

ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE RESÍDUO DE JABUTICABA

N. Fleck¹, W.C. Oliveira², F.F. Veras³, A. Brandelli⁴, V. Sant'Anna⁵

1-Área da Vida e Meio Ambiente – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Campus Encantado - CEP: 95960-000 – Encantado – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3751-3376 – Fax: 55 (51) 3751-3376 – e-mail: (nataisfleck@gmail.com)

2 – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Riograndense, Campus Lajeado, CEP: - Lajeado – RS, Brasil, Telefone: 55 (33) 9106-4966 – e-mail: wemersoncb@yahoo.com.br

3-Departamento de Ciência de Alimentos – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul- CEP: 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-6249 – Fax: 55 (51) 3308-7048 – e-mail: (ffveras@yahoo.com.br)

4-Departamento de Ciência de Alimentos – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul- CEP: 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-6249 – Fax: 55 (51) 3308-7048 – e-mail: (abrand@ufrgs.br)

5-Área da Vida e Meio Ambiente – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Campus Encantado - CEP: 95960-000 – Encantado – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3751-3376 – Fax: 55 (51) 3751-3376 – e-mail: (voltaire-santanna@uergs.edu.br)

RESUMO – Cascas de jabuticaba são fontes promissoras de compostos bioativos a serem utilizados na indústria de alimentos, sendo sua capacidade antimicrobiana ainda pouco explorada. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de extrato aquoso de casca de jabuticaba frente a bactérias e fungos patogênicos. Os resultados mostraram que o extrato é capaz de inibir *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia.coli*, com atividade de 125±35 unidades arbitrárias por mL (UA/mL), 175±35 UA/mL, 175±35 UA/mL, 200±0 UA/mL, respectivamente. Ao avaliar o efeito do extrato sobre *S. aureus*, os resultados indicam que há ação bacteriolítica dos compostos do extrato sobre esta bactéria patogênica. O extrato não apresentou atividade antifúngica. Assim, os resultados indicam que extrato de casca de jabuticaba apresenta um interessante potencial para ser utilizado como antibacteriano natural para aplicações em alimentos.

ABSTRACT – Jabuticaba skins are promising sources of bioactive compounds to be used in the food industry, but their antimicrobial capacity is still little explored. The objective of the present work was to evaluate the antimicrobial activity of jabuticaba skin aqueous extract against pathogenic bacteria and fungi. The results show that the extract was capable of inhibiting *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*, presenting activity of 125 ± 35 arbitrary units per mL (AU/mL), 175 ± 35 AU/mL, 175 ± 35 AU/mL, 200 ± 0 AU/mL, respectively. There was no antifungal activity of the extract. During the evaluation of the extract on *S. aureus*, a bacteriolytic effect of the extract compounds on this pathogenic bacterium was observed. Thus, the results indicate that jabuticaba skin extract has an interesting potential to be used as a natural antimicrobial for food applications.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobianos naturais, polifenóis, jabuticaba, resíduos.

KEYWORDS: Natural antimicrobials, polyphenols, jabuticaba, residues.

1. INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos seguros para o consumo e com maior vida de prateleira, somado ao aumento da resistência de micro-organismos a antimicrobianos convencionais, têm alavancado esforços na área de ciência e tecnologia de alimentos a novas formas de combater micro-organismos patogênicos e aumentar sua vida útil. Neste contexto, a busca por substâncias que possam ser utilizadas como conservantes alimentares, não-tóxicas e que não interfiram nas características organolépticas dos produtos finais são preocupação constante (Rice, 2006; Fuentes et al., 2014).

Compostos fenólicos são componentes bioativos largamente encontrados em plantas, que apresentam reconhecida capacidade antioxidante, característica amplamente estudada por auxiliar na prevenção de inúmeras doenças em humanos (Leifert e Abeywardena, 2008). Contudo, estes compostos apresentam outras atividades importantes para a indústria de alimentos como evitar a oxidação lipídica (Ganhão et al., 2011) e evitar o escurecimento enzimático (Nirmal e Benjakul, 2010). Outra propriedade que vem ganhando atenção é sua capacidade de inibir e inativar micro-organismos.

