Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Atividade antimicrobiana de produtos naturais: erva-mate e resíduos agroindustriais

José Guilherme Prado Martin

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2011

José Guilherme Prado Martin
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Atividade antimicrobiana de produtos naturais: erva-mate e resíduos agroindustriais

Orientador:
Prof. Dr. **ERNANI PORTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Martin, José Guilherme Prado
Atividade antimicrobiana de produtos naturais: erva-mate e resíduos agroindustriais / José Guilherme Prado Martin. - - Piracicaba, 2011.
98 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.
Bibliografia.

1. Agentes antimicrobianos - Avaliação 2. Composto fenólicos 3. Escherichia coli 4. Listeria 5. Mate 6. Resíduos industriais 7. Salmonella 8. Staphylococcus I. Título

CDD 663.96
M381a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À querida sobrinha Helena,
cuja resiliência a engrandece a cada dia.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional.

À gloriosa Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela acolhida.

Ao meu orientador Ernani Porto, pela orientação, confiança e liberdade ao longo do mestrado.

Ao professor Severino Matias de Alencar, pela oportunidade de participar do projeto, pela disponibilização do laboratório de Bioquímica (LAN/Esalq) e pela solicitude.

Ao professor Cláudio Rosa Gallo, pela disponibilização do Laboratório de Microbiologia (LAN/Esalq).

Ao pesquisador Eduardo Micotti da Glória, pela troca de experiências, sugestões e disponibilização do laboratório de Micotoxinas (LAN/Esalq).

À técnica do laboratório de bioquímica Adna Prado, pela disposição.

Às técnicas do Laboratório de Microbiologia (LAN/Esalq), Cecília, Rose e Cléo, pela colaboração.

À técnica do laboratório de Higiene e Laticínios, Denise de Almeida Leme Baptista, pela solicitude e amizade.

Aos amigos do Coral “Luiz de Queiroz”, pela agradável convivência.

Ao grande amigo Alan Angeluci, pelas revisões, traduções, incentivo e companheirismo.

À colega Ingridy Simone Ribeiro Cabral, pelas sugestões, orientações e amizade.

À Giovana Barancelli, Cristina Bani, Lígia Maria de Aquino e Laura Dalloca pela ajuda nas atividades do laboratório.

À bibliotecária Beatriz Helena Giongo, pela ajuda com as correções.

Ao secretário da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fábio Benedito Rodrigues, pela disposição e solicitude.

À Capes, pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa e apoio financeiro concedidos.

A todos que, direta ou indiretamente, foram responsáveis pela realização desse projeto.

“O valor de praticar com rigor, por algum tempo, uma *ciência rigorosa* não está propriamente em seus resultados: pois eles sempre serão uma gota ínfima, ante o mar das coisas dignas de saber. Mas isso produz um aumento de energia, de capacidade dedutiva, de tenacidade; aprende-se a *alcançar um fim de modo pertinente.* Neste sentido é valioso, em vista de tudo o que se fará depois, ter sido homem de ciência”.

Friedrich Nietzsche, in *Humano, Demasiado Humano*.

SUMÁRIO

RESUMO 11
ABSTRACT 13
1 INTRODUÇÃO 15
1.1 Antimicrobianos naturais 16
1.2 Resíduos agroindustriais 20
1.3 Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) 21
1.4 Micro-organismos em alimentos 22
1.4.1 *Salmonella* Enteritidis 23
1.4.2 *Staphylococcus aureus* 25
1.4.3 *Listeria monocytogenes* 27
1.4.4 *Escherichia coli* 29
1.5 Objetivos 30
Referências 31
2 POTENCIAL ANTIMICROBIANO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS 43
Resumo 43
Abstract 45
2.1. Introdução 47
2.2 Materiais e métodos 48
2.2.1 Resíduos agroindustriais 48
2.2.2 Procedimento de extração 48
2.2.3 Atividade antimicrobiana 52
2.2.3.1 Micro-organismos testados 52
2.2.3.2 Método de difusão em ágar 52
2.2.3.3 Concentração inibitória e bactericida mínima (CIM/CBM) 52
2.2.3.4 Curvas de crescimento 53
2.2.4 Composição química 53
2.2.4.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais 53
2.2.4.2 Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM) 54

2.2.5 Análise estatística 55
2.3 Resultados e Discussão 55
2.3.1 Atividade antimicrobiana 55
2.3.2 Composição química 62
2.4 Conclusões 65
Referências 66
3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) CONTRA MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS 71
Resumo 71
Abstract 73
3.1 Introdução 75
3.2 Materiais e métodos 76
3.2.1 Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) 76
3.2.2 Procedimento de extração 77
3.2.3 Atividade antimicrobiana 79
3.2.3.1 Micro-organismos testados 79
3.2.3.2 Método de difusão em ágar 79
3.2.3.3 Concentração inibitória e bactericida mínima (CIM/CBM) 79
3.2.3.4 Curvas de crescimento 80
3.2.4 Composição química 80
3.2.4.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais 80
3.2.4.2 Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM) 81
3.2.5 Análise estatística 82
3.3 Resultados e Discussão 82
3.4 Conclusões 89
Referências 90
ANEXOS 95

Resumo

Atividade antimicrobiana de produtos naturais: erva-mate e resíduos agroindustriais

O estudo de compostos antimicrobianos em espécies vegetais tem gerado cada vez mais interesse na indústria de alimentos, devido ao aumento da demanda por alimentos livres de conservantes sintéticos por parte dos consumidores. Espécies vegetais são ricas em compostos bioativos com reconhecidas propriedades de interesse industrial, como farmacológicas, antioxidantes e antimicrobianas. Antibacterianos naturais podem ser encontrados não só em folhas, ramos, flores, tubérculos e raízes, mas também em subprodutos gerados pelo processamento de frutas, legumes e hortaliças. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de diversos resíduos agroindustriais e erva-mate para preparo de chimarrão (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) sobre micro-organismos patogênicos de importância em alimentos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*. Foram realizados *screening* da atividade antimicrobiana pela técnica da difusão em ágar, determinação das Concentrações Inibitória (CIM) e Bactericida Mínimas (CBM), análise dos efeitos dos extratos sobre o crescimento microbiano através da construção de curvas de crescimento, determinação do teor de fenólicos totais e caracterização química dos materiais de maior atividade antibacteriana. Os resultados demonstraram o potencial antimicrobiano da erva-mate e de vários resíduos agroindustriais. O extrato etanólico de erva-mate mostrou ser um potente antimicrobiano natural frente às bactérias *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *S.* Enteritidis. Em relação à sua composição química, foi encontrada uma grande quantidade de compostos fenólicos, porém sua atividade mostrou-se ineficiente em pH 6. Os resíduos agroindustriais de talos de beterraba, película de amendoim, bagaços de uvas Petit Verdot e Pinot Noir, sementes de uvas Petit Verdot, borra de fermentação de uvas tintas e bagaço de goiaba apresentaram atividade sobre *S. aureus* e *L. monocytogenes*. *E. coli* não foi inibida pelos extratos de erva-mate e por nenhum dos resíduos agroindustriais avaliados. Na composição química destes resíduos foi encontrada a presença de compostos fenólicos de reconhecida atividade antimicrobiana, demonstrando assim a importância e necessidade de pesquisas de prospecção de antimicrobianos naturais destas fontes para uso pela indústria de alimentos e bebidas.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; Resíduos agroindustriais; Erva-mate; Compostos fenólicos; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella* Enteritidis; *Escherichia coli*

