

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
CAMPUS DE CAMPO MOURÃO

SIMONE DA SILVA

**EFEITO DO EXTRATO DE *Mauritia flexuosa* (buriti)
SOBRE BIOFILMES BACTERIANOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO
2018

SIMONE DA SILVA

**EFEITO DO EXTRATO DE *Mauritia flexuosa* (buriti)
SOBRE BIOFILMES BACTERIANOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado à disciplina de trabalho de diplomação do curso superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de tecnólogo.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina F. Geraldo Perdoncini

Co-orientadora: Dra Adriele R Santos

CAMPO MOURÃO

2018



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Campus Campo Mourão

Departamento Acadêmico de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

EFEITO DO EXTRATO DE *Mauritia flexuosa* (buriti) SOBRE BIOFILMES BACTERIANOS

Por

SIMONE DA SILVA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 15 de Junho de 2018 como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini
Orientador

Dra Adriele R Santos
Co-orientadora

Profa. Msc. Idineia Fernandes dos Santos
Membro da banca

Profa. Dra. Roberta de Souza Leone
Membro da banca

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no Departamento Acadêmico de Alimentos da UTFPR Campus Campo Mourão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus...

Aos meus pais Joaquim da Silva e Maria C. Da Silva, irmãos, irmã, Cunhadas, sobrinhos e primas, pelo apoio e incentivo.

Aos professores da Universidade, pelo ensinamento e em especial a minha orientadora e co-orientadora, pela dedicação e paciência, e professoras da banca, pelo carinho e disposição em fazer parte desse momento.

Aos amigos que tenho e tive o prazer de conhecer nessa caminhada, em especial Érika Cavalheiro Cardoso, pelo apoio e amizade.

E aos demais funcionários da Universidade, pela colaboração.

RESUMO

SILVA, S. **Efeito do extrato de *Mauritia flexuosa* (buriti) sobre biofilmes bacterianos.** Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal Do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2018.

O buriti (*Mauritia flexuosa*) membro da família *Palmae*, trata-se de uma das mais belas palmeiras, cuja utilidade vai desde a raiz até as folhas. O fruto produzido por ele vem despertando interesse pela sua composição, contendo importantes atividades antibacteriana, antioxidante e cicatrizante. Possuindo aplicações em áreas farmacêutica e alimentícias. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do extrato de buriti sobre biofilmes bacterianos de *S.aureus* e *Salmonella* Typhimurium, formados e em formação. Foram formados biofilmes de 24 horas e após o tratamento com o extrato de buriti em diferentes tempos, analisado a concentração inibitória mínima (CIM) de 1xCIM e 2xCIM. Foram analisadas também as concentrações sub-CIM ($\frac{1}{2}$ de CIM e $\frac{1}{4}$ de CIM) do extrato em biofilmes em formação e foi determinada a viabilidade do biofilme formado. As análises foram realizadas em triplicatas em quatro repetições diferentes e todas as concentrações testadas do extrato de buriti apresentaram atividade antibiofilme.

Palavras-chave: Buriti; bactérias; ação antibiofilme; concentração inibitória mínima.

ABSTRACT

SILVA, S. **Efeito do extrato de Mauritia flexuosa (buriti) sobre biofilmes bacterianos.** Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal Do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2018.

The buriti (*Mauritia flexuosa*), a member of the Palmae family, is one of the most beautiful palms, whose usefulness goes from the roots to the leaves. The fruit produced by it has aroused interest in its composition, containing important antibacterial, antioxidant and healing activities. Possessing applications in pharmaceutical and food areas. The objective of this work was to evaluate the effect of buriti extract on bacterial biofilms of *S. aureus* and *Salmonella Typhimurium*, formed and in formation. Biofilms were formed 24 hours after treatment with buriti extract at different times, the minimum inhibitory concentration (MIC) of 1xMIC and 2xMIC were analyzed. Sub-MIC ($\frac{1}{2}$ of MIC and $\frac{1}{4}$ of MIC) of the extract in biofilms in formation were also analyzed and the viability of the formed biofilm was determined. The analyzes were performed in triplicates in four different replicates and all tested concentrations of buriti extract showed antibiofilm activity.

Keywords: Buriti; bacteria; antibiofilm action; minimum inhibitory concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cerrado do Oeste da Bahia, com fontes de água e buritizais.....	13
Figura 2 - Fruto do buriti.....	14
Figura 3 - Contagem em Log UFC/cm ² das células viáveis do biofilme de <i>S. aureus</i> e <i>S. Typhimurium</i> após ser tratado com extrato de buriti na concentração de 1/2xCIM durante sua formação.....	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Condições para obtenção dos extratos da polpa de buriti	21
TABELA 2 - Resultados do biofilme de <i>S. aureus</i> tratado após 24 horas de formação com extrato de buriti nas concentrações de 1xCIM e 2XCIM	24
TABELA 3 - Resultados do biofilme de <i>S. Typhimurium</i> tratado após 24 horas de formação com extrato de buriti nas concentrações de 1xCIM e 2XCIM	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1 <i>Mauritia flexuosa</i>	13
3.2 BACTÉRIAS	16
3.3 BIOFILMES	17
3.4 FORMAS OU SUBSTÂNCIAS USADAS PARA COMBATER OU ELIMINAR BIOFILMES.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 LOCAL	21
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO DA POLPA DE BURITI.....	21
4.3 CULTURAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	22
4.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIES DE POLIESTIRENO	22
4.5 EFEITO DO BURITI EM BIOFILMES FORMADOS.....	23
4.6 EFEITO DO BURITI SOBRE BIOFILMES EM FORMAÇÃO.....	23
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
6 CONCLUSÃO	29
7 REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) vem aumentando de modo significativo a nível mundial (Lanza et al., 2017). Em países onde o consumo de alimentos industrializados é maior, estima-se que 30% das pessoas sofram de doenças transmitidas por alimentos a cada ano (WHO, 2002 apud BURT et al., 2004).

