

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS AQUOSOS DE BAGAÇOS DE MIRTILO E DE UVA

N. Fleck<sup>1</sup>, W.C. Oliveira<sup>2</sup>, F.F. Veras<sup>3</sup>, A. Brandelli<sup>4</sup>, V. Sant'Anna<sup>5</sup>

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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto:voltaire-santanna@uergs.edu.br)

**RESUMO** – A busca por antimicrobianos naturais tem levado a novos estudos com a utilização de resíduos da indústria de alimentos como fonte de agentes com capacidade de inibir bactérias e fungos patogênicos. O Rio Grande do Sul se destaca pela produção de uvas e mirtilos, sendo que o resíduo gerado do seu processamento apresenta importante fonte de compostos bioativos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial antimicrobiano dos resíduos destas frutas contra micro-organismos de interesse alimentar. Os resultados mostram que o extrato de casca de mirtilo apresenta atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, mas não tem a capacidade de inibir *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. A atividade encontrada para a inibição de *B. cereus* foi de  $150 \pm 50$  UA/mL. O extrato aquoso de resíduo de uva não foi capaz de inibir nenhuma das bactérias testadas. Nenhum dos resíduos apresentou atividade contra fungos filamentosos ou leveduras.

**ABSTRACT** – The search for natural antimicrobials has led to new studies with the use of residues from the food industry as a source of agents capable of inhibiting pathogenic bacteria and fungi. Rio Grande do Sul stands out for the production of grapes and blueberries, and the waste generated from its processing presents an important source of bioactive compounds. Thus, the objective of this work was to verify the antimicrobial potential of the residues of these fruits against microorganisms of food interest. The results show that the blueberry extract has antibacterial activity against *Bacillus cereus*, but does not have the ability to inhibit *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. The activity found for the inhibition of *B. cereus* was  $150 \pm 50$  AU/mL. The aqueous extract of grape residue was not able to inhibit any of the tested bacteria. None of the residues showed activity against filamentous fungi or yeasts.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antimicrobianos naturais, resíduos, mirtilo, uva.

**KEYWORDS:** Natural Antimicrobials, residues, blueberry, grape.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos são uma grande preocupação para os consumidores, autoridades das indústrias e de saúde pública. Nos últimos anos, foi realizado um grande esforço para encontrar antimicrobianos naturais que podem inibir crescimento bacteriano e fúngico nos alimentos, a fim de melhorar a qualidade e aumentar a vida de prateleira. Da mesma forma, temos mais consumidores conscientizados e preocupados com a ingestão de conservantes sintéticos usados em alimentos em virtude do potencial impacto negativo dos conservantes na saúde e ainda benefícios dos aditivos naturais. Como resultado, há crescente demanda por produtos naturais que podem servir como alternativa para conservantes de alimentos (Tajkarimi et al., 2010).

O Brasil é um grande produtor de uva e o cultivo de mirtilo tem se destacado principalmente no sul do país. O processamento dessas frutas gera anualmente grandes volumes de resíduos sólidos orgânicos, que atualmente são destinados à compostagem ou alimentação animal, o que, dados da literatura, indicam ser um destino não-nobre, devido a suas grandes potencialidades de uso na indústria de alimentos e farmacêutica. Além disso, a utilização desses resíduos pode reduzir o impacto ambiental e agregar valor à toda a cadeia produtiva (Janissen e Huynh, 2018).

Estudos demonstram que resíduos sólidos orgânicos da indústria de alimentos podem ser importantes fontes de compostos com capacidade de inibir o crescimento de fungos e bactérias patogênicos (Lacombe et al., 2010; Cisowska et al., 2011; Caxambú et al., 2016), apesar de mais estudos serem necessários para a sua utilização em larga escala. Assim, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de extrato aquoso de cascas de mirtilo e uva.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As cascas de uva e mirtilo foram adquiridas de agroindústrias da região do Vale do Taquari. Os resíduos utilizados foram coletados logo após o processo de extração de seu suco e levados imediatamente em sacos plásticos para congelamento à  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As cascas foram descongeladas à temperatura de refrigeração, secas a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , trituradas em moinho de facas e então armazenadas 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 a razão volume de água e cascas foi de 2:1 (volume/massa) (Caxambú et al., 2016).

