrobiano natural produzido pela bactéria *Lactococcus lactis*. Apresenta potente atividade antibacteriana contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas, incluindo *S. aureus*. O uso de nisina para inibir o crescimento de *S. aureus* pode ter

implicações importantes para a segurança de alimentos e a saúde humana. Pesquisas mostraram que a nisina pode ser eficaz em inibir o crescimento de *S. aureus* em uma variedade de produtos alimentícios, incluindo queijo, carne e peixe. Também foi demonstrado sua eficácia na inibição do crescimento de *S. aureus in vitro* (RAMOS DE MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005).

A nisina possui variantes que se diferenciam pelos aminoácidos que constituem suas estruturas e tamanho das moléculas, mas apresentam atividade antimicrobiana muito semelhante. A primeira descrita por Rogers e Whittier em 1928, foi a nisina A, posteriormente mais algumas foram identificadas, como a nisina Z, Q, U e U₂, F, P e H (PIPER et al., 2010).

Desta forma, observando o potencial de patogenicidade e virulência de *S. aureus*, assim como os prejuízos que podem ser causados para a saúde dos consumidores, constatou-se a possibilidade em desenvolver um projeto de pesquisa cujo objetivo é analisar os efeitos de antimicrobianos naturais como o extrato de yacon e de nisina, sobre a viabilidade de *S. aureus in vitro* e em leite integral UAT. Este trabalho apresenta uma fonte vegetal promissora de compostos antimicrobianos naturais, a fim de promover maior disseminação, inclusive na indústria de alimentos, com viabilidade de aplicação total ou parcial combinada a outros processos em alimentos para promover a segurança microbiológica.

3 METODOLOGIA

3.1 MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O microrganismo teste utilizado no estudo, *S. aureus* ATCC 25923, foi cultivado em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia), a 37 °C por 18 h.

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE YACON

Folhas secas de *S. sonchifolius* obtidas na forma de preparado para chá, embaladas em sacos plásticos contendo 30 g, foram moídas e homogeneizadas em solução de 70 % isopropanol-2-ol (Dinâmica) acrescido de 0,1% ácido trifluoroacético (Dinâmica) (IPA). As extrações foram realizadas em banho ultrassom por 60 min seguida por agitação em placa de agitação magnética por cerca de 18 h à temperatura ambiente. A solução foi filtrada e, em seguida, centrifugada a 5.000 x g por 1 h. O sedimento foi descartado e o sobrenadante armazenado para etapas de purificação. O IPA foi removido do extrato utilizando-se evaporador rotativo e para concentração dos compostos com atividade antimicrobiana o material foi aplicado em coluna de 5g 20mL Strata C18-E SPE, pré-equilibrada com metanol e água. A fração com atividade antimicrobiana foi eluída novamente em IPA e por fim o extrato foi purificado em coluna semi-preparativa C12 Jupiter Proteo em cromatógrafo líquido de alto desempenho. A fração ativa foi liofilizada e, então, ressuspensa em IPA em concentração de 1000 mg/mL. O extrato de yacon foi mantido sob refrigeração até a realização dos experimentos.

3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE NISINA A E V

Nisina A e sua variante, nisina V (substituição de metionina por valina na posição 21 [M21V]) foram cedidas pela Dra. Paula O'Connor do Teagasc Moorepark, Fermoy, Irlanda. Solução estoque foi preparada a partir da bacteriocina liofilizada em tampão fosfato de sódio (10 mM; pH 7,0) em concentração de 100 mM. As soluções estoque de nisina A e V foram mantidas sob refrigeração até a realização dos experimentos.

3.4 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

Para determinar a CMI do extrato de folhas de yacon, caldo BHI suplementados com diferentes antimicrobianos (extrato de folha de yacon, nisina A e nisina V), em diferentes concentrações, foram transferidos para microplacas de poliestireno, contendo 96 poços, e inoculados com *S. aureus* ATCC 25923 em crescimento exponencial (densidade ótica a 500 nm [DO_{500nm}] 0,1) previamente propagados em 5 mL de BHI sem a presença de antimicrobianos.

Além dos poços contendo os antimicrobianos, uma coluna da placa foi utilizada como controle negativo (contendo apenas IPA ou PBS, além do meio) e outra como controle positivo (contendo meio, IPA ou PBS e inóculo); IPA serviu como diluente para preparar as diluições do extrato de yacon enquanto PBS (solução tampão fosfato de sódio) serviu como diluente para as soluções de nisina A e V. O Quadro 1 apresenta a organização dos poços das microplacas para determinação da concentração mínima inibitória.

Quadro 1. Organização microplacas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C- IPA	C+ IPA	Extrato de Yacon									
B												
C	C- PBS	C+ PBS	Nisina A									
D												
E			Nisina V									
F												

Fonte: Próprio autor, 2023.

Na coluna 1 foi realizado o controle negativo, contendo 175 μ L de BHI e 25 μ L de IPA ou PBS, a depender da linha. A coluna 2 foi utilizada para o controle positivo, contendo 155 μ L de BHI, 25 μ L de IPA ou PBS e 20 μ L de inóculo. As linhas A e B foram destinadas a diferentes concentrações de extrato de yacon; C e D para nisina A; e E e F para nisina V, contendo 155 μ L de meio BHI, 25 μ L do antimicrobiano e 20 μ L de inóculo. As colunas de 3 a 7 apresentam concentrações repetidas das colunas de 8 a 12, gerando quatro repetições para cada concentração. A faixa das concentrações utilizadas foi determinada com base na CMide cada antimicrobiano encontrados na literatura e estão apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2. Concentrações de yacon, nisina A e V nas microplacas

	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extrato folhas de yacon										
A	40	35	30	25	20	40	35	30	35	20
B	μ g/mL	μ g/mL	μ g/mL	μ g/mL	μ g/mL	μ g/mL	μ g/mL	μ g/mL	μ g/mL	μ g/mL
Nisina A										
C	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0
D	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M
Nisina V										
E	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0
F	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M	μ M

Fonte: Próprio autor, 2023.