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) um em cada seis americanos adoecem pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas e, 3.000 morrem a cada ano. O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos estima que as doenças transmitidas por alimentos custem US\$ 15,6 bilhões por ano (CDC, 2016).

No Brasil, de 2007 a 2016, ocorreram 6.632 surtos de doenças transmitidas por alimentos, com 118.104 doentes, 17.186 hospitalizações e 109 óbitos. Dentre os surtos ocorridos, somente 29.3% tiveram seus agentes identificados e, destes, 7.5% foram causados por *Salmonella* spp. e 5.8% por *S. aureus* (Saúde, 2016), tornando-os dois patógenos alimentares importantes.

Os cuidados em todas as etapas de produção de um alimento são de extrema importância nas indústrias, estas devem tomar todos os cuidados necessários para manter a integridade do alimento até chegar ao consumidor final. Contudo, sabe-se que a eliminação do microrganismo na produção de alimentos se torna difícil devido à sua capacidade de formação de biofilmes.

Os biofilmes formam-se em utensílios e tubulações de equipamentos que processam alimentos, por má higienização ou por métodos ineficazes. Ao se formarem criam uma “camada” protetora tornando as bactérias resistentes a tratamentos antimicrobianos e sanitizantes utilizados no processo de higienização (DOUROU et al., 2011). A presença de biofilme bacteriano na linha de processamento de alimentos pode gerar contaminação cruzada e pós-processamento, o que leva a deterioração e perda da qualidade dos alimentos, bem como causar DTA nos consumidores (KASNOWSKI et al., 2010). Além disso, os biofilmes podem provocar a corrosão dos equipamentos e tubulações nas linhas de produção (NGUYEN et al., 2014).

Neste sentido, a *Mauritia Flexuosa* conhecida popularmente como buriti, uma espécie de palmeira de origem amazônica produtora de um fruto com propriedades

química e farmacológica, com ação antioxidante, cicatrizante e antimicrobiana, vem sendo pesquisada com o intuito de combater a formação dos biofilmes bacterianos (UFRJ, 2012).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antibiofilme do extrato de buriti em biofilmes bacterianos, com o propósito de eliminar a presença ou inibir a formação do mesmo. Com isto possivelmente, contribuir com as indústrias, maximizando a eficiência e eficácia da higienização de equipamentos, diminuindo assim o risco de contaminação bacteriana.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação do extrato de buriti sobre biofilme de *S. aureus* e *Salmonella* Typhimurium.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação do extrato de buriti sobre biofilmes formados de *S. aureus* e *Salmonella* Typhimurium tratados com extrato de buriti nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM com diferentes tempos de contato;
- Avaliar a ação do extrato de buriti sobre biofilmes em formação de *S. aureus* e *Salmonella* Typhimurium tratados com extrato de buriti nas concentrações de 1/2xCIM.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 MAURITIA FLEXUOSA

Mauritia flexuosa é o nome científico do Buriti, também conhecido por coqueiro-buriti, itá, palmeira-dos-brejos, buritizeiro, meriti, miriti, muriti, muritim, muruti, carandá-guaçu, carnadaí-guaçu, dentre outros nomes populares, é uma espécie de palmeira de origem Amazônica, pertence a família Palmae, que predomina as regiões alagadas e úmidas do Norte mas também é encontrada nas regiões do Centro-Oeste e Nordeste do Brasil (ALMEIDA et al., 1998.; EMBRAPA, 2018). O buriti está entre as mais belas palmeiras, com suas folhas em formato de leque, frutas do tipo coco, sua altura pode alcançar entre 20 e 35 metros, o crescimento é muito lento, mas apresenta uma grande longevidade, sendo que para o seu desenvolvimento é indispensável que o solo seja ácido e tenha a presença de água em abundância, como margens de rios, áreas brejosas ou permanentemente inundadas. Nessas condições, formam um aglomerado de plantas, chamados de buritizais (EMBRAPA, 2018).



Figura 1 - Cerrado do Oeste da Bahia, com fontes de água e buritizais.

Fonte: Wichinieski, (2017)

Geralmente o processo de plantio utilizado é o de propagação por semente. Para a obtenção das sementes, os frutos devem ser colhidos quando iniciarem a queda naturalmente ou recolhidos após a queda, dessa forma o plantio pode ser feito sem a retirada da polpa ao menos que for para armazenamento ou transporte, nestes casos a polpa deve ser retirada. Entretanto, a viabilidade da semente é curta, em poucas semanas ela perde seu poder germinativo, porém as sementes recém-colhidas alcançam 100 % de germinação, que acontece em 75 dias (EMBRAPA, 2018).