Abstract

Antimicrobial activity of natural products: yerba mate e agroindustrial residues

Study of antimicrobial compounds in plant species has driven to increasing interest within the food industry due to raised demand from consumers for food free of synthetic preservatives. Vegetable species are rich of bioactive compounds with known antioxidant and antimicrobial properties worthy of industrial and pharmacological interest. Natural antimicrobials can be found not only in leaves, stems, flowers, tubers and roots, but also in by-products from processing of fruit, vegetables and greenery. This study aimed to evaluate antimicrobial activity of various agroindustrial residues and yerba mate for preparing "chimarrão" (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on relevant pathogenic microorganisms in foods such as *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli*. Screening of antimicrobial activity was performed by agar diffusion technique, determination of Minimal Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration (MIC/MBC), analysis of extracts effects on microbial rise through elaboration of growth curves, determination of total phenolic content, and chemical characterization of the compounds with the highest antibacterial activity. Results demonstrated antimicrobial potential of yerba mate and some agroindustrial residues. Ethanol extract of yerba mate revealed to be a potent natural antimicrobial on *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *S. enteritidis*; chemical composition indicated large quantities of bioactive phenolic compounds yet activity was ineffective at pH 6. Agroindustrial residues of beet stems, peanut skin, pomace of Petit Verdot and Pinot Noir grapes, Petit Verdot grape seed, fermentation lees of red grapes and pomace of guava showed activity on *S. aureus* and *L. monocytogenes*. *E. coli* was not inhibited by any extracts of yerba mate or residues evaluated. Residual chemical composition showed the presence of phenolic compounds with acknowledged antimicrobial activity, demonstrating the relevance of prospective research into the natural antimicrobial properties of these sources within the food and beverage industries.

Keywords: Antimicrobial activity; Agroindustrial residues; Yerba mate; Phenolic compounds; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella* Enteritidis; *Escherichia coli*

1 INTRODUÇÃO

Cresce cada vez mais no mercado consumidor de alimentos a ideia de que produtos naturais são fonte de saúde e bem-estar, em oposição aos produtos industrializados, frequentemente relacionados com efeitos colaterais indesejados. Dentro dessa perspectiva, produtos “verdes” tornam-se cada vez mais valorizados na sociedade, e essa demanda tem causado mudanças significativas em diversos setores industriais, inclusive no setor de bebidas e alimentos. Buscam-se, por parte das empresas do setor, elementos naturais que sirvam de matéria-prima para o desenvolvimento de uma grande variedade de produtos (MOREIRA et al., 2006).

À medida que a economia global gera produção e transporte de alimentos em escala mundial, o uso de antimicrobianos em alimentos se faz cada vez mais necessário, para que se garanta fornecimento de alimentos de qualidade (DAVIDSON; BRANEN, 2005). Na indústria de alimentos, o uso de conservantes naturais tem se tornado frequente, sendo que muitas especiarias e ervas representam alternativas em potencial no combate à deterioração e ao crescimento de micro-organismos patogênicos (TASSOU et al., 2000), desde que apresentem, obviamente, propriedades antimicrobianas (NYCHAS et al., 1990).

Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos de plantas tem sido objeto de várias pesquisas nos últimos anos (BURT, 2004; BENDAHOU et al., 2008; AL-REZA et al., 2010). Partes aéreas de espécies vegetais, como ramos, folhas e flores, e partes subterrâneas, como tubérculos, rizomas e raízes, são frequentemente utilizadas nas pesquisas por novos compostos (BENKEBLIA, 2004; AIDI WANNES et al., 2010). Recentemente, o estudo de espécies utilizadas no preparo de infusões, tais como chás e outros tipos de bebidas, tem ganhado cada vez mais destaque (BASTOS et al., 2006; BAHORUN et al., 2010). A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), espécie nativa da América do Sul, tem sido objeto de pesquisa devido suas atividades farmacológicas e riqueza de compostos bioativos (ANDERSEN; FOGH, 2001; ALVES et al., 2008; LIU et al., 2009).

No entanto, compostos com atividade antibacteriana podem ser encontrados não somente em plantas, frutos e outros materiais vegetais. Estudos recentes têm demonstrado a presença de compostos bioativos em diferentes tipos de resíduos agroindustriais, representando um valioso potencial de aplicação na indústria (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001; BALASUNDRAM et al.,

2006). O Brasil apresenta grande fonte de matéria-prima para pesquisas nesta área, uma vez que sua economia é fortemente baseada na agroindústria (ROBERTO et al., 1995).

1.1 Antimicrobianos naturais

Antimicrobianos naturais ocorrem em animais e plantas como mecanismo evolutivo de defesa do hospedeiro contra invasores e estão presentes em abundância no meio ambiente. Tais compostos podem exibir atividade antibacteriana em alimentos, ocorrendo naturalmente, ou podem, ainda, ser utilizados como aditivos em outros alimentos. O potencial de aplicação desses compostos pela indústria alimentícia é significativo, e estudos para incorporação de antimicrobianos em alimentos, bem como para maximizar sua biofuncionalidade têm sido feitos no mundo todo (NAIDU, 2000). Trabalhos recentes mostram a viabilidade de utilização de antimicrobianos naturais em alimentos (HAO et al., 1998; FISHER; PHILLIPS, 2008; GOVARIS et al., 2010).

Plantas, ervas e especiarias, bem como seus óleos essenciais e compostos isolados, contêm um grande número de substâncias que inibem atividades metabólicas de bactérias, leveduras e mofos (VIGIL et al., 2005). Compostos antimicrobianos em materiais vegetais são comumente encontrados nas folhas (LEE, LEE, 2010; SAMEC et al., 2010; YIM et al., 2010), flores (TAVARES et al., 2008; EBRAHIMABADI et al., 2010), bulbos (BENKEBLIA, 2004), rizomas (SURESH BABU et al., 2003; SABULAL et al., 2006), frutos (KOSSAH et al., 2010; ABDALLA et al., 2007; SAMPAIO et al., 2009) e outras partes da planta (ANESINI; PEREZ, 1993; WEI et al., 2010).

A composição química desses compostos é variada e inclui diversas classes de compostos, tais como saponinas, flavonóides, tiossulfatos, glucosinolatos (TAJKARIMI et al., 2010), taninos, quinonas, alcalóides e ácidos orgânicos (TAN et al., 2007). Pesquisas recentes têm relacionado a atividade antimicrobiana de fontes naturais com a presença de uma classe de compostos abundante em espécies vegetais, os chamados compostos fenólicos (MAJHENIC et al., 2007; EL-MASSRY et al., 2009; MAIER et al., 2009). Cabe ressaltar que não só as espécies vegetais são ricas em fenólicos. Por extensão, os resíduos gerados pelo seu processamento também apresentam quantidades consideráveis desses compostos (BALASUNDRAM et al., 2006).