A concentração mínima capaz de impedir a turvação do meio após 18 h de incubação a 37 °C foi considerada como o valor de CMI. Além da observação da turbidez do meio, foi realizada a leitura das placas em leitora de microplacas, em que a menor concentração testada apresentando absorvância a 630 nm abaixo de 0,1 foi considerado como CMI para o antimicrobiano correspondente. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5 EFEITO DO EXTRATO DE YACON E NISINA SOBRE O CRESCIMENTO DE *S. aureus* EM LEITE

Amostras de leite integral comercialmente esterilizado (submetido ao tratamento térmico do tipo ultra alta temperatura – UAT) foram obtidas no comércio local. As amostras foram manipuladas sob condições assépticas em cabine de fluxo laminar. *S. aureus* foi cultivado em caldo BHI incubado a 37 °C por 18 h. Em microtubos de 1,5 mL foram adicionados 920 µL de leite, 80 µL de antimicrobiano em diferentes concentrações e 20 µL de inóculo, centrifugado e lavado duas vezes com solução salina 0,85 % esterilizada. Neste experimento, apenas extrato de yacon e nisina A foram utilizados, considerando os melhores resultados obtidos para nisina A em comparação com nisina V.

A concentração utilizada para a elaboração deste experimento foi embasada na concentração mínima inibitória (CMI) de cada antimicrobiano definida no experimento anterior, porém, como neste caso o meio não foi o BHI e sim o leite, que apresenta uma composição bastante diferenciada, optou-se por testar concentrações mais elevadas, de duas, três e quatro vezes a CMI. Dois controles positivos foram realizados: em um deles, a bactéria foi inoculada em microtubos contendo apenas leite e no outro, o inóculo foi introduzido em leite contendo IPA ou PBS (Quadro 3). Controle negativo do experimento foi realizado em leite adicionado apenas dos antimicrobianos.

Quadro 3. Concentrações utilizadas para estudar o efeito dos antimicrobianos no leite

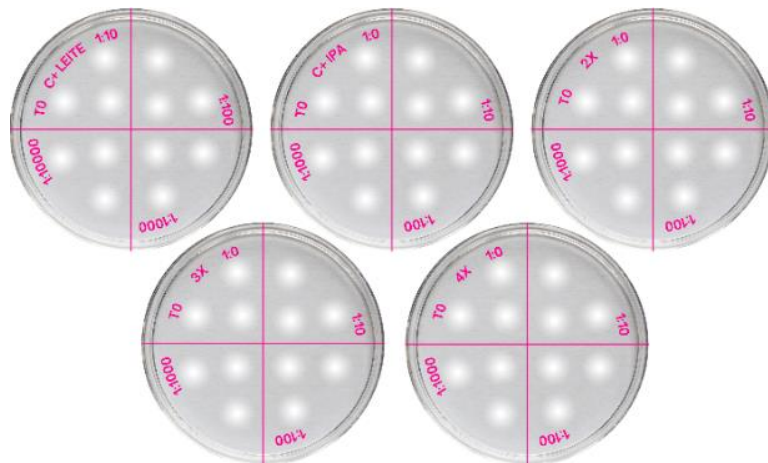
Extrato de yacon	C+ (LEITE)	C+ (LEITE + IPA)	2X	3X	4X
Nisina A	C+ (LEITE)	C+ (LEITE + PBS)	2X	3X	4X

Fonte: Próprio autor, 2023.

Os microtubos foram incubados a 37 °C e, em intervalos definidos de tempo (0, 2, 4, 6 e 24 h), amostras foram coletadas, diluídas e plaqueadas em superfície de ágar BHI contido em placas de Petri. As placas foram incubadas a 37 °C para determinar o número de células viáveis

determinado pela técnica de microgotas (HEBERT, 1990; PIMENTEL-FILHO et al., 2013), sendo que o volume de cada microgota foi de 20 µL retirados dos microtubos incubados (1:0) e das diluições feitas no momento do plaqueamento (1:10, 1:100 e 1:1000). A placa de Petri foi dividida em quatro quadrantes, com as diluições 1:0, 1:10, 1:100 e 1:1000, para facilitar a contagem das colônias (Figura 1). Para o controle positivo (leite inoculado com o microrganismo) e para os tratamentos no tempo 24 h, pois nestas aumentou-se uma diluição (1:10000), esperando que a quantidade de unidades formadoras de colônias fosse maior.

Figura 1. Representação da organização das placas



Fonte: Próprio autor, 2023.

Após a realização do experimento com os antimicrobianos, foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) no quadrante da diluição que fosse possível visualizar as colônias de forma individual e não aglomeradas. Em seguida, realizou-se um cálculo afim de se converter os dados para UFC/mL, conforme Equação 1, e posteriormente, os resultados foram transformados para log.

