

Propriedade antimicrobiana do eugenol frente às amostras de *Alicyclobacillus* spp. isoladas de suco de laranja

Antimicrobial properties of eugenol on *Alicyclobacillus* spp. isolated from orange juice

RIALA6 1483

Juliana Guerra de OLIVEIRA¹, Benício Alves de ABREU FILHO^{2*}

*Endereço para correspondência: ²Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, CEP: 87020-900 Jardim Universitário, Zona 7 – Maringá, PR, Brasil. Tel.: +55 (44) 3011-4955. E-mail: baafilho@uem.br

¹Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto, SP, Brasil

Recebido: 31.10.2011- Aceito para publicação: 18.04.2012

RESUMO

Foi avaliada a atividade antimicrobiana do eugenol contra *Alicyclobacillus hesperidum*, *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, *Alicyclobacillus acidiphilus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* e de *Alicyclobacillus* spp., isolados em indústrias de sucos de laranja de várias regiões do Estado de São Paulo. O teste de suscetibilidade para o eugenol foi realizado determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em placas de 96 cavidades. A CIM do eugenol variou de 66,65 a >1066,4 µg/ml, evidenciando-se a atividade inibitória forte e moderada frente a todas as amostras testadas e a atividade bactericida. Este estudo demonstrou ser significativa a fonte de isolamento das linhagens de *Alicyclobacillus* spp. nas indústrias. Conclui-se que o eugenol possui eficaz atividade antimicrobiana contra *Alicyclobacillus* spp. e sugere-se o uso deste composto para prevenir a deterioração de bebidas acidificadas e para diminuir o custo do controle microbiológico mais especificamente em suco de laranja. **Palavras-chave.** *Alicyclobacillus*, eugenol, suco de laranja, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

The antimicrobial activity of eugenol was evaluated on *Alicyclobacillus hesperidum*, *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, *Alicyclobacillus acidiphilus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus* spp. samples, which were isolated from orange juice industries of several regions of São Paulo. The antimicrobial susceptibility to eugenol was tested by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution technique in 96-well plates. The MIC of eugenol ranged from 66.65 to > 1066.4 µg/ml, showing strong and moderate inhibitory activity on all of tested bacteria samples, and its bactericidal activity. In this study, the source of *Alicyclobacillus* spp. strains isolation in industries proved to be significant. Considering the observed results, it can conclude that eugenol has antimicrobial effectiveness on *Alicyclobacillus* spp., and it is suggested the use of this compound for preventing the acidified beverages deterioration, and to decrease the cost of microbiological control specifically in orange juice.

Keywords. *Alicyclobacillus*, eugenol, orange juice, antibacterial activity.

INTRODUÇÃO

O gênero *Alicyclobacillus* spp. compreende 18 diferentes espécies de bactérias Gram-positivas formadoras de esporos, isoladas de solo, suco de frutas deteriorado ou de ambientes extremos. A habilidade de crescer em pH ácido (3,0-3,5), alta temperatura (50-70°C) e a presença de ácidos graxos na membrana são algumas características do gênero¹.

Espécies de *Alicyclobacillus* têm sido comumente isoladas de alimentos e bebidas ácidas termoprocessadas. A incidência de *Alicyclobacillus* spp. é observada principalmente em sucos de laranja e maçã², também são isolados de sucos de manga³ e pêra⁴. Este micro-organismo é visto como um desafio para a estabilidade microbiológica de sucos de frutas pelo mundo inteiro e são considerados organismos-alvo na avaliação da qualidade de produtos ácidos termoprocessados.

O comportamento acidotermofílico proporciona aos esporos de *Alicyclobacillus* spp. a habilidade de sobrevivência em etapas letais do processamento do suco de fruta, por exemplo, sanitização da fruta e pasteurização do suco. A deterioração do produto é caracterizada pela presença de um sabor e odor desagradáveis, aumento da turbidez do produto e a formação de um sedimento branco no fundo da embalagem. Uma das principais causas da deterioração por *Alicyclobacillus* spp. é a formação do composto 2,6-dibromofenol, 2-6 diclorofenol e guaicol.

Compostos naturais com ação antimicrobiana são vistos como novas alternativas para controlar o crescimento de *Alicyclobacillus* spp. em produtos ácidos termoprocessados⁵ e melhorar características sensoriais e qualidade microbiológica de sucos. O eugenol é um composto fenólico, componente principal (80-95%) do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), relatado como agente antiviral, bactericida e fungicida. A ação de inibição microbiana do eugenol pode estar relacionada com a ruptura da membrana ou por inativação de enzimas e materiais genéticos⁶.