Fenólicos são compostos que possuem um ou mais grupos hidroxila ligados diretamente a um anel aromático. Todo grupo se baseia na estrutura básica denominada fenol, cujo anel aromático é o benzeno (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006). Estes compostos são classificados de várias maneiras. Harborne e Simmonds (1964) classificam-nos de acordo com o número de átomos de carbono de suas moléculas, como demonstrado no Quadro 1.

Estrutura	Classe	Exemplos
C_6	Fenólicos simples	Resorcinol, floroglurcinol
C_6-C_1	Ácidos fenólicos e compostos relacionados	Ácido gálico, ácido salicílico, ácido vanílico
C_6-C_3	Ácidos cinâmicos	Ácido ρ-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico
C_6-C_3	Cumarinas, isocumarinas e cromonas	Umbeliferona, bergenina
C_{15}	Flavonóides	Buteína, aurona, isoflavona, isoflavonona, neoflavonóide, quercetina, miricetina, naringenina, pelargonidina, malvidina
C_{30}	Biflavonóides	Ginkgetina
Taninos	Condensados Complexos	Procianidina B2 Acutissimina A

Quadro 1 – Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o número de átomos de carbono. Adaptado de Harborne e Simmonds (1964); com informações de Vermerris e Nicholson (2006)

Os flavonóides, grupo de pigmentos vegetais distribuídos amplamente na natureza, compreendem um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados dentre os produtos de origem natural, com cerca de 4.200 diferentes compostos identificados até o momento. Sua ocorrência é heterogênea nas diferentes partes do vegetal – folhas, flores, galhos, raízes e frutos – e suas propriedades bioativas têm sido fonte de pesquisa pelas indústrias farmacêuticas e de alimentos (ZUANAZZI, 1999).

O espectro de ação antimicrobiana dos produtos naturais é amplo, compreendendo micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos (Quadro 2). O mecanismo de ação dos compostos fenólicos ocorre sobre diferentes estruturas celulares, causando ruptura da membrana externa, complexação com parede celular, privação de substrato, interação com material genético, inativação enzimática, entre outros (Quadro 3). Compostos fenólicos e aromáticos podem, ainda,

alterar a estrutura e função da membrana citoplasmática, interrompendo o fluxo de prótons, elétrons e o transporte ativo (SIKKEMA et al., 1995; BURT, 2004). Acredita-se que esses compostos atuem principalmente sobre a membrana celular (BELTRAME et al., 1988; SIERRA-ALVAREZ; LETTINGA, 1991).

Planta	Espectro de ação
Coentro (*Coriandum sativum*), oregano (*Origanum vulgare*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), salsa (*Petroselinum crispum*)	Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo *Listeria monocytogenes*
Pimenta-da-jamaica (*Pimenta dióica*), manjericão (*Ocimum basilicum*), louro (*Laurus nobilis*), Capim-limão (*Cymbopogon citratus*), erva cidreira (*Melissa officinalis*), manjerona (*Origanum majorana*), salva (*Salvia officinalis*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*)	*Bacillus subtilis, Clostridium botulinum, E. coli, L. monocytogenes, S. aureus* e *Salmonella* Typhimurium
Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), salva (*Salvia officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), manjerona (*Origanum majorana*), pimenta-da-jamaica (*Pimenta dióica*).	*Bacillus subtilis, Clostridium botulinum, E. coli, L. monocytogenes, Salmonella* Typhimurium, *S. aureus*
Cominho (*Cuminum cyminum*)	*Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Clostridium botulinum, L. monocytogenes, Pseudomonas fluorescens, Salmonella* Enteritidis, *S. aureus*
Endro (*Anethum graveolens*)	*Clostridium botulinum, P. aeruginosa, S. aureus, Yersinia enterocolitica*
Funcho (*Foeniculum vulgare*)	*Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Salmonella* Enteritidis, *S. aureus, Yersinia enterocolitica*
Alho-das-vinhas (*Allium vineale*)	Amplo espectro de ação contra micro-organismos patogênicos Gram-positivos e Gram-negativos
Hortelã (*Mentha piperita*)	Amplo espectro de ação contra micro-organismos patogênicos Gram-positivos e Gram-negativos
Cebola (*Allium cepa*)	*E. coli, Salmonella* Typhimurium, *Shigella dysenteriae, S. aureus*

Quadro 2 – Fontes naturais de compostos antimicrobianos e seus respectivos espectros de ação. Adaptado de Tajkarimi et al. (2010)

Classe	Subclasse	Exemplos	Mecanismo de ação
Fenólicos	Fenólicos simples	Catecol	Privação de substrato
		Epicatequina	Ruptura de membrana
	Ácidos fenólicos	Ácidos cinâmicos	Ligação a adesinas, complexação com parede celular, inativação enzimática
	Quinonas	Hipericina	
	Flavonóides	Crisina	Ligação a adesinas, complexação com parede celular
	Flavonas		
		Abissinona	Inativação enzimática
	Flavonóis	Totarol	-
	Taninos	Elagitanina	Ligação a proteínas, adesina, Inibição enzimática
			Privação de substrato, complexação com parede celular, ruptura de membrana
	Cumarinas	Varfarina	Interação com DNA eucariótico
Terpenóides, óleos essenciais		Capsaicina	Ruptura celular
Alcalóides		Berberina, piperina	Atividade sobre a parede celular, interação com DNA

Quadro 3 – Principais classes de fenólicos com atividade antimicrobiana e seus respectivos mecanismos de ação. Adaptado de Cowan, 1999

Extratos de plantas e óleos essenciais são geralmente obtidos através de processos de destilação a vapor, extração com solventes ou prensagem e sua utilização na indústria de alimentos é influenciada pela natureza dos seus constituintes. A atividade antimicrobiana depende do método de extração empregado e da quantidade de compostos disponível na planta. Dentro da mesma especiaria ou espécie vegetal, o teor de constituintes dos grupos ativos pode variar substancialmente (VIGIL et al., 2005). Além disso, a zona geográfica de cultivo e a sazonalidade podem influenciar na composição do extrato (BRITO, 2009; CEZAROTTO, 2009). Tornam-se imprescindíveis, portanto, a padronização do procedimento de extração e a utilização de um mesmo lote de material amostral para a realização dos ensaios.

A seleção do solvente de extração é um fator importante para o sucesso da pesquisa de antimicrobianos. Compostos solúveis em água e proteínas são geralmente extraídos a partir de água ou tampões, enquanto que compostos insolúveis em água são extraídos com solventes orgânicos (KIRAKOSYAN, 2006). Tanto os solventes de baixa polaridade quanto os de alta polaridade podem ser utilizados para extração de compostos a partir de plantas secas ou liofilizadas, sendo que os mais frequentemente utilizados são o acetato de etila e o metanol.

Teoricamente, o acetato de etila apresenta capacidade de extração apenas por processo de lixiviação da amostra, e solventes alcoólicos são capazes de romper estruturas celulares, tais como membranas, e extrair, dessa forma, compostos intracelulares. Para materiais vegetais frescos, de alto teor de umidade, soluções compostas por diclorometano-metanol são as mais recomendadas para otimizar o procedimento de extração (GHISALBERTI, 1993).