Equação 1. Cálculo no número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL)

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{Contagem média das colônias} \times \text{Inverso da diluição}}{\text{Volume de cada microgota}}$$

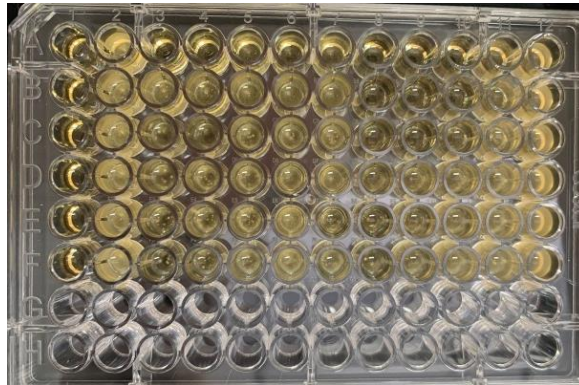
Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) no *software* Excel 365, considerando um único fator, que seriam as diferentes concentrações de antimicrobiano, a um nível de significância de 5%, com o objetivo de definir se houve diferença significativa entre o crescimento de *S. aureus* para as diferentes concentrações utilizadas de antimicrobiano. Para realizar a análise, utilizou-se o número médio de unidades formadoras de colônia por mL.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

Após a realização em triplicata do experimento elaborado para definir a CMI, obteve-se a concentração ideal para inibição do crescimento de *S. aureus in vitro*. A Figura 2 demonstra uma das placas onde é possível observar maior turvação na coluna do controle positivo (poços da segunda coluna da esquerda para direita) e menor turvação nas demais, mostrando que as soluções utilizadas apresentaram características antimicrobianas.

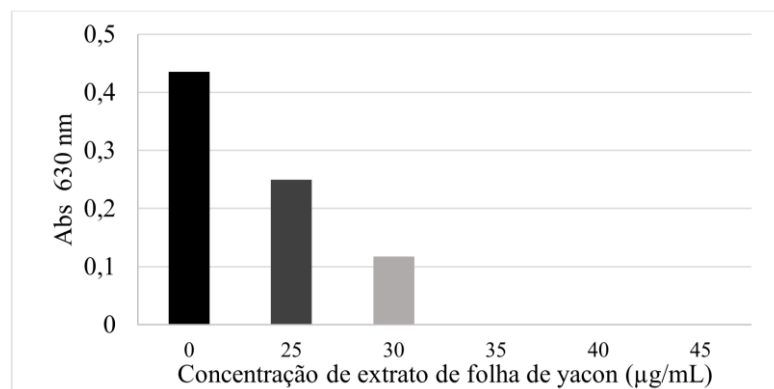
Figura 2. Exemplo de resultado do experimento de determinação da concentração mínima inibitória de extrato de yacon e soluções de nisina A e V



Fonte: Próprio autor, 2023.

Estão apresentados na Figura 3 os resultados com base em uma média feita entre todas as absorbâncias do crescimento de *S. aureus* na presença de diferentes concentrações de extrato de folha de yacon.

Figura 3. Absorbância do cultivo de *S. aureus* na presença de diferentes concentrações de extrato de folha de yacon



Fonte: Próprio autor, 2023.

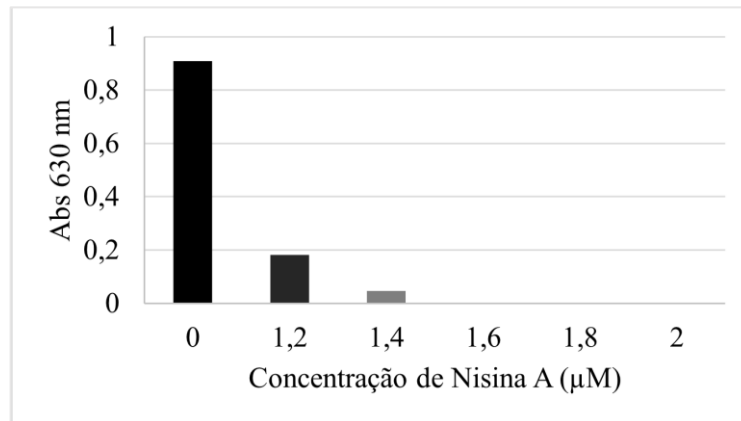
Quanto maior a concentração do extrato, menor foi o crescimento, demonstrando sua atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* nas condições de cultivo, e a concentração mínima observada que inibiu o crescimento, foi de 35 µg/mL. Marreros e Karold (2018) também observaram efeito antimicrobiano *in vitro* do extrato alcoólico bruto de yacon sobre *S. aureus* em todas as concentrações utilizadas (500 mg/mL, 750 mg/mL e 1000 mg/mL). Vale ressaltar que o extrato de yacon utilizado neste experimento era purificado, então uma menor concentração seria suficiente para causar efeito de inibição, em comparação com o extrato bruto. Segundo Andrade et. al (2017), o extrato apresenta propriedades antimicrobianas consideráveis contra bactérias Gram-positivas, e baixa atividade contra cepas Gram-negativas, sendo assim, ensaios realizados com *S. aureus* apresentaram-se promissores, assim como os obtidos neste trabalho.

Uma revisão bibliográfica realizada por Morguette, Bertão e Correia e Silva (2022) buscou fontes naturais com propriedades antimicrobianas com efeito sobre *S. aureus* e com possíveis aplicações para tratamento em feridas. A maior parte dos trabalhos encontrados apresentavam metodologia de microdiluição em caldo BHI, sob diferentes cepas da bactéria. Um estudo avaliou extrato hidroalcoólico de *Althaea officinalis* sobre *S. aureus* ATCC 25923 e obteve CMI de 330 µg/mL, apresentando atividade antimicrobiana e cicatrizante. Fleck et al. (2023) estudaram o efeito antimicrobiano de extrato aquoso rico em polifenóis de casca de jabuticaba em *S. aureus* ATCC 25923 e obteve CMI de 5100 µg/mL.

Uma outra fonte antimicrobiana natural que vem sendo amplamente estudada são os óleos essenciais. Piveta et al. (2022) estudaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais de melaleuca, alecrim e hortelã pimenta sobre *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. O óleo essencial de hortelã pimenta se destacou, apresentando maior atividade contra *S. aureus* (halo de 35 mm), *S. Enteritidis* (halo de 43 mm) e *S. Typhimurium* (halo de 53 mm), revelando o potencial deste óleo essencial tanto sobre bactérias Gram-positivas quanto em bactérias Gram-negativas.