O estudo do eugenol como agente antimicrobiano e flavorizante em sucos de frutas pode ser visto como uma alternativa viável para prolongar a vida útil do produto e diminuir perdas econômicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano do eugenol frente amostras de *Alicyclobacillus* spp. isoladas de suco de laranja de indústrias localizadas em diferentes regiões do estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo e condições de cultivo

Amostras isoladas de suco de laranja em diferentes etapas do processo industrial (suco fresco, polpa e suco concentrado antes e após adições) foram selecionadas de fábricas de três diferentes regiões do estado de São Paulo. Os dados de origem dos isolados e linhagens referência encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1. Isolados de *Alicyclobacillus* spp. utilizados nos experimentos para avaliação da atividade antibacteriana do eugenol

| Isolados de amostras de suco de laranja | |
|---|-------------------------|
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0267 |
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0269 |
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0277 |
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0278 |
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0279 |
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0281 |
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0282 |
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0283 |
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0288 |
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0290 |
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0291 |
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0293 |
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0294 |
| <i>Alicyclobacillus</i> spp. | CBMAI 0296 |
| Linhagens de referência | |
| <i>A. cycloheptanicus</i> DSM 4006 ^T | CBMAI 0297 ^T |
| <i>A. acidoterrestris</i> DSM 3922 ^T | CBMAI 0244 ^T |
| <i>A. acidiphilus</i> DSM 14558 ^T | CBMAI 0247 ^T |
| <i>A. hesperidum</i> DSM 12489 ^T | CBMAI 0246 ^T |

CBMAI = Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria, CPQBA/UNICAMP, Paulínia, SP. DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

As linhagens de *Alicyclobacillus* isoladas de amostras ambientais foram obtidas da Coleção de Culturas Tropical (CCT), Fundação André Tosello, Campinas (SP), originárias de um estudo de campo realizado em conjunto com a Associação Brasileira de Exportadores de Citrus. Essas amostras estão estocadas e codificadas na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria- CBMAI, Paulínia (SP).

Para o isolamento das amostras, foi utilizado o meio de cultura *A. acidocaldarius*/*A. acidoterrestris* thermophilic ágar (BAT). Todos os isolados selecionados para o estudo foram preservados a -80°C em glicerol.

Preparo da droga teste (Eugenol)

O eugenol (adquirido em farmácia com densidade de 1,0664 g/mL) foi diluído 1/100 em salina 0,9% estéril e Tween 2%. Em seguida, essa solução foi diluída 1/5 em salina 0,9% estéril, resultando em uma concentração final de 2132,8 µg/mL.

Preparo das drogas-padrão (Vancomicina e Cloranfenicol)

A quantidade de 1 mg de cada droga foi dissolvida em 1.000 µL de água destilada estéril. Cada solução foi diluída 1/2 em salina 0,9%, e 1/4 em meio BAT, resultando em uma concentração final de 125 µg/mL.

Preparo do inóculo bacteriano

Os micro-organismos foram cultivados em meio BAT caldo por 24-48 horas a 45°C. Em seguida, uma suspensão padronizada (0,5 da escala McFarland = 10⁸ UFC/mL) foi utilizada na preparação. Esta suspensão bacteriana foi diluída 1/10 em meio BAT caldo (10⁷ UFC/mL).

Determinação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do eugenol foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Para o teste, foi utilizada uma microplaca de 96 poços contendo 100 µL de caldo BAT em todos os poços. Foram adicionados 100 µL da solução de eugenol no primeiro poço e, posteriormente, foi realizada uma diluição seriada. O mesmo procedimento foi feito para as drogas padrão, vancomicina e cloranfenicol. Em seguida, 5 µL do preparo do inóculo bacteriano foram adicionados em todos os poços.

A susceptibilidade ao eugenol foi testada nas concentrações de 1.066,4 até 0,52 µg/mL. Para vancomicina e cloranfenicol, foram avaliadas as concentrações de 62,5 µg/mL até 0,03 µg/mL.

As microplacas foram incubadas a 45°C por 24-48 horas e acondicionadas em sacos plásticos contendo um chumaço de algodão úmido para evitar a evaporação excessiva durante a incubação. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) definida como a menor concentração do composto em que não é observado crescimento microbiano visível. Todas as análises foram feitas em duplicatas.