Pertencente à família Myrtaceae, *Myrciaria cauliflora*, a jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba* (Vell.) Berg) é uma fruta rica em antocianina do sudeste do Brasil, e de grande interesse nutricional, pois é fonte de polifenóis, vitaminas, minerais e compostos antioxidantes naturais (Wu et al., 2013). Santos et al. (2010) observou concentração de polifenóis totais de cerca de 25 mg de ácido gálico equivalente por grama de casca de jabuticaba seca e de cerca de 5 mg de cianidina 3-glucosídeo por grama de casca de jabuticaba seca, sendo que o extrato do resíduo apresentou maior atividade antioxidante que β -caroteno e BHT. Esses resultados indicam que casca de jabuticaba pode ser uma importante fonte de compostos bioativos para uso na indústria de alimentos.

Visto que é uma das frutíferas que tem despertado grande interesse dos produtores rurais, devido sua alta produtividade e aproveitamento nos mais variados subprodutos. A fruta pode ser utilizada para produção de licores, geleias e fermentados e ainda para consumo *in natura* (Silva et al., 2008).

Os extratos vegetais de resíduos têm grande potencial para serem utilizados como inibidores de micro-organismos na indústria de alimentos, e é uma grande tendência em pesquisas na área de alimentos. Desta forma, estudar alternativas práticas de aplicação desses compostos em alimentos é tema de grande relevância científica e tecnológica. Assim, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de extrato aquoso de cascas de jabuticaba.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As cascas de jabuticaba foram adquiridas de agroindústrias da região do Vale do Taquari. As cascas foram liofilizadas em equipamento específico, o material foi triturado em moinho de facas e armazenado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ao abrigo da luz até sua utilização. A extração de compostos com atividade antimicrobiana foi procedida em água destilada fervente por 10 minutos e razão volume de água e cascas foi de 2:1 (volume/massa) (Caxambú et al., 2016).

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em ágar, em que 10^8 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579, *Listeria monocytogenes* ATCC7644, e *Escherichia coli* ATCC25922, a partir de um cultivo em extrato de levedura por 18h à 37°C , foram espalhadas uniformemente sobre Plate Count Agar e confrontadas a $20\ \mu\text{L}$ do extrato. As placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, sendo a presença de halos indicativa

da presença de atividade antimicrobiana (Kimura *et al.*, 1998). A quantificação da atividade antimicrobiana dos extratos foi determinada pelo método da diluição seriada, sendo a atividade definida como sendo a recíproca da última diluição com zona de inibição e expressa em unidades arbitrárias por mililitro (UA/mL), de acordo com Mayr-Harting *et al.* (1972). Para o teste de inibição do crescimento fúngico, a metodologia empregada está descrita em Venturoso *et al.* (2011) e Motta e Brandelli (2002) para fungos filamentosos de leveduras, respectivamente. Suspensões de 10^6 esporos por mL de *Aspergillus flavus* A12, *Aspergillus niger* IFL5, *Aspergillus carbonarius* ITAL293 e *Penicillium citrinum* ITAL197 foram adicionados à Ágar Batata Dextrose (BDA) e contrastadas com 20 μ L de extrato. A atividade contra as leveduras *Candida albicans* ATCC 18804, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *Pichia* sp. foi realizada após preparo de suspensão de células (10^8 UFC/mL) em solução salina (9 g/L NaCl). As células foram inoculadas com *swab* em placas contendo BDA antes da aplicação do extrato. Zonas de inibição foram avaliadas após 7 dias de incubação a 25 °C para fungos filamentosos e 48 h a 30 °C para as leveduras.