Os resultados médios da absorvância do cultivo de *S. aureus* na presença de diferentes concentrações de nisina A, estão apresentados na Figura 4.

Figura 4. Absorbância do cultivo de *S. aureus* na presença de diferentes concentrações de nisina A

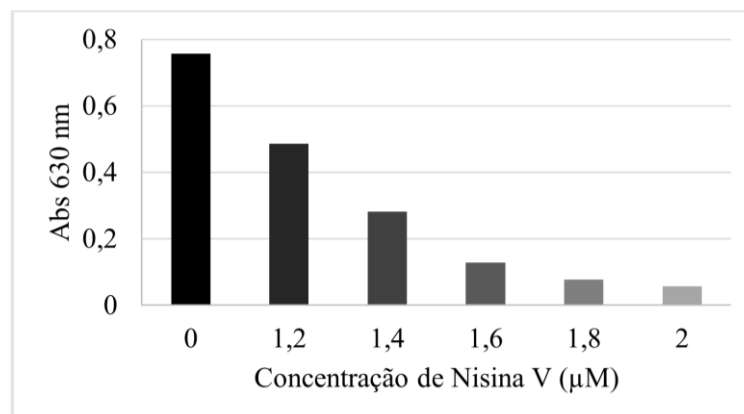


Fonte: Próprio autor, 2023.

O valor da concentração mínima inibitória de nisina A sobre *S. aureus* ATCC 25923 foi de 1,4 µM e está aproximado com o registrado por Alves (2014), de 1,14 µM e de Pimentel-Filho et al. (2014), de 1,2 µM.

Os resultados com base na média das leituras de absorbância de *S. aureus* cultivado em caldo BHI na presença de nisina V estão apresentados na Figura 5.

Figura 5. Absorbância do cultivo de *S. aureus* na presença de diferentes concentrações de nisina V



Fonte: Próprio autor, 2023.

A partir da concentração de 1,8 µM, o valor médio de absorbância foi inferior a 0,1, portanto, a CMI considerada foi de 1,8 µM, valor condizente com a literatura (ALVES, 2014).

A busca pelo uso de substâncias naturais que possam conservar alimentos e combater o desenvolvimento de microrganismos têm crescido e os pesquisadores também têm se

interessado e buscado por novas fontes naturais diferentes das que já são amplamente utilizadas, como a nisina. A bacteriocina é a mais estudada e utilizada apresentando alta eficiência na conservação de alimentos, inclusive na inibição do crescimento de *S. aureus*, sendo uso aprovado em diversos países. Porém, sua obtenção é mais complexa e o processo tem um custo elevado (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008). Além desta bacteriocina, existem muitas outras que vem sendo estudadas, como as pediocinas, que também apresentam eficácia contra *S. aureus* (VITOLA et al. 2018).

Nisina tem ação sobre bactérias Gram-positivas pela formação de poros na membrana plasmática mediada pela interação com o lipídio II. O complexo de poros formado inibe a síntese da parede celular, causando extravazando do conteúdo celular (ZHENG, 2022). A variante nisina V foi geneticamente modificada a partir da nisina A, em que o gene *nisV*, gerado por mutagênese baseada em reação em cadeia da polimerase (PCR), é inserido em local apropriado no cromossomo *L. lactis* NZ9800 pela recombinação cruzada dupla para gerar *L. lactis* NZ9800::nis V. Estudos apontam a nisina V como estável e com atividade antimicrobiana aprimorada contra bactérias Gram-positivas, incluindo *S. aureus* (DES et al., 2010; ZHENG, 2022). Entretanto, neste experimento a nisina A demonstrou comportamento melhor que a nisina V.

As CMI sobre *S. aureus* obtidas para cada antimicrobiano testado estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração Mínima Inibitória do extrato de yacon, nisina A e nisina V

Antimicrobiano	CMI
Extrato de yacon	35 µg/mL
Nisina A	1,4 µM
Nisina V	1,8 µM

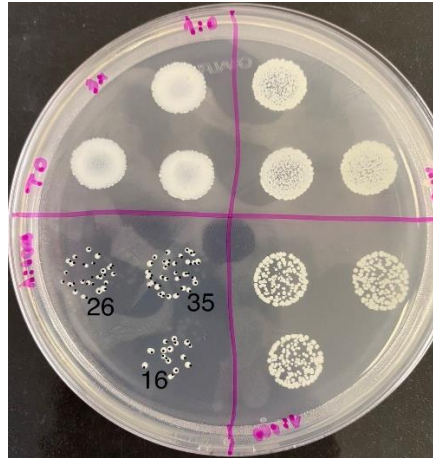
Fonte: Próprio autor, 2023.

4.2 EFEITO DO EXTRATO DE YACON E NISINA A SOBRE O CRESCIMENTO DE *S. aureus* EM LEITE

O efeito inibitório do extrato de yacon e de nisina A foram avaliados em leite integral UAT (ultra alta temperatura) sobre o patógeno alimentar oportunista *S. aureus*. A Figura 6 apresenta um exemplo do plaqueamento em microgotas de um tratamento com suas respectivas

diluições, sendo possível realizar a contagem de unidades formadoras de colônias na última diluição (quadrante inferior esquerdo).

Figura 6. Exemplo de placa do experimento após incubação



Fonte: Próprio autor, 2023.

Os resultados obtidos para o extrato de yacon são apresentados na Tabela 2.