Teste da concentração mínima bactericida

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada pelo cultivo de 100 µL em placas de

Petri contendo meio BAT-ágar de cada poço em que foi observada inibição. As placas foram incubadas a 45°C por 24-48 horas, acondicionadas em sacos plásticos contendo um chumaço de algodão úmido para evitar a evaporação excessiva durante a incubação. A CMB foi definida como a menor concentração do composto capaz de matar as células microbianas. Todas as análises foram feitas em duplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foi investigado o potencial antimicrobiano do eugenol frente amostras de *Alicyclobacillus* spp. O resultado das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para o eugenol e drogas padrão está relatado na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras e padrões testados

| Amostras CBMAI | Eugenol (µg/ml) | Vancomicina (µg/ml) | Cloranfenicol (µg/ml) |
|-------------------|-----------------|---------------------|-----------------------|
| 0267 | >1066,4 | 0,12 | 0,48 |
| 0269 | 1066,4 | 0,48 | 3,90 |
| 0277 | 1066,4 | 0,48 | 3,90 |
| 0278 | 133,3 | 3,90 | 0,97 |
| 0279 | 1066,4 | 0,97 | 7,81 |
| 0281 | 533,2 | 0,24 | 0,97 |
| 0282 | 66,5 | 0,24 | 0,48 |
| 0283 | >1066,4 | 0,48 | 7,81 |
| 0288 | 66,65 | 0,48 | 3,90 |
| 0290 | 533,2 | 0,97 | 3,90 |
| 0291 | >1066,4 | 0,48 | 7,81 |
| 0293 | 266,6 | 0,24 | 0,97 |
| 0294 | 133,3 | 0,48 | 1,95 |
| 0296 | >1066,4 | 0,48 | 7,81 |
| 0244 ^T | 533,2 | 0,12 | 3,90 |
| 0246 ^T | 66,65 | 0,97 | 1,95 |
| 0247 ^T | 133,3 | 0,48 | 3,90 |
| 0297 ^T | 133,3 | 0,48 | 3,90 |

T: amostra padrão

De acordo com os resultados obtidos, a CIM do eugenol variou de 66,65 a >1.066,4 µg/mL. Esse resultado indicou que algumas amostras foram mais sensíveis ao composto em relação a outras. Esta diferença observada pode estar associada às etapas do processamento industrial do suco, bem como à origem dessas amostras. Além de que, a composição dos óleos essenciais é completamente variável dependendo do modo de extração, plantas e clima⁵.

De acordo com dados da literatura, atividade inibitória de materiais vegetais pode ser classificada em forte, moderada e fraca, que corresponde a CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de até 500; entre 600 e 1.500; e acima de 1.600, respectivamente⁷. No presente estudo, eugenol apresentou atividade inibitória forte e moderada frente às amostras de *Alicyclobacillus* spp. Este resultado difere de outro trabalho que obteve CIMs maiores quando utilizadas as bactérias formadoras de esporos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*⁸.

Em relação à avaliação das amostras-padrão, a CIM correspondeu a uma atividade inibitória forte para *Alicyclobacillus hesperidum* (CBMAI 0246^T), *Alicyclobacillus cycloheptanicus* (CBMAI 0297^T), *Alicyclobacillus acidiphilus* (CBMAI 0247^T) e atividade inibitória moderada para *Alicyclobacillus acidoterrestris* (CBMAI 0244^T). Resultado semelhante foi observado por Abreu Filho et al.⁹, que verificaram o potencial de inibição do óleo essencial de ervas aromáticas, cujo componente principal é o eugenol, contra a bactéria *Alicyclobacillus acidoterrestris* DMS 2498, demonstrando haver uma forte e moderada atividade inibitória.

Para as drogas padrão testadas, a CIM verificada variou de 7,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ até 0,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cloranfenicol, e de 0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ até 3,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para vancomicina. Esta atividade inibitória forte contra estes micro-organismos pode ser vista como uma alternativa em associação com eugenol para o controle da germinação de esporos de *Alicyclobacillus* spp. Nesta visão, Bevilacqua et al.¹⁰ comprovaram possuir efeito sinérgico, eugenol e cinamaldeído, no controle de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Outros autores também relataram o mesmo efeito sinérgico frente aos fungos *Lenzites betulina* e *Laetiporus sulphureus* e a bactéria *Helicobacter pylori*^{11,12}.

Eugenol exibe efeito bactericida contra uma ampla variedade de micro-organismos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhi*. Os resultados do presente trabalho mostraram igual ação contra *Alicyclobacillus* spp., nas concentrações ($\mu\text{g}/\text{mL}$): 533,2; 266,6; 66,65; 66,65; 133,3 para as amostras 0244, 0293, 0282, 0288, e 0297, respectivamente.