A produção acontece uma vez por ano com colheita prevista de dezembro a junho, exceto para plantas femininas, onde a produção é a cada dois anos, a colheita no final do período chuvoso (EMBRAPA, 2018). A produção de uma palmeira varia de 40 a 360 quilos de fruto. Em 1 hectare manejado a produção pode chegar de 2,5 a 23 toneladas por ano. As palmeiras femininas de buriti podem produzir de 1 a 9 cachos e, a quantidade de fruto em cada cacho pode variar de 600 a 1.200 unidades (CYMERYYS et al., 2005).

Os cocos tem a casca no formato de escamas de cor castanho-avermelhado, as dimensões variam entre 4 cm e 7 cm de comprimento e o diâmetro entre 3 e 5 cm, o peso da unidade fica aproximadamente entre 25 g a 40 g. No interior do fruto contém uma semente dura em formato oval e amêndoas comestíveis de cor amarelo-alaranjada, com sabor agridoce e consistência gordurosa (BARROS et al. 2018).



Figura 2 - Fruto do buriti.
Fonte: Portal paramazônia, (2016)

Segundo Araujo et al. (2013) a polpa de buriti tem composição média de 10,3 % de umidade, 4,4 % de cinzas, 2,4 % de lipídeos, 4,3 % de proteínas, 32,6 % de fibra bruta, 5,1 % de açúcares solúveis totais, 6,1 % de amido, 46 % de carboidratos totais e 4,8 mg de carotenóides totais por 100g de polpa desidratada.

Os principais componentes da polpa do buriti são os polifenóis, ácido ascórbico, β -caroteno, cálcio, ferro e proteínas. A fração lipídica da polpa de buriti é basicamente composta de tocoferol, carotenóides e óleos com predominância dos ácidos graxos, oléico (18 % - ácido graxo monoinsaturado) e palmítico (75 % - ácido graxo saturado) (UFRJ, 2012). Contendo também os ácidos graxos láurico, mirístico, esteárico, e linoléico (BATISTA et al., 2012). Segundo Koolen et al. (2013) a composição química encontrada no fruto de buriti pode ser influenciada por vários fatores desde a germinação da semente, aos fatores sazonais, genéticos e agrônômicos.

A comercialização de produtos desta palmeira em regiões onde é nativa proporciona renda para a população local e ajuda a manter a integridade do ecossistema (OLIVEIRA et al., 2017). Da palmeira, quase tudo se aproveita. As folhas são utilizadas em cobertura de casas rústicas, na confecção de chapéus, balaios, baús, cestos, vassouras, sacolas. As fibras servem para a confecção de redes e cordas. Os pecíolos (caules) das folhas, leves e porosos, podendo chegar a 5 m de comprimento, são artesanalmente usados na construção de brinquedos e também como rolhas de garrafas. Com vários pecíolos secos e cordas, são feitas camas rústicas, balsas e os remos. Na parte interna do tronco pode ser extraída uma farinha que serve para a produção de pão. Da parte externa, são retiradas calhas rústicas para bicas d'água utilizadas na área rural. O caule possui um líquido açucarado que serve para a fabricação de vinho. O fruto é consumido in natura, ou são produzido sorvetes, cremes, vitaminas, doces e paçocas. Da polpa também é extraído um óleo de cor avermelhada utilizado em queimaduras, que causa um rápido alívio das dores e a cicatrização. As polpas e os caroços são também utilizados na alimentação de bovinos e suínos (ALMEIDA et al., 1994.; MARTINS et al. 2016).

Os estudos de compostos bioativos com atividades antimicrobianas a partir de frutos de buriti são muito raros. Koolen et al. (2013) e Batista et al. (2012) mostraram atividade antimicrobiana de extratos de folhas, tronco e frutos de *M. flexuosa*. O fruto

apresenta atividade antibacteriana tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas.

Segundo Batista et al. (2012) o extrato do fruto de buriti apresenta potencial para aplicações farmacêuticas e tecnológicas devido à presença de compostos bioativos com atividade antibacteriana. Segundo Koolen et al., (2013) As atividades antimicrobianas e antioxidantes nos extratos fenólicos de buriti são bastante potentes e implicam presença de compostos com potente atividade de eliminação de radicais livres.

3.2 BACTÉRIAS

As bactérias são microrganismos unicelulares procariontes de vida livre ou parasita, que ocorrem sob várias formas (cocos, bacilos, espirilos) podendo levar a várias doenças, fermentações ou putrefação (apodrecimento), seja nos seres vivos ou em suas matérias orgânicas.