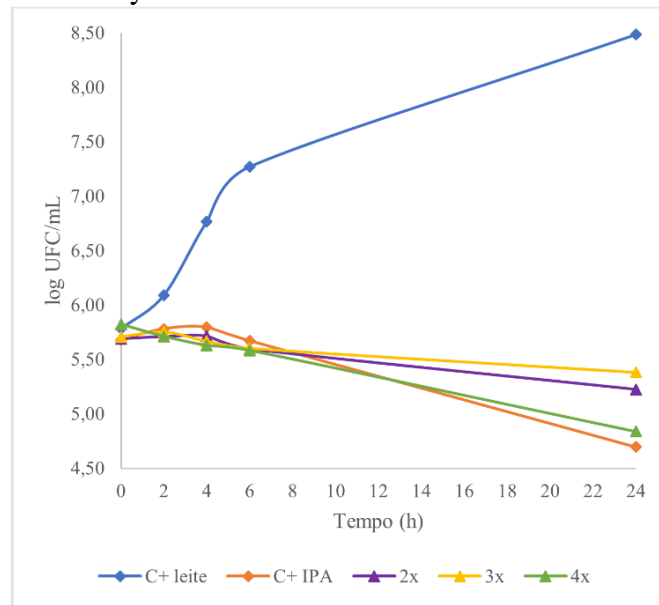
Tabela 2. Log (UFC/mL) de *S. aureus* cultivado em leite integral UAT na presença de extrato de yacon

Tempo	Log UFC/mL \pm desvio padrão				
	C+	C+ IPA	2x (70 μ g/mL)	3x (105 μ g/mL)	4x (140 μ g/mL)
0	5,78 \pm 0,29	5,68 \pm 0,22	5,69 \pm 0,24	5,71 \pm 0,18	5,82 \pm 0,30
2	6,09 \pm 0,37	5,78 \pm 0,17	5,71 \pm 0,14	5,75 \pm 0,22	5,71 \pm 0,15
4	6,77 \pm 0,90	5,80 \pm 0,24	5,71 \pm 0,10	5,67 \pm 0,11	5,63 \pm 0,11
6	7,27 \pm 0,77	5,67 \pm 0,13	5,60 \pm 0,10	5,60 \pm 0,09	5,58 \pm 0,13
24	8,49 \pm 0,06	4,69 \pm 0,29	5,22 \pm 1,09	5,38 \pm 1,07	4,84 \pm 0,60

Fonte: Próprio autor, 2023.

Com os resultados apresentados anteriormente, foi construído um gráfico do comportamento de *S. aureus* em leite integral ao longo do tempo na presença de extrato de yacon (Figura 7).

Figura 7. Efeito do extrato de yacon sobre a viabilidade de *S. aureus* em leite integral



Fonte: Próprio autor, 2023.

O gráfico demonstra de forma mais visual e nítida que ao longo do tempo, o controle positivo, sem a interferência de nenhum antimicrobiano ou diluente (leite adicionado do inóculo) apresentou crescimento exponencial, com velocidade específica de crescimento (μ) igual a $0,1043 \text{ h}^{-1}$. Por outro lado, no controle positivo no qual a bactéria foi inoculada em leite acrescido de IPA, isopropanol acidificado com ácido trifluoroacético (pH final 2), foi possível observar um efeito de inibição do crescimento nas primeiras 6 horas seguido de morte celular, como pode ser observado no tempo 24 h, onde há redução da contagem bacteriana. Os tratamentos apresentaram respostas similares entre si e similares quando comparados ao controle positivo contendo IPA. Ou seja, atividade bacteriostática nas primeiras 6 horas seguido de atividade bactericida. No tempo 24 h, pode-se observar que a concentração quatro vezes maior que a CMI ($140 \mu\text{g/mL}$) apresentou maior efeito na redução do crescimento dentre os demais tratamentos contendo extrato de yacon, porém, ainda se observa que o maior efeito ocorreu quando apenas o IPA estava presente.

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) a um nível de significância de 5 %, para identificar se houve diferença significativa entre as amostras. Os resultados da análise estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Análise de variância de fator único – extrato de yacon

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	6,974074	4	1,743519	5,523922	0,003662	2,8661
Dentro dos grupos	6,312611	20	0,315631			
Total	13,28669	24				

Fonte: Próprio autor, 2023.

Como o valor-P foi menor que o nível de significância de 5% e o valor de F foi maior que o F crítico, conclui-se que a hipótese nula não é válida, ou seja, houve diferença significativa em pelo menos uma das amostras. Como se visualiza pelo gráfico, a amostra com maior diferença é a do controle positivo contendo apenas leite e o inóculo bacteriano, sem IPA ou extrato de yacon.

Em comparação isolada entre a viabilidade de *S. aureus* no controle positivo contendo apenas leite com os tratamentos 2x, 3x e 4x, observa-se que a presença do antimicrobiano em suas diferentes concentrações foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*. Porém, quando se observa que o controle positivo contendo IPA causou uma redução do crescimento tão pronunciado quanto os tratamentos contendo extrato de yacon, constata-se que a inibição do crescimento no leite, não se deu somente pela presença do extrato de yacon, mas sim pela presença do IPA, uma vez que este foi o diluente utilizado para preparar as diferentes concentrações de yacon. Para se aprofundar na análise e saber se há diferença entre as amostras contendo extrato de yacon e o controle positivo com IPA, uma ANOVA foi realizada a um nível de significância de 5%, desconsiderando os dados do controle positivo contendo apenas leite e inóculo. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Análise de variância de fator único desconsiderando C+ (Leite) – extrato de yacon

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,038717	3	0,012906	0,118672	0,947811	3,2389
Dentro dos grupos	1,739982	16	0,108749			
Total	1,778699	19				

Fonte: Próprio autor, 2023.

Diferente da análise anterior, o valor-P foi maior que o nível de significância de 5% e o valor de F foi menor que o F crítico, comprovando a hipótese nula de que não houve diferença

significativa entre as amostras, comprovando que o que realmente inibiu o crescimento de *S. aureus* foi o IPA e não necessariamente o extrato de yacon.