A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita pelo método de difusão em ágar (Kimura et al., 1998). Foram feitas suspensões de *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579, *Listeria monocytogenes* ATCC7644, e *Escherichia coli* ATCC25922 em solução de cloreto de sódio 0,85% (m/v) e padronizadas em  $10^8$  unidades formadoras de colônias por mililitro de cada cultura bacteriana e espalhadas uniformemente sobre Plate Count Agar. Alíquota de  $20\text{ }\mu\text{L}$  do extrato foi aplicada sobre o ágar e as placas foram incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h, sendo a presença de halos indicativa da ocorrência de atividade antimicrobiana. A quantificação da atividade antimicrobiana dos extratos foi determinada pelo método da diluição seriada modificada. Os extratos foram diluídos na razão 1:1 (v/v) serialmente (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) em solução salina, sendo cada diluição avaliada quanto a sua atividade antimicrobiana como descrito acima. A atividade foi 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).

Os extratos também foram testados contra fungos filamentosos (*Aspergillus flavus* A12, *Aspergillus niger* IFL5, *Aspergillus carbonarius* ITAL293 e *Penicillium citrinum* ITAL197) e leveduras (*Candida albicans* ATCC 18804, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *Pichia* sp.). Alíquotas de 20 µL dos extratos foram depositados sobre placas contendo Ágar Batata Dextrose, previamente semeadas com 10<sup>6</sup> esporos/mL para cada fungo filamentoso ou 10<sup>8</sup> UFC/mL de leveduras (Motta e Brandelli, 2002; Venturoso et al., 2011). Zonas de inibição, após cultivo por 7 dias a 25 °C para fungos filamentosos e após 48 h a 30 °C para as leveduras, foram consideradas indicativos de atividade antifúngica.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para a avaliação da atividade antibacteriana são mostrados na Tabela 1. O extrato aquoso de casca de mirtilo apresentou atividade antibacteriana contra *B. cereus*, apesar de não inibir o crescimento de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*. A atividade encontrada para a inibição de *B. cereus* foi de 150±50 UA/mL. O extrato obtido do resíduo de uva não apresentou capacidade inibitória contra nenhuma das bactérias testadas.

**Tabela 1.** Halos de inibição de extratos aquosos de bagaço de mirtilo e uva contra bactérias patogênicas.

Micro-organismo	Mirtilo	Uva
	Halo de inibição (cm)	
<i>S. aureus</i> ATCC25923	-	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC7644	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC14579	+	-
<i>E. coli</i> ATCC2592	-	-

+ houve inibição; - não houve inibição.

Entre as bactérias de grande interesse da área de alimentos estão as diversas espécies que fazem parte do grupo de *B.cereus*. Consistem em risco à saúde pública decorrentes de toxinfecções alimentares, além de causarem importantes perdas econômicas para as indústrias em virtude da produção de enzimas deteriorantes. O controle da contaminação em alimentos por esses micro-organismos é difícil, visto que são resistentes a vários tratamentos utilizados pelas indústrias (Rossi et al., 2018), devido a sua capacidade de sobreviver a alguns processos térmicos e à sua capacidade de produzir esporos, cuja germinação e multiplicação são influenciadas pelo pH, composição dos alimentos e tratamentos térmicos (Warda et al., 2015). A importância de *B. cereus* para a segurança dos alimentos é conhecida desde muito tempo. Essa bactéria foi considerada responsável por 19% dos surtos de origem alimentar relatados nos Estados Unidos de 1998 a 2008 (Bennett et al., 2013). Essa bactéria é capaz de causar duas síndromes: a emética, devido a uma toxina resistente ao calor (cereulida) produzida nos alimentos e a diarreica, que ocorre através do consumo de uma grande quantidade de esporos ou células nos alimentos que produzem toxinas diarreicas (FDA, 2012).

Sant'Anna et al. (2012; 2013) observaram concentração de antocianinas monoméricas de 0,906 mg de cianidina 3-glucosídeo por grama de bagaço de uva seco e 22 mg de ácido gálico equivalente por grama de bagaço de uva seco de polifenóis totais. Silva et al. (2016) observou 184,7 mg de antocianinas por grama de extrato de casca de mirtilo, sendo elas o principal grupo fenólico nos extratos.