Staphylococcus aureus são bactérias Gram-positivas que possuem formato de cocos, quando observado ao microscópio representam cachos de uva. Elas se desenvolvem na ausência ou presença do oxigênio, sendo que, com oxigênio apresentam um crescimento maior, onde produzem a catalase. O crescimento de *S. aureus* é ótimo em meio levemente ácido, com pH entre 6 e 7, mas também pode se desenvolver entre pH 4 a 9,8. Dentre as bactérias não-halófilas, são os únicos que conseguem se desenvolver com atividade de água abaixo do valor mínimo estabelecido para esta classe. São bactérias mesófilas, cuja temperatura de crescimento varia entre 7 °C a 47,8 °C, não possuem resistência a tratamentos térmicos, mas, são tolerantes à concentração de 10 % a 20 % de NaCl e nitratos, possibilitando assim a presença em alimentos curados. Em temperaturas entre 10 °C e 46 °C produzem enterotoxinas termorresistentes, mas que são desnaturadas no processo de enlatamento; se ingerida causa doença que pode ser fatal para pessoas debilitadas (FRANCO, 2008).

Salmonella é um gênero de bactérias Gram-negativas que possui formato de bacilos, não são produtoras de esporos, algumas não possuem flagelos não podendo assim se movimentar, outras são monofásica (possuem flagelos em apenas uma fase), mas a maioria das *Salmonella* é bifásica (apresentam flagelos de fase 1 e 2 ao mesmo tempo). Pode se desenvolver em pH entre 9,0 e 4,0, tendo como ótimo o pH neutro. A temperatura de multiplicação de *Salmonella* fica entre 5 °C e 47 °C sendo que a ideal é 35-37 °C. Essa bactéria não resiste a concentrações de sal superiores a 9 %. É inibida por nitrito que na combinação com pH ácido tem seu efeito intensificado (FRANCO, 2008).

3.3 BIOFILMES

Os biofilmes são comunidades microbianas de células imobilizadas que estão irreversivelmente ligadas a um substrato ou interface ou entre si, estão embutidas numa matriz autoproduzida de substâncias extracelulares poliméricas, e apresentam uma característica física alterada, com relação à taxa de crescimento e transcrição gênica, do que as correspondentes células planctônicas. Com a evolução do conhecimento a respeito de biofilmes, pode-se caracterizar sua formação e seus potenciais danos a saúde, em vários segmentos de atividades humanas (DOUROU et al., 2011).

A formação do biofilme é um fenômeno complexo influenciado por diversos fatores, incluindo as propriedades químicas e físicas da superfície celular e da superfície de fixação, e a composição do meio envolvente (FRANK et al. 2001). Existe mais de uma teoria proposta para a formação de biofilmes. A primeira descrita por Marshall et al. (1971) ressalta que a adesão é um processo que ocorre em duas fases, na primeira fase, o processo é ainda reversível, em função do processo de adesão do microrganismo na superfície ocorrer por forças de Van der Waals e atração eletrostática. Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídea ou protéica, produzida pela bactéria, que é denominada matriz de glicocálix, que suporta a formação de biofilmes (MELO,

2008). O glicocálix é produzido após o processo de adesão superficial, e vai fornecer condições de adesão do peptidoglicano das bactérias Gram positivas e a parte externa da membrana externa das Gram negativas (PARIZI, 1998).

A teoria descrita por Notermans, Dormans et al. (1991) descreve a formação do biofilme em três etapas: I- fixação da bactéria; II- consolidação da bactéria na superfície; III- a colonização e crescimento da bactéria. Na etapa de consolidação, ocorre a produção de material extracelular que facilita a fixação dos microrganismos, nesta fase não se consegue retirar as células fixadas (NOTERMANS, et al. 1991 citado por MACEDO, 2000).

Outra teoria para formação de biofilmes expõe cinco etapas, para ser bem compreendidas podem ser separadas na ordem: I- condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; II - transportes de células e nutrientes para o sítio de aderência; III- inicia-se o processo de adesão bacteriana, ainda reversível, por atração eletrostática; IV- crescimento celular, colonização e adesão irreversível; e, V- o biofilme apresenta alta atividade metabólica, liberação de células localizadas na periferia (DUDDRIDGE e PRITCHARD, 1983 citados por MACEDO, 2000; SANTOS, 2009).

Independente de cada teoria, a formação de biofilmes pode ser afetada por vários fatores, incluindo a presença de material orgânico ("filme condicionador"), o meio de crescimento e a disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH, produção de polissacarídeos extracelulares, presença das estruturas celulares, das propriedades físico-químicas (hidrofobicidade e carga superficial) tanto das superfícies de contato com os alimentos como das células, da hidrodinâmica e da comunicação célula a célula (DOUROU et al., 2011). Além disso, alguns estudos também demonstraram que as condições de cultura poderiam afetar a resistência dos biofilmes bacterianos aos agentes higiênicos (YANG et al., 2016).

A formação de biofilme é considerado um assunto de extrema importância em diversas áreas, na indústria alimentícia, sua presença torna as bactérias mais resistentes à temperatura e ao pH extremos, à dessecação, à radiação ultravioleta, ao estresse oxidativo e aos agentes desinfetantes, dificultando a remoção durante o procedimento de limpeza em plantas de processamento de alimentos, o que pode contribuir para a persistência de patógenos proporcionando o risco de contaminação

cruzada e contaminação pós-processamento (ANNOUS et al., 2009). Podendo causar deterioração do produto, perda da qualidade ou veiculação de patógenos (KASNOWSKI et al., 2010). Além disso, outros efeitos prejudiciais dos biofilmes envolve a deterioração do produto, a eficiência reduzida da produção, a corrosão, os odores desagradáveis, a bioincrustação e a falha de equipamento (NGUYEN et al., 2014).