Sabe-se que o isopropanol é um álcool, e dependendo de sua concentração, pode ter efeito antimicrobiano, tanto que é utilizado como desinfetante em limpeza de diversas superfícies. O IPA utilizado estava a uma concentração inicial de 70% e acidificado, o que pode ter causado interferência no desenvolvimento da bactéria no leite, embora em meio BHI o mesmo não tenha interferido no controle positivo, que apresentou crescimento muito mais elevado que nos demais poços (Figura 3). Tal contradição sugere que a matriz do leite, sendo mais complexa, foi desestabilizada de alguma forma pelo IPA, resultando na inibição de *S. aureus*. O IPA foi utilizado pois os compostos antimicrobianos extraídos das folhas de yacon apresentam características hidrofóbicas e, portanto, precisam de um solvente orgânico para serem completamente solubilizados. O IPA foi utilizado tanto na obtenção do extrato quanto nas diluições.

Uma pesquisa realizada por ATWAA et al. (2022) estudou a atividade antimicrobiana de alguns extratos vegetais e suas aplicações em molho de tomate e leite de vaca pasteurizado. No preparo dos extratos, o diluente utilizado foi o metanol. A CMI obtida sobre *S. aureus* para *Rhus coriaria* (sumagre), *Tamarindus indica* (tamarindo), *Citrus limon* (limão), *Hibiscus sabdariffa* (rosele) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) foi de 310 µg/mL, 625 µg/mL, 877 µg/mL, 877 µg/mL e 1316 µg/mL, respectivamente. A aplicação dos extratos metanólicos no leite de vaca pasteurizado apontaram que houve aumento na vida útil em comparação ao leite não tratado, sendo que o extrato que apresentou maior atividade antimicrobiana foi o de sumagre. No estudo, os autores também utilizaram um diluente alcoólico e incluíram nas análises controles negativos com e sem o extrato vegetal, e também um controle positivo sem extrato para saber se o organismo era capaz de crescer no meio. Entretanto, não é aberta discussão sobre os resultados obtidos para os controles, o que nos leva a entender que houve diferença significativa entre os controles e os demais tratamentos contendo os extratos, ou seja, não houve interferência do diluente nos resultados obtidos, diferindo dos resultados obtidos neste trabalho.

Já no experimento realizado com a nisina A, os resultados estão apresentados na Tabela 5.

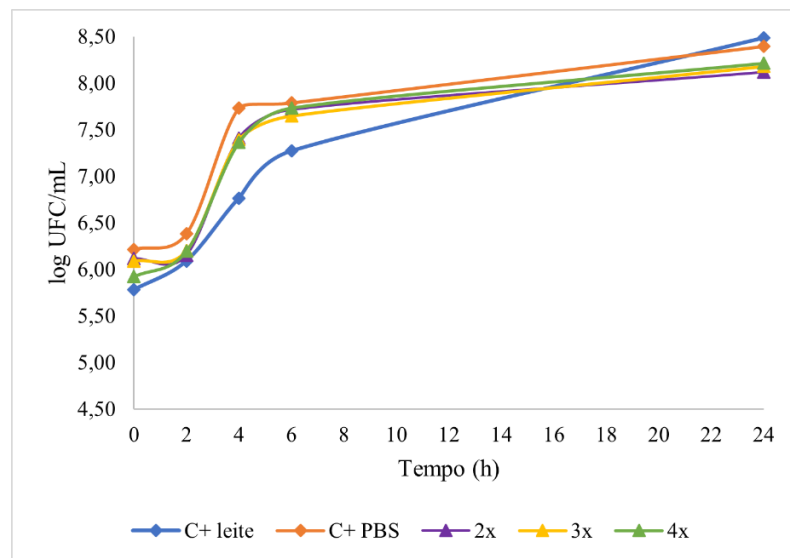
Tabela 5. Log (UFC/mL) de *S. aureus* cultivado em leite integral UAT na presença de nisina A

Tempo	Log UFC/mL \pm desvio padrão				
	C+ leite	C+ PBS	2x (2,8 μ M)	3x (3,2 μ M)	4x (5,6 μ M)
0	5,78 \pm 0,29	6,21 \pm 0,09	6,12 \pm 0,24	6,09 \pm 0,21	5,92 \pm 0,73
2	6,09 \pm 0,37	6,38 \pm 0,25	6,15 \pm 0,12	6,20 \pm 0,16	6,20 \pm 0,24
4	6,77 \pm 0,90	7,73 \pm 0,38	7,41 \pm 0,07	7,39 \pm 0,05	7,36 \pm 0,10
6	7,27 \pm 0,77	7,79 \pm 0,02	7,71 \pm 0,03	7,65 \pm 0,11	7,73 \pm 0,02
24	8,49 \pm 0,06	8,39 \pm 0,23	8,12 \pm 0,56	8,18 \pm 0,52	8,21 \pm 0,57

Fonte: Próprio autor, 2023.

Com os resultados apresentados anteriormente, foi construída um gráfico do comportamento de *S. aureus* em leite integral ao longo do tempo na presença de nisina A (Figura 8).

Figura 8 Efeito de nisina A sobre a viabilidade de *S. aureus* em leite integral



Fonte: Próprio autor, 2023.

Os resultados apresentados não foram os esperados, pois houve crescimento elevado em todos os testes realizados na presença de nisina. As concentrações utilizadas partiram das mesmas proporções sugeridas para o extrato de yacon a partir dos valores de CMI.

Para saber se houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras, realizou-se uma Análise de Variância (ANOVA) a um nível de significância de 5% e os resultados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Análise de variância de fator único – Nisina A

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,589055	5	0,117811	0,122283	0,98607	2,620654
Dentro dos grupos	23,12234	24	0,963431			
Total	23,7114	29				

Fonte: Próprio autor, 2023.