1.2 Resíduos agroindustriais

O Brasil possui economia fortemente baseada na agroindústria. Dados do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA, 2009) fornecem uma dimensão da importância da indústria agropecuária para o país: em 2009, a participação do PIB do agronegócio no PIB do país foi de 23,08%. E a tendência é que a produção de alimentos cresça no mundo todo. Segundo a FAO (2009), a produção mundial de alimentos precisa crescer 70% até 2050 para garantir o abastecimento a níveis seguros. Consequentemente, essa crescente produção acarretará no aumento da geração de resíduos e subprodutos.

O potencial antimicrobiano de resíduos agroindustriais já vem sendo pesquisado nos últimos anos. Foi demonstrada a atividade antimicrobiana em sementes de uva (JAYAPRAKASHA et al., 2003; BAYDAR et al., 2004), bagaços de uva (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001; KATALINIC et al., 2010), partes de uvas e produtos da vinificação (ANASTASIADI et al., 2008), cascas de romã (AL-ZOREKY, 2009), cascas de limão (MAHMUD et al., 2009), cascas verdes de nozes (OLIVEIRA et al., 2008), caroço de manga (ABDALLA et al., 2007), entre outros. Novas pesquisas na busca por antimicrobianos naturais se fazem necessárias, à medida que permitirão ampliar as possibilidades de utilização de conservantes naturais, principalmente pela indústria de alimentos.

Além de proporcionar fonte de matéria-prima para pesquisas de novos compostos bioativos, a reutilização destes resíduos ajuda a minimizar os riscos de danos ambientais (MAKRIS et al., 2007). Resíduos agroindustriais apresentam elevada composição orgânica. Seu descarte no meio ambiente é fonte de sérios problemas; a liberação excessiva de nutrientes, como fósforo e nitrogênio, pode causar eutrofização de ambientes aquáticos, com consequente diminuição de oxigênio dissolvido, causando morte de organismos aeróbios e desequilíbrio do ecossistema local (PELTZER et al., 2008).

Em meados de 2010, foi aprovada no Brasil a lei que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos, que tem como princípios e objetivos, dentre outros, o reconhecimento do resíduo sólido reutilizável e reciclável como um bem econômico e de valor social, gerador de trabalho e renda, visando ao desenvolvimento sustentável (BRASIL, 2010). A lei classifica, quanto à origem, "resíduos industriais" como sendo aqueles gerados nos processos produtivos e instalações industriais, e "resíduos agrossilvopastoris" como aqueles gerados em atividades agropecuárias e silviculturais. A necessidade de adaptação à nova lei pode servir de estímulo, nos próximos anos, ao uso de resíduos agroindustriais como fonte de matéria-prima para pesquisa de compostos bioativos, área atualmente centrada no estudo de plantas medicinais.

1.3 Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), primeiramente adotada por habitantes nativos da região compreendida por Paraguai, Uruguai, nordeste da Argentina e sul do Brasil por suas propriedades medicinais, é utilizada por populações sul-americanas tanto como fonte de cafeína, em substituição ou em paralelo ao chá e café, quanto como agente terapêutico, devido aos seus reconhecidos efeitos farmacológicos (BRACESCO et al., 2010).

É membro da família Aquifoliaceae, a qual compreende dois gêneros e mais de 400 espécies, dentre as quais a maioria do gênero *Ilex*, de porte arbóreo ou arbustivo (EVANS; TREASE, 2002). Apesar de ser chamada de erva, a planta tem estrutura arbórea (BENINCÁ, 2009). É nativa da América do Sul, e encontrada principalmente no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (HECK; DE MEJÍA, 2007).

No Brasil, a região Sul é a maior produtora de erva-mate. Em 2009, 99,9% das 218.102 toneladas produzidas no país vieram dessa região. O Paraná é o maior Estado produtor, concentrando 71,8% do total de produção da erva. A magnitude dessa produção também se expressa em termos financeiros: o valor da produção de erva-mate no mesmo ano ultrapassou os 86 milhões de reais (IBGE, 2009).

O consumo de bebidas à base de erva-mate ocorre de várias maneiras, de acordo com a região. No sul do Brasil, é utilizada para preparo do chimarrão, bebida que leva água quente e que é consumida pressionando-se a erva contra a parede da cuia e aspirando-se através de um utensílio denominado "bomba" (ou bombilho); no Paraguai, é preparada com água gelada e recebe o nome

de tereré. No sudeste do Brasil, a mate é comercializada na forma de folhas torradas e moídas, usadas para preparo de chá ou de bebidas doces geladas, muito populares em São Paulo e no Rio de Janeiro (BRACESCO et al., 2010).

Nos últimos anos, tem aumentado o número de pesquisas com erva-mate devido às suas propriedades farmacológicas. Foram relatadas atividade antioxidante (FILIP et al., 2000; SCHINELLA et al., 2009; PAGLIOSA et al., 2010), antiinflamatória (TSAI et al., 2010), diurética (GONZALEZ et al., 1993), antitumorigênica (DE MEJÍA et al., 2010), redutora de peso (ANDERSEN; FOGH, 2001; DICKEL et al., 2007; PRZYGODDA et al., 2010), antimicrobiana (DE BIASI et al., 2009; COGO et al., 2010), dentre outras.

A composição química dentro do gênero *Ilex* é bastante variável. Estudos demonstram que a erva-mate é rica em compostos fenólicos, principalmente ácidos clorogênicos e seus derivados (HECK; DE MEJÍA, 2007), também presentes em diversos vegetais e considerados compostos pré-formados de resistência contra a invasão de fitopatógenos, principalmente bactérias e fungos (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006). Um de seus derivados é o ácido cafeoilquínico, presente em frutas e vegetais utilizados para consumo humano, como café, cenoura, pera, marmelo, ameixas e passas (SHAHIDI; NACZK, 2004). Outros compostos fenólicos são encontrados em abundância na erva-mate, como os ácidos gálico, siríngico, caféico, ferúlico, *p*-cumárico e os flavonóides rutina e quercetina (BASTOS et al., 2006; BRAVO et al., 2007; PAGLIOSA et al., 2010).

Recentemente, foram publicados diferentes estudos acerca do potencial antimicrobiano da erva-mate sobre bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos (DE BIASI et al., 2009; VAQUERO et al., 2010; COGO et al., 2010). As recentes descobertas reafirmam a importância da erva-mate como fonte de pesquisas de compostos antimicrobianos naturais. Por ser amplamente consumida na forma de bebidas, chás ou infusões, e tendo em vista suas propriedades biológicas comprovadas, a utilização da erva-mate como conservante natural pela indústria de alimentos se torna ainda mais promissora.