3.4 FORMAS OU SUBSTÂNCIAS USADAS PARA COMBATER OU ELIMINAR BIOFILMES

O processo de higienização na indústria é dividido em duas etapas: Limpeza e sanitização. O objetivo da limpeza é remover os resíduos orgânicos e inorgânicos aderido às superfícies. O que não diminui de forma significativa o número de microorganismo, tornando assim indispensável o uso de sanitizantes. No Brasil, os sanitizantes utilizados pelas indústrias alimentícias em utensílios e em superfície de equipamentos são os com princípios ativos dos grupos: quartanário de amônio, compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo, compostos orgânicos liberadores de cloro ativo, compostos a base de ácido peracético, iodo e derivados. Na sanitização o tipo de equipamento e microorganismo a ser eliminado influencia na escolha do sanitizante (OLIVEIRA, et al. 2010).

Diversas pesquisas são realizadas com o proposito de reduzir o número de microorganismos aderidos a superfície, onde os sanitizantes químicos mostram uma boa redução do número de células aderidas. Mas além dos sanitizantes convencionais, estudos são realizados com óleos essenciais (OEs) (OLIVEIRA, et al. 2010) no qual possuem propriedades antibacterianas, onde os principais responsáveis por essa propriedade são os componentes fenólicos. Os compostos fenólicos como carvacrol, eugenol e timol estão presentes em uma alta porcentagem nos OEs que possuem propriedades antibacterianas mais fortes contra patógenos de origem alimentar. É coerente que o mecanismo de ação seja semelhante a outros fenólicos, essa ação geralmente é considerada como sendo a perturbação da membrana citoplasmática,

interrompendo a força motora do próton, fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo celular (BURT, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL

As análises foram realizadas nos laboratórios de apoio e de microbiologia (C004 e C006) do departamento de alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus de Campo Mourão (UTFPR-CM).

Os materiais utilizados nas análises foram todos da UTFPR-CM.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO DA POLPA DE BURITI

Para a realização deste trabalho foi utilizado extrato de *Mauritia flexuosa* (buriti), cuja as amostras de polpa foram adquiridas na cidade de Itapecuru-Mirim, Maranhão.

O procedimento para obtenção dos extratos foi realizado de acordo com (GALVÃO et al., 2008) com modificações, sendo dividido em quatro etapas: agitação, centrifugação, rotaevaporação e liofilização. A amostra de buriti adicionada de 50 mL de solvente ficou sob agitação a 16000 rpm por 20 minutos (Fisatom 713D), em banho-maria (Solab SL-154), conforme as condições estabelecidas na Tabela 1. Estas condições foram previamente determinadas em outro trabalho do nosso grupo de pesquisa. Posteriormente os extratos foram centrifugados a 6000 rpm por 5 minutos e, em seguida, rotaevaporados para separar o extrato do solvente (Tecnal TE-211). Em seguida, os extratos foram transferidos para tubos falcon e congelados em ultrafreezer (Liotop 0fr30) em temperatura de -77 °C. Os extratos foram então liofilizados para assim iniciar a avaliação antimicrobiana.

Tabela 1 – Condições para obtenção dos extratos da polpa de buriti.

Extrato	Polpa de buriti (g)	Etanol (% em 50 ml)	Temperatura (°C)
1	4,02	54,87	62
2	2,5	40	50

4.3 CULTURAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O estudo foi conduzido com isolados de *S. enterica* Typhimurium ATCC 14028 e *S. aureus* ATCC 25923, estocados em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) com 20% de glicerol a -20 °C, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá.

Salmonella Typhimurium ATCC 14028 foi cultivada em Agar Hektoen Entérico (Difco ®) a 35 °C por 24 horas e *S. aureus* ATCC 25923 em Agar Baird Parker (Difco ®) a 35 °C por 48 horas.

4.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIES DE POLIESTIRENO

A formação de biofilme foi realizada de acordo com Amaral et al. (2015) com modificações. Primeiramente, uma cultura *overnight* de cada microrganismo foi diluída a 1:100 em caldo de soja tríptico (TSB, Difco) para se obter um inóculo com aproximadamente 10^7 UFC/mL, 150 µL do inóculo foi adicionado aos poços de microplaca de 96 poços de poliestireno, em seguida a microplaca foi incubada a 37°C durante 24 h.

4.5 EFEITO DO BURITI EM BIOFILMES FORMADOS

Para avaliar os efeitos do extrato de buriti em biofilmes formados de *S. Typhimurium* e *S. aureus* foi utilizada a metodologia descrita por Amaral et al. (2015) com modificações. Os biofilmes foram tratados com extrato de buriti nas concentrações de 1 x CIM e 2 x CIM (dados já obtidos pelo grupo de pesquisa), ou seja, para *S. aureus* foram utilizadas concentrações de 21 µg/mL e 42 µg/mL e, para *S. Typhimurium* de 37 µg/mL e 74 µg/mL. Após a formação de biofilme em microplaca de 96 poços durante 24 h, os conteúdos dos poços foram aspirados, lavados solução salina estéril a 0,85%, para remoção de células não aderidas e tratados com 200 µL do extrato de buriti por 1, 3, 6 e 12 horas em temperatura ambiente. Após os tratamentos os poços foram lavados com solução salina estéril a 0,85% e submetidos a banho de ultrassom a 25 Hz por 5 min (Cristofoli). Com conteúdo de cada poço foram então realizadas diluições em série em solução salina estéril a 0,85%, plaqueadas em ágar Mueller Hinton (MHA, Difco) e incubadas a 37°C durante 24 h, os resultados foram expressos como Log UFC/cm². O controle positivo foi feito com caldo TSB estéril.