De acordo com Côté et al. (2010), o efeito antimicrobiano de frutas vermelhas tem sido associado ao alto conteúdo de compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos de baixo peso molecular, taninos condensados

e flavonoides, como antocianinas e flavonóis. A atividade antimicrobiana de frutas que contêm antocianinas provavelmente é causada por múltiplos mecanismos e sinergismos, pois possuem vários compostos, incluindo antocianinas, ácidos orgânicos fracos, ácidos fenólicos e suas misturas em diferentes formas químicas (Cisowska et al., 2011). A atividade antimicrobiana de extratos de frutas vermelhas tem sido relacionada com o baixo pH (Wu et al., 2008).

Em relação à atividade antifúngica, os resultados mostram que não houve inibição no crescimento dos fungos testados, indicando ausência da atividade nos extratos de ambos resíduos. 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. Os resultados podem ser creditados ao fato dos compostos com tal capacidade não estarem em concentração suficiente no extrato ou, também, devido a alguns fungos como *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. poderem crescer na presença de taninos e seus monômeros e dímeros, tendo a utilização destes compostos como uma fonte de carbono (Scalbert, 1991).

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que extrato de casca de mirtilo apresenta atividade antibacteriana contra *B. cereus*, mas não tem a capacidade de inibir *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*. Extrato aquoso de resíduo de uva não foi capaz de inibir o nenhuma das bactérias testadas. Nenhum dos resíduos apresentou atividade contra fungos filamentosos e leveduras. Este estudo, sugere uma aplicação importante para esses resíduos, apesar de mais estudos serem necessários para caracterizá-los afim de aplicar em processos na indústria de alimentos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bennett, S.D., Walsh, K.A., & Gould, L.H. (2013). Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* - United States, 1998-2008. *Clinical Infectious Diseases*, 57 (3), 425-433.
- 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* 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.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *The Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. Second Edition, (2012). Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>
- Côté, J., Caillet, S., Doyon, G., Dussault D., Sylvain J.F., & Lacroix, M. (2011). Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts, *Food Control*, 22(8), 1413-1218.
- Janissen, B., & Huynh, T. (2018). Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resources Conservations and recycling*, 128, 110-117.
- Khorshidian, N., Yousefi, M., Khanniri, A., & Mortazavian, A.M. (2018). Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45, 62-72.
- 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.
- Mayr-Harting, A.; Hedjes, A.J.; & Berkeley, C.W. (1972). Methods For Studying Bacteriocins. Norris, J.R.; Ribbons, D.W. (Ed.). *Methods in microbiology, New York Academic Press*, v. 7.
- Motta AS, Brandelli A. (2002). Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 63-71.
- 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.
- Rossi, G. A. M., Aguilar, C. E.G., Silva, H.O., & Vidal, A. M. C. (2018). *Bacillus cereus* group: genetic aspects related to food safety and dairy processing. *Arquivo do Instituto Biológico*, 85, 1-7.
- 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.
- Sant'Anna, V., Marczak, L.D.F., & Tessaro, I.C. (2013). Kinetic modeling of anthocyanin extraction from grape marc. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 3473-3480.
- Sant'Anna, V., Brandelli, A., Marczak, L.D.F., & Tessaro, I.C. (2012). Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Separation and Purification Technology*, 100, 82-87.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875–3883.
- Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A.-M., & Saura-Calixto. (2009). F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 310–329.
- Silva, S., Costa, E.M., Mendes, M., Morais, R.M., Calhau, C., & Pintado, M.M. (2016). Antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm activity of an ethanolic, anthocyanin-rich blueberry extract purified by solid phase extraction. *Journal of Applied Microbiology*. 121, 693-703.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S., & Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, p.1199-1218.
- 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.
- Warda, A.K., Tempelaars, M. H., Boekhorst, J., Abee, T., & Groot, M.N.N. (2016). Identification Identification of CdnL, a putative transcriptional regulator involved in repair and outgrowth of heat-damaged *Bacillus cereus* spores. *Plos ONE*, 11(2), e0148670.
- Wu, V. C. H., Qiu, X. J., Bushway, A., & Harper, L. (2008). Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1834 - 1841.