1.4 Micro-organismos em alimentos

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) têm sido um grande problema de saúde pública em todo mundo. Nos Estados Unidos, o Centers for Disease Control and Prevention – CDC estima

que a cada ano 1 em cada 6 americanos, ou seja, 48 milhões de pessoas, fiquem doentes, 128 mil sejam hospitalizados e 3 mil morram de DTA (CDC, 2010). Os custos com doenças transmitidas por alimentos chegam a 152 bilhões de dólares ao ano (PRODUCE SAFETY PROJECT, 2010). Dentre os agentes etiológicos mais custosos aos cofres públicos, encontram-se *Salmonella* enterocolítica (US$ 14,6 bilhões), *L. monocytogenes* (US$ 8,8 bilhões), *E.* coli (US$ 1 bilhão) e *S. aureus* (US$ 163 milhões).

No Brasil, no período de 1999-2010, foram notificados 6.971 surtos por DTA, nos quais 1,8 milhão de pessoas foram expostas, com o acometimento de 133.954 pessoas e 88 óbitos registrados (BRASIL, 2011). Os dados são referentes até a última atualização, em outubro de 2010. Dos agentes etiológicos identificados, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* spp. são os mais comuns em surtos. No Estado de São Paulo, em 2009 foram notificados 384 surtos, com 12.399 expostos, 7.253 doentes e 6 óbitos (SÃO PAULO, 2009). Uma vez que no país há sério problema de subnotificação de DTA, esses números são, certamente, bastante superiores.

1.4.1 *Salmonella* Enteritidis

O gênero *Salmonella* compreende bacilos Gram-negativos, não-produtores de esporos, anaeróbios facultativos, produtores de gás a partir de glicose (exceto *S.* Typhi) e capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. Produzem sulfeto de hidrogênio, não produzem indol e são negativos para urease. São mesófilos, com ótimo de crescimento entre 35 e 37ºC, mas geralmente crescem entre 5 e 46ºC. A maioria é móvel e apresenta flagelos peritríquios; *S.* Pullorum e *S.* Gallinarum são imóveis (RAY, 2003; FRANCO; LANDGRAF, 2005). *Salmonella* apresenta pH ótimo de crescimento ao redor da neutralidade, entre 7,0 e 7,5. Efeito bactericida ocorre em valores de pH acima de 9,5 e abaixo de 3,8. Inibição do crescimento é observada em valores de atividade de água abaixo de 0,94 (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF, 1996).

O gênero é composto de apenas duas espécies: *S. enterica*, subdivida em seis subespécies (*enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae, indica*) e *S. bongori*. Juntas, agrupam mais de 2.500 sorotipos, os quais recebem diferentes denominações seguidas do nome da espécie e escritas em letra maiúscula, como, por exemplo, *S. enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis, que pode ser abreviado para *Salmonella* Enteritidis (POPOFF et al., 2001).

A classificação sorológica de *Salmonella* é baseada nos principais determinantes presentes nos antígenos somáticos (antígeno O) e flagelares (antígeno H). Antígenos O estão presentes em longas cadeias de lipopolissacarídeos (também conhecidos por LPS ou endotoxina). O lipídeo A do LPS é o principal determinante da toxicidade. Alguns sorotipos, como *S.* Typhi, *S.* Dublin e *S.* Paratyphi C expressam o antígeno capsular Vi, um homopolímero de ácido N-acetilgalacturônico, importante nos processos de virulência e imunidade (HORMAECHE; PETER, 1998).

Apresentam distribuição mundial, e a ocorrência de sorotipos varia de acordo com a região. São reconhecidas universalmente como agentes causadores de zoonoses; seu reservatório mais importante é o trato intestinal de aves (GERMANO; GERMANO, 2008; WAAGE et al., 1999). Os diferentes sorotipos de *Salmonella* podem estar estritamente adaptados a um hospedeiro em particular ou ainda ocorrer em grande número de espécies. *S.* Typhi e *S.* Paratyphi A, B e C são encontrados em um único reservatório natural, o homem. Alguns sorotipos, como *S.* Gallinarum, são adaptados a uma determinada espécie animal (aves), enquanto outros podem infectar indiferentemente homens e animais, caso de *S.* Typhimurium e *S.* Enteritidis (JAY, 2005).

A descoberta de novos patógenos alimentares mudou o entendimento acerca da epidemiologia das doenças transmitidas por alimentos nas últimas duas décadas. Dentre os patógenos mais relevantes nos últimos 20 anos está a *Salmonella* Enteritidis (HOLLEY; PATEL, 2005), principal sorotipo implicado em salmoneloses humanas em todo o mundo, principalmente devido ao consumo de ovos de galinha e produtos à base de ovos (GEIMBA et al., 2004). No período de 1998 a 2002, 49,4% dos surtos de infecção bacteriana confirmados nos Estados Unidos foram causados por bactérias do gênero *Salmonella* (LYNCH et al., 2006). No Brasil, 34,7% dos surtos alimentares confirmados laboratorialmente de 1999 a 2004 tiveram como agente etiológico bactérias do gênero *Salmonella* (SÃO PAULO, 2005).

Eduardo et al. (2008) relatam que do total de surtos decorrentes da ingestão de alimentos contaminados por *Salmonella* no Estado de São Paulo, de 1999 a 2007, 43,2% correspondiam ao sorotipo *Salmonella* Enteritidis; de 1.939 casos isolados, 31% foram devidos ao mesmo sorotipo. Madalosso et al. (2008) relatam a ocorrência de surto de infecção por *Salmonella* Enteritidis em um restaurante do município de São Paulo-SP envolvendo 15 pessoas, possivelmente devido ao consumo de patês que tinham em sua composição maionese com ovos crus produzida no próprio estabelecimento, prática proibida pela legislação estadual vigente.

Ovos, frangos, carne e produtos à base de carne são os veículos mais comuns de salmonelose humana (PELCZAR et al., 1996). Saladas à base de ovos, sorvetes e outras sobremesas de fabricação caseira estão entre os tipos de alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos de gastrenterites por *Salmonella*. Em relação aos laticínios, é quase sempre causada pelo consumo de leite cru ou indevidamente pasteurizado e queijo. Entre os pontos que mais favorecem a multiplicação de *Salmonella* em alimentos estão preparação e armazenamento de grandes quantidades de alimentos, manuseio excessivo e controle inadequado da temperatura de armazenamento (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

1.4.2 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno Gram-positivo da família *Staphylococcaceae* (GARRITY; HOLT, 2001). Seu gênero abrange 33 espécies; são imóveis, catalase e coagulase-positivos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). As espécies de estafilococos são hospedeiro-adaptadas; metade das espécies conhecidas habita apenas humanos (*S. cohnii*) ou humanos e animais (*S. aureus*) (JAY, 2005). Do total de espécies, 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (DAR et al., 2006), principalmente de pele e fossas nasais (SANTOS et al., 2007).

Embora sejam mesófilas, algumas linhagens de *S. aureus* podem crescer a temperaturas de até 6,7ºC. Em geral, o crescimento ocorre na faixa de 7ºC a 47,8ºC, e as enterotoxinas são produzidas entre 10ºC e 46ºC; contudo, a temperatura ótima para produção de enterotoxina fica entre 40ºC e 45ºC. As temperaturas mínimas e máximas de crescimento e produção de toxinas assumem condições ótimas diferentes de acordo com outros parâmetros, como concentração de sais, atividade de água, e pH, por exemplo (JAY, 2005).