4.6 EFEITO DO BURITI SOBRE BIOFILMES EM FORMAÇÃO

Para avaliar os efeitos do extrato de buriti em biofilmes em formação de *S. Typhimurium* e *S. aureus* foi utilizada a metodologia descrita por Amaral et al. (2015) com modificações, usando o extrato de buriti em concentração sub-inibitória (1/2xCIM), 10,5 µg/mL para *S. aureus* e 18,5 µg/mL para *S. Typhimurium*. Em microplaca de 96 poços estéril foi adicionado 150 µL do extrato diluído em caldo TSB, seguido do inóculo bacteriano na concentração de 10⁷ UFC/mL. A microplaca foi então incubada a 37°C durante 24 h. Após o tratamento os poços foram lavados com solução salina estéril a 0,85% e submetidos a banho de ultrassom a 25 Hz por 5 min (Cristofoli). Com conteúdo

de cada poço foram então realizadas diluições em série em solução salina estéril a 0,85%, plaqueadas em ágar Mueller Hinton (MHA, Difco) e incubadas a 37°C durante 24 h, os resultados foram expressos como Log UFC/cm². O controle positivo foi feito com caldo TSB estéril.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicata com duas repetições independentes. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de 5 % de significância, e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, através do programa estatístico GraphpadPrism 5.01.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante a avaliação da ação antibiofilme do extrato de buriti em biofilmes formado de *S. aureus* encontram-se na Tabela 2. É possível observar que a concentração mais elevada combinada com um tempo de contato maior apresentou melhores resultados. Os biofilmes tratados com 1xCIM e 2xCIM durante 12 horas apresentaram redução significativa nas contagens em relação ao controle, bem como entre si. Com o tempo de 6 horas de contato foi possível observar um comportamento semelhante, porém com uma inibição reduzida, comparado ao de 12 horas. Os biofilmes tratados por 3 horas apresentaram diferença significativa em relação ao controle, mas não diferenciaram entre si, já para o tratamento de 1 hora nenhuma das concentrações apresentaram diferença significativa.

Tabela 2 – Resultados do biofilme de *S. aureus* tratado após 24 horas de formação com extrato de buriti nas concentrações de 1xCIM e 2xCIM.

Amostras	Tempo de tratamento (horas)			
	1	3	6	12
Controle	8,755 ±0,1909 ^A	8,785 ±0,1344 ^A	8,860 ±0,0283 ^A	8,78 ±0,0283 ^A
1xCIM	8,625 ±0,2758 ^A	8,495 ±0,0919 ^B	8,210 ±0,0283 ^B	7,67 ±0,0141 ^B
2xCIM	8,980 ±0,1556 ^A	8,130 ±0,0566 ^B	7,890 ±0,0141 ^C	6,845 ±0,0212 ^C

Resultados expressos como média Log UFC/mL ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$; teste de Tukey).

Os resultados encontrados durante a avaliação do efeito de diferentes concentrações do extrato de buriti em biofilmes formado de *S. Typhimurium* estão descritos na Tabela 3. Foi possível observar que a *S. Typhimurium* apresentou um comportamento semelhante ao *S. aureus* frente aos extratos de buriti. Para o tempo de 12 horas houve uma redução significativa dos tratamentos em relação ao controle e dos

tratamentos entre si, entretanto para o tempo de 6 horas observou-se diferença significativa nas contagens somente entre os grupos tratados com o controle. Já para os tratamentos com três e uma hora não tiveram inibição significativa tanto para 1xCIM como para 2xCIM.

Tabela 3 – Resultados do biofilme de *S. Typhimurium* tratado após 24 horas de formação com extrato de buriti nas concentrações de 1xCIM e 2XCIM.

Amostras	Tempo de tratamento (horas)			
	1	3	6	12
Controle	8,74 ±0,2404 ^A	8,675 ±0,0212 ^A	8,665 ±0,0070 ^A	8,69 ±0,0141 ^A
1 CIM	8,590 ±0,1979 ^A	8,595 ±0,0071 ^A	7,910 ±0,0565 ^B	7,88 ±0,0142 ^B
2 CIM	8,675 ±0,0212 ^A	8,630 ±0,0141 ^A	7,720 ±0,707 ^B	6,805 ±0,0353 ^C

Os valores estão expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam que os valores diferem significativamente ($p < 0,05$; teste de Tukey).

Para o biofilme tratado durante sua formação também foi possível observar redução significativa nas contagens tanto para *S. aureus* quanto para *S. Typhimurium*, como mostra Figura 1. Para ambas as bactérias se observou redução de mais de um Log UFC/cm² entre o controle e o biofilme tratado com extrato de buriti, indicando que o extrato da polpa de buriti tem ação na inibição da formação de biofilme bacteriano.