Como o valor-P foi maior que o nível de significância de 5%, e o valor de F foi menor que o F crítico, conclui-se que a hipótese nula é válida e não houve diferença estatística entre as amostras, ou seja, não houve diferença entre os controles positivos e as diferentes concentrações de antimicrobiano.

A nisina é amplamente utilizada e recomendada no Brasil como conservante de alimentos, inclusive de queijos. Ela age com a membrana citoplasmática de *S. aureus* e outras bactérias Gram-positivas despolarizando e permitindo a perda de integridade celular e inibição da biossíntese da parede celular. Em um estudo elaborado para caracterizar cepas de *S. aureus* de leite e queijo de cabra e sua inibição por ácido gálico, nisina e velame da caatinga brasileira, os autores detectaram que o antimicrobiano com maior atividade inibitória contra o isolado de *S. aureus* foi a nisina, que reduziu a contagem de 6,477 Log₁₀UFC/mL para 3,324 Log₁₀UFC/mL nas primeiras 3 h, e para 2,771 Log₁₀UFC/mL após 24 h (DE OLIVEIRA et al., 2020).

Um estudo realizado por Arqués et al. (2011) apontou que a nisina reduziu *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* em leite, o que também contradiz com o encontrado neste trabalho. Sendo assim, o resultado obtido não foi satisfatório e contesta com o resultado encontrado na literatura, uma vez que se esperava queda na contagem conforme o aumento do tempo de exposição ao antimicrobiano, e o que se obteve foi um aumento independente da concentração de nisina utilizada.

Existem duas formas de aplicação de bacteriocinas no controle de patógenos em alimentos lácteos, uma pela inoculação do alimento com bactérias lácteas que produzem bacteriocinas e a outra pela adição direta de bacteriocinas purificadas ou semipurificadas nos alimentos. A segunda forma, que foi a utilizada neste trabalho, apresenta uma desvantagem com relação à primeira, pois normalmente as bacteriocinas são adsorvidas na matriz do alimento e degradadas, resultando na perda de sua atividade antibacteriana, o que pode explicar o resultado obtido (SILVA et al., 2018).

Outro trabalho relatou diminuição na atividade antimicrobiana da nisina na presença de leite integral esterilizado e comparando com a adição de leite semidesnatado, não se notou a mesma diminuição da atividade. A diferença entre os leites, é que o semidesnatado possui menor porcentagem de gordura, o que indica que a gordura do leite integral é um fator inibidor da atividade de nisina (JONES, 1974). Deste modo, entende-se que este fator também pode ter interferido para os resultados obtidos neste trabalho. A gordura pode ter sido um interferente também para o experimento com extrato de folha de yacon, uma vez que o extrato foi solubilizado e diluído em IPA, que é também um desengordurante. Assim, o IPA pode ter reagido com os lipídeos do leite integral interferindo em sua ação antimicrobiana.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstra um efeito antimicrobiano do extrato da folha de yacon, atuando na inibição do crescimento de *S. aureus in vitro*, com uma concentração mínima inibitória de 35 µg/mL. Embora no leite o resultado possa ter sido mascarado pela presença do álcool isopropílico acidificado a 70%, o potencial antimicrobiano do yacon é significativo em caldo BHI e pode apresentar resultados mais promissores em leite se mais estudos com concentrações inferiores de álcool isopropílico ou com outros diluentes forem realizados.

Além disso, nisina A e V também apresentaram propriedades já esperadas de inibição sobre *S. aureus in vitro*, com concentração mínima inibitória de 1,4 e 1,8 µM, respectivamente. Porém, o experimento realizado com a nisina A no leite não apresentou resultados satisfatórios e diferiu dos encontrados na literatura, uma vez que não foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* no leite, apresentando um crescimento superior ao controle positivo. Sendo assim, se faz necessária a continuidade da pesquisa com adaptação dos métodos, para que se possa constatar resultados mais promissores, já que tanto o yacon quanto a nisina demonstraram propriedades antimicrobianas *in vitro* bastante favoráveis.

6 REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. *Staphylococcus aureus* and other pathogenic Gram-positive cocci. In: BLACKBURN, C. DE W.; MCCLURE, P. J. (Eds.). **Foodborne Pathogens (Second Edition)**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. [s.l.] Woodhead Publishing, 2009. p. 802–819.
- ALVES, F. C. B. **Ação antibacteriana de associações de antimicrobianos: nisina, óleos essenciais e compostos majoritários**. Universidade Estadual Paulista. Botucatu/SP, 2014.
- ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; NUÑEZ, M.; AND MEDINA, M. **Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk**. Food Control, v. 22, ed. 3-4. 2011.
- ATWAA, E. S. H. et al. **Antimicrobial Activity of Some Plant Extracts and Their Applications in Homemade Tomato Paste and Pasteurized Cow Milk as Natural Preservatives**. Fermentation, v. 8. 2022.
- BRASIL FOOD TRENDS 2020. São Paulo: FIESP/ITAL, 2010.
- BRASIL, Instrução Normativa nº 76/2018 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A, 2018.
- BRASIL, Portaria nº 352/1997 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal, 1997.
- BRASIL. Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil – Informe 2022. [s.l.] Ministério da Saúde, jan. 2022.
- BRITO, M. A. et al. **Perigos Biológicos**. [s.l.] EMBRAPA - Agronegócio do Leite. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_212_21720039247.html>. Acesso em 19 nov. 2022.
- DE ANDRADE, E.F.; CARPINÉ, D.; DAGOSTIN, J.L.A. et al. **Identificação e atividade antimicrobiana da mistura sesquiterpeno-lactona extraída de folhas secas de *Smallanthus sonchifolius***. Eur Food Res Technol, v. 243, p. 2155-2161, 2017.
- DE OLIVEIRA, A. P. D. et al. **Caracterização de cepas de *Staphylococcus aureus* de leite e queijo de cabra e avaliação de sua inibição por ácido gálico, nisina e velame da caatinga brasileira**. International Journal Dairy Technology: v. 73, ed. 2, 2020. p. 345-356.
- DES, CAMPOS, et al. **Studies with bioengineered Nisin peptides highlight the broad-spectrum potency of Nisin V**. Microbial biotechnology, V. 3, ed. 4. 2010.
- DIAS, V. H. C., et al. **Métodos oficiais empregados para autenticidade, controle da qualidade e detecção de fraudes em leite cru refrigerado no Brasil**. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 2. 2020.
- DIZERÓ, M. F. C. **Perfil microbiológico de leite bovino como ferramenta para assistência técnica**. Nova Odessa, SP: [s.n.], 2019.