O patógeno pode provocar desde simples infecções, como espinhas e furúnculos, até graves enfermidades. As infecções mais graves podem ocorrer através da produção de toxinas (síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar estafilocócica) ou da invasão direta e proliferação do microrganismo, com consequente formação de abscesso e destruição tecidual, como nas infecções cutâneas. Endocardites, pneumonia, meningite, osteomielite e artrite séptica também estão associadas à infecção por estes patógenos (MURRAY et al., 2010).

Cepas de *S. aureus* patogênicas produzem uma série de enzimas ou toxinas extracelulares. A produção de hemolisinas é responsável pela hemólise, fenômeno que pode ser observado pela formação de um halo de hemólise ao redor de colônias crescidas em ágar sangue. A coagulase está intimamente relacionada à sua patogenicidade. Trata-se de uma enzima capaz de coagular a fibrina, ocasionando a formação de um coágulo; a rede de coágulos formados ao redor das bactérias torna difícil o contato de agentes do sistema imunológico do hospedeiro com as células bacterianas, o que impossibilita a fagocitose por macrófagos. (MADIGAN et al., 2004). Além disso, *S. aureus* produz enterotoxinas associadas a doenças transmitidas por alimentos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A gastrenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contenham uma ou mais enterotoxinas, as quais são produzidas somente por algumas espécies e linhagens de estafilococos. Embora a produção de enterotoxinas esteja geralmente associada a estafilococos coagulase-positiva, algumas espécies de estafilococos não produtoras desta enzima também podem produzir enterotoxinas. Uma característica importante dessas proteínas é sua termoestabilidade, que lhe confere resistência a tratamentos térmicos, como a pasteurização (JAY, 2005).

Segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE-SP), no ano de 2008 foram registrados 321 surtos de doenças transmitidas por água e alimentos, envolvendo 4.797 pessoas. Estafilococos figuraram como agente etiológico em 10 surtos ocorridos no período (Quadro 4).

Mês	Doença	N.º surtos	N.º casos	Agente etiológico	Fonte de transmissão	Local de ocorrência
Março	Diarreia	1	7	*S. aureus*	Bolo de creme e nozes	Residência
Abril	Diarreia	1	2	Estaf. coag+	Bolo de milho	Padaria
Maio	Diarreia	1	5	*S. aureus*	Queijo branco caseiro	Residência
Outubro	Diarreia	1	8	*S. aureus*, coliformes	Sushi	Lanchonete
Março	Diarreia	1	44	*S. aureus*	Sopa, ovos	Hospital
Maio	Diarreia	1	2	*S. aureus, B. cereus*	Panqueca de carne	Residência
Junho	Diarreia	1	25	*S. aureus, B. cereus*	Bolo	Igreja, padaria
Janeiro	Diarreia	1	23	*E. coli*, estaf. coag+, *B. cereus*, coliformes	Bolo branco, lagarto, maionese	Ignorado
Março	Diarreia	1	6	*Proteus mirabilis*, estaf. coag+	Coxinha	Lanchonete
Janeiro	Diarreia	1	56	*S. aureus*	Lasanha de frango	Fábrica
Total		10	178			

Quadro 4 – Surtos de intoxicação alimentar por *S. aureus* no Estado de São Paulo, 2008. Adaptado de DDTHA/CVE – SinanNet e Relatórios de Investigação de Surtos (SÃO PAULO, 2009)

Os alimentos normalmente relacionados às intoxicações causadas por *S. aureus* são carnes e produtos à base de carnes, frangos, produtos feitos com ovos, saladas com molho, produtos de confeitaria, tortas de creme, bombas de chocolate, sanduíches, leite e derivados (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Sendo exigente nutricionalmente, os alimentos envolvidos devem ser ricos em proteínas, açúcares e vitaminas, especialmente do complexo B. Os alimentos que requerem manipulação considerável durante a preparação e que são mantidos a temperatura ambiente após a preparação são os envolvidos mais frequentemente em intoxicações estafilocócicas (JAY, 2005).

Estudo de Almeida Filho e Nader Filho (2000) apontou presença de *S. aureus* em 50% de amostras de queijo minas frescal acima dos valores permitidos pela legislação vigente. Bezerra et al. (2010) detectaram o microrganismo em sanduíches comercializados na cidade de Cuiabá-MT; 31,4% das amostras estavam fora dos padrões microbiológicos aceitos. Altas contagens ($2x10^8$ $UFC.g^{-1}$) de *S. aureus* produtor de enterotoxina A foram encontradas em alimento envolvido em um surto de intoxicação alimentar em um restaurante institucional na cidade de Pelotas-RS (RODRIGUES et al., 2004), valores idênticos aos detectados por Carmo et al. (2003) em panquecas de frango envolvidas em surto de intoxicação alimentar na cidade de Passos-MG.

1.4.3 *Listeria monocytogenes*

Os membros do gênero *Listeria* são definidos como pequenos bastonetes Gram-positivos não esporogênicos, catalase positivos e não produtores de H_2S. Crescem numa ampla faixa de

temperatura (1 a 45°C), com ótimo entre 30-37°C. São classificados como psicrotolerantes, em função da capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração (HÖLT, 1994).

L. monocytogenes é reconhecida como único patógeno de importância em humanos dentre as seis espécies descritas atualmente, embora *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii* sejam ocasionalmente associadas a doenças humanas (ADAMS; MOSS, 2000). *L. monocytogenes* tem se tornado foco de estudos nos últimos anos, devido ao surgimento de diversos casos e surtos de listeriose em humanos (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Apresenta ampla distribuição na natureza, seja no ambiente, em animais ou no homem. Podem contaminar ambientes de produção, processamento e distribuição de alimentos, causando problemas para indústria e consumidores, desde a obtenção da matéria-prima até a mesa do consumidor final (CHAE et al., 2006).

Nos Estados Unidos, o patógeno causa aproximadamente 2.500 casos de listeriose ao ano e aparece em terceiro lugar nas estimativas de custos com doenças transmitidas por alimentos (PRODUCE SAFETY PROJECT, 2010). A ocorrência no Brasil é subdiagnosticada e subnotificada, e as infecções assintomáticas provavelmente ocorrem em todas as idades, embora sejam de importância apenas na gravidez. A taxa de letalidade em recém-nascidos é de 30%; em adultos é de 35% (11% para menores de 40 anos e 63% para maiores de 60 anos). Em casos de septicemia, a taxa de letalidade sobe para 50%, chegando a níveis de 70% em casos de meningite (SILVA et al., 2007).

Indivíduos saudáveis podem ou não apresentar sintomas após a ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes*. Na maioria das vezes, os sintomas surgem de 1 a 7 dias após a ingestão e incluem sintomas leves semelhantes à gripe, como febre baixa, dores abdominais e diarreia. Os sintomas desaparecem em poucos dias, mas o indivíduo continua eliminando células viáveis pelas fezes por algum tempo (RAY, 2003).

Qualquer alimento fresco de origem animal ou vegetal pode apresentar números variados de *L. monocytogenes*, como carnes frescas ou congeladas, frango, frutos do mar, frutas e produtos vegetais (JAY, 2005); é associada, principalmente, a leite cru, leite pasteurizado inadequadamente e outros produtos lácteos, como queijos e sorvetes. Por ser psicrotrófica, tem sua multiplicação favorecida nesses alimentos, geralmente mantidos sob refrigeração (NUTTAWEE, 2009).