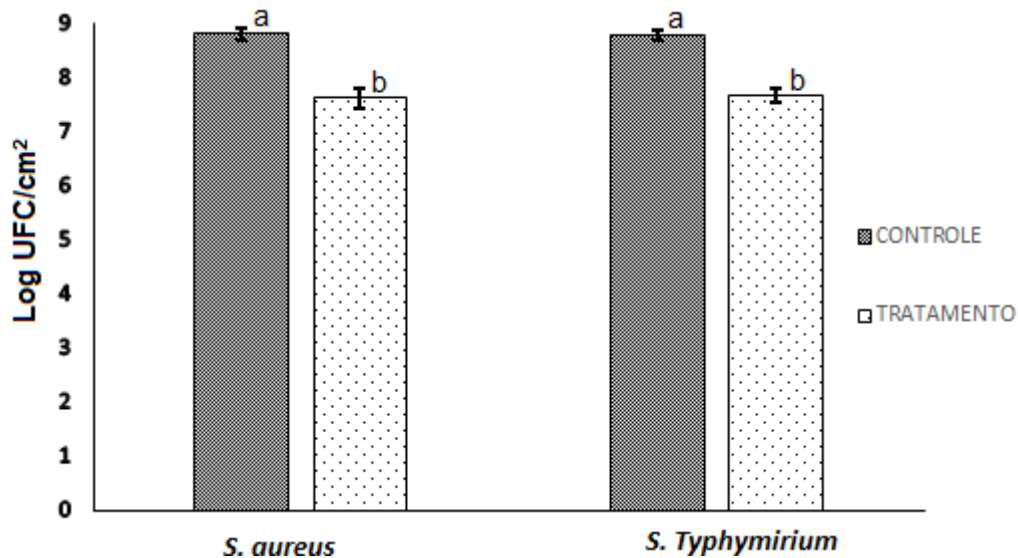


Figura 3 – Contagem em Log UFC/cm² das células viáveis do biofilme de *S. aureus* e *S. Typhimurium* após ser tratado com extrato de buriti na concentração de 1/2xCIM durante sua formação. Valores expressos em média e barras indicam desvio padrão. Letras diferentes entre colunas de uma mesma bactéria indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Koolen et al. (2013) Obtiveram redução de 4 log UFC/cm² com 200 µg/ml utilizando extrato do fruto de buriti . trabalharam com o extrato do fruto de buriti e obteve redução de 4 Log UFC/cm² com 200 µg/ml. Enquanto no presente trabalho, o extrato apresentou redução de aproximadamente 1 Log UFC/cm² utilizando concentrações de 21 µg/ml para *S. aureus* e 37 µg/ml para *S. Typhimurium*. Portanto é possível observar que mesmo com concentrações menores que a do estudo citado, obteve-se boa ação antibacteriana e antibiofilme.

Estudos que investigam a ação de OEs inteiros contra organismos de deterioração de alimentos e patógenos de alimentos na sua maioria concordam que, geralmente, os OEs são ligeiramente mais ativos contra bactérias gram-positivas que gram-negativas. É provável que os organismos gram-negativos sejam menos suscetíveis à ação de antibacterianos, em razão de possuírem uma membrana externa ao redor da parede celular, que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através de sua cobertura de lipopolissacarídeo (BURT, 2004)

Sabe-se que a atividade antibacteriana de produtos de origem vegetal é mais intensa sobre bactérias gram-positivas do que sobre gram-negativas, entretanto Batista et al. (2011) verificou que o óleo do buriti mostrou atividade antibacteriana contra

ambos os grupos, sugerindo que esta planta apresenta atividade inibitória de amplo espectro, assim como demonstrado neste trabalho.

Koolen et al. (2013) observou que o extrato do fruto de buriti apresentou uma quantidade de composto fenólicos totais de 378,7 mg GAEq/100g o que justifica a boa atividade antibacteriana do extrato de buriti, uma vez que sabe-se que plantas com altos teores de compostos fenólicos também apresentam uma boa atividade antibacteriana (NOSTRO et al., 2017).

Até onde tivemos conhecimento não existe trabalhos que determinam a ação antibiofilme do extrato de buriti contra *S. aureus* e *S. Typhimurium*. Amaral et al. (2015) observaram uma redução igual a 2 log no biofilme de *S. Typhimurium* tratado com 78 µg/ml de carvacrol e uma redução igual a 1 log quando tratado com 156 µg/ml de timol demonstrando uma redução similar com o observado neste trabalho. Jia et al. (2011) observaram uma redução de 2 log no biofilme de *S. aureus* tratado com 62,5 µl/ml cinamaldeído. Apesar de serem substâncias diferentes é possível observar que a redução encontrada no extrato de buriti está de acordo com o observado de outras substancias naturais que tendem a ter uma ação antibiofilme menos efetiva.

6. CONCLUSÃO

Com o presente trabalho pode-se concluir que o extrato da polpa de buriti reduz a formação, bem como biofilmes já formados de *S. aureus* e *S. Typhimuirum* em poliestireno, entretanto ele não foi capaz de eliminar completamente as células aderidas, sugerindo que seu uso pode ser uma alternativa adjunta a outros métodos no controle do biofilme bacteriano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P. de; SILVA, J. A. da. **Piqui e buriti –** Importância alimentar para a população dos cerrado. Planaltina: EMBRAPA, 1994. 38 p. Disponível em <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/548665/1/doc54.pdf>> Acesso: 5 de mai. 2018.