A fonte de isolamento das linhagens de *Alicyclobacillus* spp. demonstrou ser significativa neste estudo. Os micro-organismos isolados de suco concentrado após a pasteurização apresentaram fortes e moderadas atividade inibitória, com a CIM variando de 133,3 a >1.066,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; demonstrando, desta

forma, diferentes respostas ao composto nesta fase da industrialização. O eugenol apresentou uma atividade inibitória forte, frente à amostra isolada da água "taste", usada no enxágue final de tanques e correção de Brix. Para a indústria, este resultado é importante, uma vez que mostra a necessidade de diferentes formas de controle.

Vários autores destacam diferenças quanto à susceptibilidade da ação antimicrobiana do eugenol frente a diferentes microrganismos. Meena e Vijay¹³ estudaram atividade de vários óleos essenciais contra *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mycoderma* sp. e *Aspergillus niger* e observaram vários graus de inibição, sendo *Mycoderma* sp o mais susceptível e *Bacillus cereus*, o mais resistente. Oussalah et al.¹⁴ também verificaram diferentes respostas quanto ao efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* (cravinho), cujo principal composto é o eugenol, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Tippayatun e Chonhenchob⁸ obtiveram a CIM de 8 a 11 mg/mL , dependendo da amostra bacteriana testada, sendo *E.coli* o micro-organismo que demonstrou maior sensibilidade ao composto.

O conhecimento da ação do composto eugenol como um agente bioconservador torna-se importante, uma vez que este agente poderia ser utilizado após o processo de pasteurização industrial, sendo este procedimento não eficaz contra as formas esporuladas.

Novos estudos são necessários sobre a determinação de *Alicyclobacillus* spp. em diferentes sucos de frutas ácidas. A resistência das linhagens a diferentes etapas industriais de suco de frutas pode estar associada a diferenças observadas entre as linhagens em relação a germinação/crescimento de esporos e inativação termal, influência da atividade de água e outros constituintes do produto como fenóis¹⁵. Além disso, a idade celular, o número de células, desidratação do protoplasto e a temperatura de esporulação podem afetar a resistência térmica. Grandes populações microbianas podem também fornecer maior resistência ao calor devido a termo-proteção e proteínas extracelulares que são secretadas pelas células¹⁶.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o eugenol possui atividade antimicrobiana para *Alicyclobacillus* spp., atividade inibitória forte e moderada, além de demonstrado atividade bactericida. O composto testado possui um bom potencial para o uso como conservante

alimentar, porém seu uso necessita de análises sensoriais e organolépticas para avaliar o grau de interferência no suco de laranja ou bebidas acidificadas.

REFERÊNCIAS

1. Yamazaki K, Murakami M, Kawai Y, Inoue N, Matsuda T. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. *Food Microbiol*. 2000;17:315-20.
2. Luo H, Yousef AE, Wang HH. A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *Lett Appl Microbiol*. 2004;39:376-82.
3. Gouws PA, Gie L, Pretorius A, Dhansay N. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate. *Int J Food Sci Technol*. 2005;40:789-92.
4. Groenewald WH, Gouws PA, Witthuhn RC. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiol*. 2009;26:71-6.
5. Bevilacqua A, Corbol MR, Sinigaglia M. Inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by natural compounds. *Int J Food Sci Technol*. 2008;43:1271-5.
6. Wendakdoon CN, Sakaguchi M. Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *J Food Protect*. 1993;56:410-13.
7. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agri Food Chem*. 2001;49:4168-70.
8. Tippayatum P, Chonhenchob V. Antibacterial activities of thymol, eugenol and nisin against some food spoilage bacteria. *Nat Sci*. 2007;41:319-23.
9. Abreu Filho BA. Caracterização taxonômica de linhagens de *Alicyclobacillus* spp. isoladas na indústria de suco de laranja [tese de doutorado]. Campinas, SP: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 2005.
10. Bevilacqua A, Corbo AR, Sinigaglia M. Combining eugenol and cinnamaldehyde to control the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Control*. 2010;21:172-7.
11. Yen TB, Chang HT, Hsieh CC, Chang ST. Antifungal properties of ethanolic extract and its active compounds from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* (Florin) heartwood. *Bioresour Technol*. 2008;99(11):4871-7.
12. Ali SM, Khan AA, Ahmed I, Musaddiq M, Ahmed KS, Polasa H, et al. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2005;4(20):1-7.
13. Meena M, Vijay S. Antimicrobial activity of essential oils from spices. *J Food Sci Technol*. 1994;31:68-70.
14. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2007;18:414-20.
15. Silva FVM, Gibbs P. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends Food Sci Technol*. 2001;12(2):68-74.
16. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Food protection with high temperatures, and characteristics of thermophilic microorganisms. *Modern Food Microbiology*. 2005;5: 415-41.