FERREIRA, J. C. et al. **Ação antimicrobiana do *Allium sativum* L. frente as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*: uma revisão de literatura.** Curitiba: Rev. Visão Acadêmica, v. 22, n. 4. 2021.

FLECK, N. et al. **Efeito antimicrobiano de extrato aquoso rico em polifenóis de casca de jaboticaba em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.** Rio Grande do Sul: Brazilian Journal Food Technology, 26. 2023.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Agentes antimicrobianos químicos e naturais.** Revista Fi. 2010. Disponível em: <https://revistafi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060739062001465320470.pdf>. Acesso em: 15 de dez. 2022.

FRANCO, B. D. G. M.; LADGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

GLASS, K.A.; DOYLE, M.E. **Sodium reduction and its effect on food safety, food quality, and human health.** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v.9, p.44 - 56, 2010.

GUIMARÃES, K. A. S.; ANDRADE, A. S. **Contaminação de produtos lácteos por *Staphylococcus aureus*: revisão bibliográfica.** Campo Grande: Biblioteca Virtual de Saúde. 2008.

GUSSOL, A. P.; MATTANNA, P.; RICHARDS, N. **Yacon: benefícios à saúde e aplicações tecnológicas.** Santa Maria: Ciência Rural, v.45, n.5, p.912-919, mai, 2015.

JONES, L. W. **Effect of butterfat on inhibition of *Staphylococcus aureus* by nisin.** Utah/US: Department of Biology. 1974.

MARREROS, M.; KAROLD, K. **Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Smallanthus sonchifolius* “Yacon” sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.** Universidad Nacional de Trujillo – Facultad de Medicina. Trujillo – Perú, 2018.

MENEZES, M. F. C. et al. Microbiota e conservação do leite. **REGET**, v. 18, 2014.

MORGUETTE, A. E. B.; BERTÃO, A. M. S.; CORREIA E SILVA, C. M. **Potencial antimicrobiano de produtos naturais contra *Staphylococcus aureus* de infecções de feridas.** Londrina: Rev. Terra & Cultura, v. 38, n. especial. 2022.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. **Bacteriocinas em alimentos: uma revisão.** Campinas: Brazilian Journal of Food Technology, v. 11, n. 2. 2008.

NITZKE, J. A. et al. **Segurança alimentar – retorno às origens?** Brazilian Journal of Food Technology, IV SSA, mai. 2012.

PIMENTEL-FILHO, N. J. et al. **Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion.** International Journal of Food Microbiology, 190, 2014. p. 1-8.

PIPER C. et al. **Bioengineering of a Nisin A-producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z.** Ireland: Microbial biotechnology. 2010.

- PIVETA, H. A. et al. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais de melaleuca, alecrim e hortelã pimenta**. IMES Catanduva: Revista Interciência, v. 1, n° 10. 2022.
- RAMOS DE MELO, N.; SOARES, N. D. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. **Nisina: um conservante natural para alimentos**. Viçosa: Revista Ceres, v. 52, n. 304. 2005.
- RODRIGUES, K. L. et al. **Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional**. Rio Grande do Sul: Tecnologia de alimentos – Ciência rural. 2004.
- SANTANA, E. H. W. et al. **Milk contamination in different points of the dairy process. Mesophilic, psychrotrophic and proteolytic**. Londrina: Semina - Ciências Agrárias, v. 25, n. 4, p. 349-358, 2004.
- SANTANA, I.; CARDOSO, M. H. **Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais**. Santa Maria: Ciência Rural, v.38, n.3, p.898-905, mai-jun, 2008.
- SCHAFRANSKI, K. **Extração e caracterização de compostos fenólicos de folhas de Amoreira preta (*Morus nigra L.*) e encapsulamento em esferas de alginato**. Ponta Grossa: Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.
- SCHELIN, J. et al. **The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment**. Universidade de Lund, Suécia: Rev. Virulence, v. 2. 2011.
- SETTANNI, L.; CORSETTI, A. **Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation**. International Journal of Food Microbiology, V. 121, Edição 2, 2008, p. 123-138.
- SILVA C, C. G.; SILVA, S. P. M.; RIBEIRO, S. C. **Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation**. Frontiers in Microbiology, v. 9. 2018.
- SORIO, A. **Cadeia agroindustrial do leite no Brasil - diagnóstico dos fatores limitantes à competitividade**. 2018.
- VILLALOBOS-DELGADO, L. H. et al. **Natural antimicrobial agents to improve foods shelf life**. In: GALANAKIS, C. M. (Ed.). Food Quality and Shelf Life. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 125–157.
- VITOLA, H. R. S. et al. **Efeito de nisina e pediocina sobre culturas de *Staphylococcus aureus* isoladas de carcaças de frango**. Porto Alegre: Revista Brasileira de Biociências, v. 16, n. 1. 2018.
- WELKER, C. A. D. et al. **Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. Rio Grande do Sul: Revista brasileira de biociências, v. 8, n. 1. 2010.
- ZHENG, Y. et al. **Variantes de nisina geradas por engenharia de proteínas e suas propriedades**. Bioengineering. 2022.