ARAÚJO, M. F. L.; SANTOS, A. S. dos; PANTOJA L. de A. **Caracterização química e física de frutos de buriti (Mauritia flexuosa L.).** Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/65ra/resumos/resumos/9469.htm>>. Acesso: 5 de mai. 2018.

AMARAL, V. C. S. et al. Effect of carvacrol and thymol on Salmonella spp. Biofilms on polypropylene. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 5, 2015.

BATISTA, J. S.; OLINDA, R. G.; MEDEIROS, V. B. et al. **Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti Mauritia flexuosa L.** Ciência Rural, Santa Maria, v.42, n.1, p.136-141, jan. de 2012

BARROS, T. D.; JARDINE, J. G.; **Buriti.** In: EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fbl23vmz02wx5eo0sawqe3flbr6im.html>>. Acesso: 5 mai. 2018.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, n.94, p. 223– 253, 2004.

CDC, 2016. CDC and Food Safety. Centers for Disease Control and Prevention. Saúde, M.d., 2016. **Surtos de Doenças Transmitida por Alimentos no Brasil.** Governo Federal.

CABRAL, K. Paramazônia. **Buriti.** Disponível em: <<http://portalparamazonia.blogspot.com/2016/01/buriti.html>> Acesso: 25 de junho de 2018.

CYMERYS, M. et al. **Frutíferas e Plantas Úteis na vida Amazônica.** p. 187-194. Belém, 2005.

DOUROU, D. et al. Attachment and biofilm formation by Escherichia coli O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. **International Journal of Food Microbiology**, n.149, p. 262–268, jul. 2011.

FRANCO, B. D. G. de M. **Microbiologia dos Alimentos.** 2 ed. São Paulo: Atheneu. p. 43-60, 2008.

FRANK, J. (2001). Microbial attachment to food and food contact surfaces. **Advances in Food and Nutrition Research**, 43, 319e370.

JIA, P. et al. Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**. p. 409-416, 2011.

KASNOWSKI, M. C. et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, n.15, 23 p, Jul. de 2010.

KOOLEN, H. H. F. et al. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, n 51, p. 467–473, 2013.

OLIVEIRA, A. I. T. de. et al. In vitro antimicrobial activity and fatty acid composition through gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of ethanol extracts of *Mauritia flexuosa* (Buriti) fruits. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.11, p. 635-641, out. de 2017.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Microbial biofilms in the food industry: a review. **Rev Inst Adolfo Lutz**. Sao Paulo, 2010; 69(3):277-284.

LANZA, Juliana. **Surtos Alimentares no Brasil**. In: food safety brazil. Disponível em: <<https://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-maio-de-2017/>> Acesso: 5 de mai. 2018.

MACÊDO, J. A. B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação das indústria de farmacêutica. **Revista fármacos e medicamentos**, V. 2, n. 7, p 19-24 Nov/Dez de 2000.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, v. 68, p.337-348, 1971.

MELO, P. C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina**. 2008, 103f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2008.

NOSTRO, A. et al. Effects of adaptation to carvacrol on *Staphylococcus aureus* in the planktonic and biofilm phases. **Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, 18 mai. 2017.

NGUYEN, H.D.N.; YUK, H.G. Changes in resistance of *Salmonella Typhimurium* biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. **J. Food Control**. n. 29, p. 236e240. 2013.

NGUYEN, H.D.N.; YANG, Y.S.; YUK, H.G. Biofilm formation of Salmonella Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. **LWT - Food Science and Technology**. n. 55, p. 383 e 38. 2014.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência**. 57 f. – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

PIOVEZAN, M. et al. Effect of cinnamon essential oil and cinnamaldehyde on Salmonella Saintpaul biofilm on a stainless steel surface. **Journal General Applied Microbiol.**, n. 60, p. 119-121, 2014.

SANTOS, S. S. dos. **Investigação da presença e da formação de biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite**. 76f. Dissertação (mestrado – Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP. Jaboticabal, 2009.

UFRJ, 2012. Buriti: **Um fruto em potencial de proteção à saúde**. Disponível em: <<http://bromatopesquisas-ufrj.blogspot.com.br/2012/04/buriti-um-fruto-em-potencial.html>>. Acesso em: 6 de mai. de 2018.

WICHINIESKI, J. Z.I. **Cerrado do Oeste da Bahia, com fontes de água e buritizais**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/natureza/blog/nova-etica-social/post/campanha-quer-por-holofotes-sobre-o-cerrado-que-ja-tem-mais-da-metade-de-seu-territorio-destruido.html>> Acesso: 25 de junho de 2018.

YANG, Y. et al. Biofilm formation of Salmonella Enteritidis under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. **Food Microbiology**, n. 54, p. 98 e 105, 2016.

CABRAL, K. Paramazônia. **Buriti**. Disponível em: <<http://portalparamazonia.blogspot.com/2016/01/buriti.html>> Acesso: 25 de junho de 2018.