A avaliação do modo de ação ocorreu frente à cultura de 10^6 UFC/mL de *S. aureus* em 2% (m/v) de extrato de levedura, cultivada a 37 °C, sendo a adição do extrato de jabuticaba, na concentração final de 10 g/L, adicionado após 2 h do cultivo (Motta *et al.*, 2007). Solução salina foi utilizada com controle. A contagem de células viáveis e absorbância a 600 nm foram monitoradas a cada 90 minutos, realizando a diluição do meio de cultura quando necessário para conformidade das leituras com a Lei de Lambert-Beer.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise da atividade antibacteriana do extrato aquoso de casca de jabuticaba mostraram inibição do crescimento de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli*, com formação de halos de 1,4 \pm 0,1 cm, 1,75 \pm 0,4 cm, 1,1 \pm 0,1 cm e 1,1 \pm 0,1 cm, respectivamente. O extrato aquoso apresentou atividade de 125 \pm 35 UA/mL, 175 \pm 35 UA/mL, 175 \pm 35 UA/mL e 200 \pm 0 UA/mL, respectivamente, frente a *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli*. Esses dados mostram o potencial de componentes hidrossolúveis do resíduo da jabuticaba para serem utilizados como agente antimicrobiano. A atividade antimicrobiana de frutas que contém antocianinas provavelmente é causada por múltiplos mecanismos e sinergismos, pois contém vários compostos, incluindo antocianinas, ácidos orgânicos fracos, ácidos fenólicos e suas misturas em diferentes formas químicas (Cisowska *et al.*, 2011).

Em relação à atividade antifúngica, os resultados mostram que não houve halo de inibição no crescimento dos fungos testados, indicando ausência da atividade nos extratos. Resultados similares foram encontrados para resíduo de casca de noz pecã (Caxambú *et al.*, 2016) e borra de café (Sant'Anna *et al.*, 2017) nas mesmas condições de extração testadas. Esses resultados podem ser creditados ao fato de compostos com tal capacidade não estarem em concentração suficiente no extrato ou, também, devido a alguns fungos como *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. apresentarem capacidade de crescimento na presença de taninos e seus monômeros e dímeros, inclusive utilizando estes compostos como fonte de carbono (Scalbert, 1991).

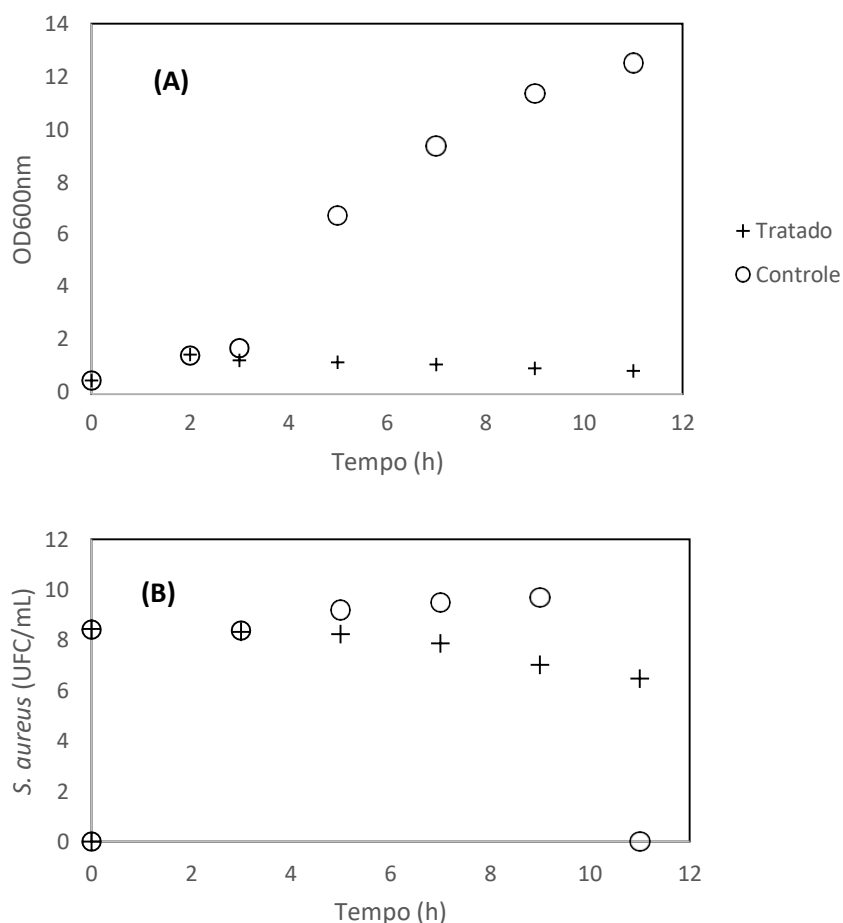
A Figura 1 mostra o efeito do extrato da casca de jabuticaba sobre *S. aureus*. Os resultados da turbidez do meio de cultivo (Figura 1A) mostram um curto período de adaptação da bactéria, seguido de crescimento exponencial e alcance da fase estacionária ao final das 11 h de cultivo. O uso do extrato de casca da fruta inibiu essa fase exponencial de crescimento da bactéria.

A adição do agente antibacteriano na suspensão de células de *S. aureus* na fase exponencial de crescimento, resultou em redução da contagem de células viáveis (Figura 1B) assim como da turbidez do meio (Figura 1A) ao longo das 11 h de cultivo. Esses resultados indicam que há ação bacteriolítica dos compostos do

extrato sobre a bactéria patogênica (Motta et al., 2007). Lacombe et al. (2010) observou que fenólicos e antocianinas de oxicoco inativam *E. coli* através de desintegração da membrana externa da célula. Em outro estudo, Nohynek et al. (2006) propuseram que compostos fenólicos têm sua atividade antimicrobiana em bactérias Gram-negativas pelo poder quelante de cátions divalentes de suas membranas externas. Em bactérias Gram-positivas, acredita-se que taninos podem reagir e inibir a biossíntese com componentes da parede celular (Jones et al., 1994).

Ressalta-se que a extração foi realizada com água em ebulição, e por isso inúmeros compostos podem ter sido extraídos além de compostos fenólicos. Por isso, indica-se a necessidade da continuação do projeto para avaliar o perfil de compostos no extrato com a finalidade de caracterizar seu perfil de compostos e avaliar quais apresentam atividade antimicrobiana.

Figura 1. Curvas de crescimento de *Staphylococcus aureus* em presença de extrato aquoso de casca de jaboticaba (+) e salina (o). A concentração celular foi estimada por medição da OD a 600nm (A) e contagem de células viáveis (B).



4. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que o extrato aquoso de casca de jaboticaba apresenta um interessante potencial para ser utilizado como antimicrobiano natural para aplicações em alimentos, uma vez que

possui a capacidade de inibir o crescimento de importantes bactérias patogênicas de alimentos. Mais estudos são necessários para o adequado uso deste antimicrobiano em alimentos, mas os resultados iniciais são promissores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Caxambú, S., Biondo, E., Kolchinski, E.M., Lappe, R., Brandelli, A., & Sant'Anna, V. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell aqueous extract on minimally processed lettuce leaves. *Food Science and Technology (Campinas)*, 36, 42-45.
- Cisowska, A., Wojnicz, D., & Hendrich, A. (2011). Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Natural Product Communication*. 6(1), 149-156.
- Fuentes, M.A.F.; Morente, E.O.M.; Abriouel, H.; Pulido, R.P.; Gálvez, A. (2014) Antimicrobial resistance determinants in antibiotic and biocide-resistant Gram-negative bacteria from organic foods. *Food Control*, 37, 9-14.
- Ganhão, R., Estévez, M., & Morcuende, D. (2011). Suitability of the TBA method of assessing lipid oxidation in a meat system with added phenolic-rich material. *Food Chemistry*, 126(2), 772-778.
- Janissen, Brendan; Huynh, Tien; (2018) Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resources Conservation and recycling*. V.128, p. 110-117.
- Jones, G.A., McAllister, T.A., Muir, A.D., & Cheng, K-J. (1994). Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 1374-8.
- Khorshidian, N., Yousefi, M., Khanniri, E., & Mortazavian, A.M. (2018). Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45, 62-72.
- Kim, J.M., Marshall, M.R., Cornell, J.A., Preston, J.F., & Wei, C.I. (1995). Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*, 60, 1364-1374.
- Kimura, H., Sashihara, T., Matsusaki, H., Sonomoto, K., & Ishizaki (1998). Novel bacteriocin of *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. *Annals New York Academy of Sciences*, New York, v.864.
- Lacombe, A., Wu, V.C.H., Tyler, S., & Edwards, K. (2010). Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 102-107.
- Leifert, W.R., & Abeywardena, M.Y. (2008). Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research*, 28(11), 729-737.
- Mayr-Harting, A., Hedjes, A.J., & Berkeley, C.W. (1972). Methods For Studying Bacteriocins. In: Norris, J.R.; Ribbons, D.W. (Ed.). *Methods in microbiology*, New York, Academic Press, 7.
- Motta, A.S., & Brandelli, A. (2002) Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 63-71.
- Motta, A. S., Lorenzini, Daniel, & Brandelli, A. (2007). Purification and partial characterization of an antibacterial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. strain isolated from Amazon basin. *Current Microbiology*, 54, 282-286.
- Nirmal, N.P., & Benjakul, S. (2010). Effect of green tea extract in combination with ascorbic acid on the retardation of melanosis and quality changes of pacific White shrimp during iced storage. *Food and Bioprocess Technology*, 5(8), 2941-2951.



- Nohynek, L.J., Alakomi, H.L., Kähkönen, M.P., Heinone, M., Helander, I.M., Oksman-Caldentey, & Puupponen-Pimiä, R. (2006). Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*, 54, 18–32.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007) 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*, 18, 414-420.
- Pugliese, A. G., Tomas-Barberan, F. A., Truchado, P., & Genovese, M. I. (2013). Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(11), 2720-2728.
- Rice, L.B. (2006) Antimicrobial resistance in Gram-positive Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119, (6), S11-S19.
- Sant'anna, V., Biondo, E., Kolchinski, E.M., Silva, L.F.S., Corrêa, A.P.F., Bach, E., & Brandelli, A. (2017). Total Polyphenols, Antioxidant, Antimicrobial and Allelopathic Activities of Spend Coffee Ground Aqueous Extract. *Waste and Biomass Valorization*, 8(2), 439-442.
- Santos, D.T., Veggi, P.C., & Meireles, M.A.A. (2010). Extraction of antioxidante compounds from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: yield, composition and economical evaluation. *Journal of Food Engineering*, 101, 23-31.
- Scalbert, A. (1991) Antimicrobial Properties Of Tannins. *Phytochemistry*, Chichester, V.30, N.12, P.3875-3883.
- Silva, Paulo Henrique Alves; Faria, Fernanda Carolina; Tonon, Bruno; Mota, Saulo José Dornelas; Pinto, Vitor Tensol (2008). Avaliação da composição química de fermentados alcoólicos de jabuticaba (*myrciaria jabuticaba*) *Quim. Nova*, 31(3), 595-600.
- Venturoso, L.R., Bacchi, L.M.A., Gavassoni, W.L., Conus, L.A., Pontim, B.C.A., & Bergamin, A.C. (2011) Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. *Summa Phytopath.* 37, 18-23.
- Wu, S.-B., Long, C., & Kennelly, E. J. (2013). Phytochemistry and health benefits of jabuticaba, an emerging fruit crop from Brazil. *Food Research International*, 54, 148-159.