Estudos relatam variados índices de contaminação em leite e derivados. Mais da metade (51,5%) das amostras de leite cru e 100% das amostras de leite beneficiado continham *L. monocytogenes* em pesquisa realizada no Estado da Paraíba (CATÃO; CEBALLOS, 2001); 3,7%

das amostras de queijos artesanais comercializados em estradas litorâneas do Estado do Rio Grande do Sul estavam contaminadas por *L. monocytogenes* (ZAFFARI et al., 2007); e 6,70% dos queijos macios e semi-macios produzidos e vendidos no Estado do Paraná analisados por Abrahão et al. (2008). *L. monocytogenes* tem sido encontrada em outros tipos de alimentos, tais como salames fermentados (BORGES et al., 1999), sorvetes (ABRAHÃO et al., 2008) e linguiças (SILVA et al., 2004).

Uma das características que tornam *L. monocytogenes* ainda mais problemática para a indústria de alimentos é sua capacidade de formar biofilmes, dificultando os processos de controle de qualidade microbiológica em alimentos (RAY, 2003). Nesse contexto, estudos vêm sendo realizados no intuito de avaliar a formação de biofilmes de *L. monocytogenes* em superfícies em diferentes condições, como tempo de exposição, temperatura e natureza da superfície (TRAVAGIN, 2010).

1.4.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, em forma de bastonete, não formadora de esporos. Pertence à família *Enterobacteriaceae* e inclui um grande número de cepas que diferem em seu potencial patogênico. Certas cepas, contudo, são inócuas e vivem dentro de intestinos de animais de sangue quente (coliformes fecais). São os micro-organismos anaeróbios facultativos mais abundantes nas fezes, presentes em concentrações próximas a 10^8 UFC.g^{-1} (SCHAECHTER, 2009).

E. coli pode crescer em meios mínimos contendo apenas uma fonte orgânica de carbono (como a glicose), uma fonte de nitrogênio (como $(NH_4)_2SO_4$) e outros minerais (JAY, 2005). Sua sorotipagem é baseada nas diferenças antigênicas encontradas no envelope celular ou na cápsula (antígenos K), na parede celular (antígenos O), e nos flagelos (antígeno H). As fímbrias, quando presentes, também podem ser usadas para a caracterização sorológica (SILVA et al., 2007).

Com base nas características das doenças e nos grupos sorológicos, existem seis grupos de *E. coli* virulentos: *E. coli* enteroagregativas (EAEC), *E. coli* entero-hemorrágicas (EHEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), e *E. coli* de adesão difusa (DAEC) (RAY, 2003). Cada grupo apresenta características peculiares, tais

como patogenicidade, produção ou não de enterotoxinas, período de incubação, sintomas, tipos de lesão e severidade.

Um dos sorotipos de *E. coli* melhor estudados até o momento é o $O_{157}H_7$; tida como uma bactéria emergente, causa quadro agudo de colite hemorrágica, devido à produção de grande quantidade de toxina, a qual provoca severo dano à mucosa intestinal. A doença é auto-limitada e dura de 5 a 10 dias. Em casos mais graves, a infecção pode apresentar uma complicação chamada Síndrome Hemolítica Urêmica, caracterizada por destruição de células vermelhas e falência renal. Nos Estados Unidos, estima-se que ocorram cerca de 73.000 casos de infecção por *E. coli* $O_{157}H_7$, anualmente.

E. coli é considerada uma das principais causas de diarreia líquida aguda em pessoas recém-chegadas de países estrangeiros, causando uma condição conhecida como “diarreia do viajante”. Em geral, a prevenção de doenças de origem alimentar causadas por *E. coli* pode ser alcançada observando-se fatores como refrigeração inadequada, manipuladores com hábitos de higiene insuficientes, cozimento ou processamento inadequados. Cuidados mais apurados com relação à alimentos muito manipulados, como carnes moídas e hambúrgueres, devem ser tomados como medidas de prevenção de infecções por *E. coli* (JAY, 2005).

No Brasil, vários estudos identificaram sorotipos patogênicos em alimentos. Silva et al. (2001) identificaram *E. coli* enteropatogênica (EPEC) em amostras de leite pasteurizado comercializadas no Estado do Rio de Janeiro; sorotipos de *E. coli* enterotoxigênica foram encontrados em amostras de carne moída comercializada na cidade de Ribeirão Preto (BERGAMINI et al., 2007); em estudo realizado por Aleixo e Aver (1996), foram encontrados sorotipos entopatogênicos (EPEC) e enterotoxigênicos (ETEC) em amostras de leite pasteurizado e carne moída comercializados na região de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul.

1.5 Objetivos

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de vários resíduos agroindustriais e erva-mate para preparo de chimarrão (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) sobre micro-organismos patogênicos de importância em alimentos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*. Foram realizados *screening* da atividade antimicrobiana pela técnica da difusão em ágar, determinação das Concentrações

Inibitória (CIM) e Bactericida Mínimas (CBM), análise dos efeitos dos extratos sobre o crescimento microbiano através da construção de curvas de crescimento, determinação do teor de compostos fenólicos totais e caracterização química por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM) dos materiais de maior atividade antibacteriana.

Referências

ABDALLA, A.E.M.; AYAD, E.H.E. ; EL-HAMAHMY, R.M. Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. **Food Chemistry,** Barking, v. 103, n. 4, p. 1141-1152, 2007.

ABRAHÃO, W.M. ; ABRAHÃO, P.R.S.; MONTEIRO, C.L.B.; PONTAROLO, R. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** São Paulo, v. 44, n. 2, p. 289-296, 2008.

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food microbiology.** 2th ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000.

AIDI WANNES, W.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; BEN JEMIA, M.; OUCHIKH, O.; HAMDAOUI, G.; KCHOUK, M.E.; MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology,** London, v. 48, n. 5, p. 1362-1370, 2010.

AL-REZA, S.M.; RAHMAN, A.; JONGHWI, L.; KANG, S.C. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens. **Food Chemistry,** Barking, v. 119, n. 3, p. 981-986, 2010.

AL-ZOREKY, N.S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 134, n. 3, p. 244-248, 2009.

ALEIXO, J.A.; AVER, G.P. Prevalence of enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* in foods of animal origin in southern Brazil. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 247-250, 1996.

ALMEIDA FILHO, E.S.D.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "frescal". **Revista de Saúde Pública,** São Paulo, v. 34, n. 6, p. 578-580, 2000.

ALVES, R.J.V.; JOTZ, G.P. ; AMARAL, V.S.; MONTES, M.H.; MENEZES, H.S.; ANDRADE, H. H. R. The evaluation of maté (*Ilex paraguariensis*) genetic toxicity in human lymphocytes by the cytokinesis-block in the micronucleus assay. **Toxicology in Vitro,** Oxford, v. 22, n. 3, p. 695-698, 2008.

ANASTASIADI, M.; CHORIANOPOULOS, N.G.; NYCHAS, G.J. Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 57, n. 2, p. 457-463, 2008.

ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **Jounal of Human Nutrition and Dietetics,** Londres, v. 14, n. 3, p. 243-50, 2001.

ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 39, n. 2, p. 119-128, 1993.

BAHORUN, T.; LUXIMON-RAMMA, A.; GUNNESS, T.K.; SOOKAR, D.; BHOYROO, S.; JUGESSUR, R.; REEBYE, D.; GOOGOOLYE, K.; CROZIER, A.; ARUOMA, O.I. Black tea reduces uric acid and C-reactive protein levels in humans susceptible to cardiovascular diseases. **Toxicology,** Amsterdam, v. 278, n. 1, p. 68-74, 2010.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry,** Barking, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BASTOS, D.H.M.; ISHIOTO, E.Y.; MARQUES, M.O.M.; FERRI, A.F.; TORRES, E.A.F.S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis,** San Diego, v. 19, n. 6-7, p. 538-543, 2006.

BAYDAR, N.G.; ÖZKAN, G. ; SAGADIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control,** Guildford, v. 15, n. 5, p. 335-339, 2004.

BELTRAME, P.; BELTRAME, P.L.; CARNITI, P.; GUARDIONE, D.; LANZETTA, C. Inhibiting action of chlorophenols on biodegradation of phenol and its correlation with structural properties of inhibitors. **Biotechnology and Bioengineering,** New York, v. 31, n. 8, p. 821-828, 1988.

BENDAHOU, M.; MUSELLI, A.; DUBOIS-GRIGNON, M.; BENYOUCEF, M.; DESJOBERT, J.; BERNARDINI, A.; COSTA, J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. **Food Chemistry,** Barking, v. 106, n. 1, p. 132-139, 2008.

BENINCÁ, C. **Estabilidade do ácido 5-o-cafeoilquínico: relação entre a cinética química e o processamento de erva-mate.** 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Food Science & Technology,** London, v. 37, n. 2, p. 263-268, 2004.

BERGAMINI, A.M.M.; SIMÕES, M. ; IRINO, K.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology,** São Paulo, v. 38, n. 3, p. 553-556, 2007.

BEZERRA, A.C.D.; REIS, R.B.; BASTOS, D.H.M. Microbiological quality of hamburgers sold in the streets of Cuiabá – MT, Brazil and vendor hygiene-awareness. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 30, n. 2, p. 520-524, 2010.

BORGES, M.D.F.; SIQUEIRA, R.S.; BITTENCOURT, A.M.; VANETTI, M.C.D.; GOMIDE, L.A. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. **Revista de Microbiologia,** São Paulo, v. 30, n. 4, p. 362-364, 1999.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, 2010. In press.

BRASIL. Lei n.° 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. **Diário Oficial,** Brasília, 03 ago 2010. Seção 1, p. 3-6.

BRAVO, L.; GOVA, L.; LUCUMBERRI, H. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International,** Essex, v. 40, n. 3, p. 393-405, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Serviço de Vigilância Sanitária (SVS). **Doenças transmitidas por alimentos:** informações técnicas. Disponível em: http://www.saude.gov.br. Acesso em: 20 jan. 2011.

BRITO, A. F. R. **Análise de variação sazonal e das atividades antifúngicas e antimicrobiana em óleos essenciais de *Octea porosa* (Ness) Barroso e *Nectandra megapotâmica* (Spreng.) Mez.** 2009. 123 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CARMO, L.S.D.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A. An outbreak of staphylococcal food poisoning in the Municipality of Passos, MG, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** Curitiba, v. 46, n. 4, p. 581-586, 2003.

CATÃO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O.D. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION – CDC. Disponível em: http://www.cdc.gov. Acesso em: 21 jan. 2001.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA. **PIB do Agronegócio.** Disponível em: http://www.cepea.esalq.usp.br. Acesso em: 21 jan. 2011.

SÃO PAULO (ESTADO). CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – CVE. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br. Acesso em: 21 jan. 2011.

CEZAROTTO, V.S. **Influência da sazonalidade nos constituintes químicos, atividade antimicrobiana e antioxidante das partes aéreas de *Baccaris articulata* (Lam.) Pers e *Achyrocline satureoides* (Lam.), D. C.** 2009. 98 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

CHAE, M.S.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L.T.; MACKERETH, R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology,** London, v. 23, n. 3, p. 250-259, 2006.

COGO, L.L.; MONTEIRO, C.L.B.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; CUNICO, M.M.; RIBEIRO, M.L.; CAMARGO, E.R.; KUSSEN, G.M.B.; NOGUEIRA, K.S.; COSTA, L.M. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Brazilian Journal of Microbiology,** São Paulo, v. 41, n. 2, p. 304-309, 2010.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews,** Washington, v. 12, n. 4, p. 564-82, 1999.

DAR, J.A.; THOKER, M.A.; KHAN, J.A.; ALI, A.; KHAN, M.A; RIZWAN, M.; BHAT, K.H.; DAR, M.J.; AHMED, N.; AHMAD, S. Molecular epidemiology of clinical and carrier strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the hospital settings of north India. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials,** London, v. 5, n. 22, 2006.

DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. Food antimicrobials: an introdution. In: DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L. (Ed.). **Antimicrobials in food.** Boca Raton: CRC Press, p. 1-10, 2005.

DE BIASI, B.; GRAZZIOTIN, N.A.; HOFMANN, J.; ARNO, E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** João Pessoa, v. 19, n. 2b, p. 582-585, 2009.

DE MEJÍA, E.G.; SONG, Y.S.; HECK, C.I.; RAMÍREZ-MARES, M.V. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods,** New York. v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

DICKEL, M.L.; RATES, S.M.K.; RITTER, M.R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 109, n. 1, p. 60-71, 2007.

EBRAHIMABADI, A.H.; DJAFARI-BIDGOLI, Z.; MAZOOCHI, A.; KASHI, F.J.; BATOOLI, H. Essential oils composition, antioxidant and antimicrobial activity of the leaves and flowers of *Chaerophyllum macropodum* Boiss. **Food Control,** Guildford, v. 21, n. 8, p. 1173-1178, 2010.

EDUARDO, M.B.P.; FERNANDES, S.; KATSUYA, E.M.; BASSIT, N.P.; TAVECHIO, A.T.; GUILARD, A.C.; VAZ, T.M.I. **Foodborne disease outbreaks in the state of São Paulo, Brazil, 1999-2007.** Atlanta: International Conference on Emerging Infectious Disease, 2008.

EL-MASSRY, K.F.; GHORAB, A.H.; HAMDY, A.S.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 57, n. 12, p. 5265-5270, 2009.

EVANS, W. C.; TREASE, G. **Pharmacognosy.** 15th ed. London: Bailliere Tindall, 2002.

FILIP, R.; LOTITO, S.B.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research,** New York, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science & Technology,** Cambridge, v. 19, n. 3, p. 156-164, 2008.

FAO. **Alimentar al mundo en 2050.** Disponível em: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/018/k6021s.pdf. Acesso em: 20 jan. 2010.

FRANCO, B.G.D.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2005.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the manual. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey´s manual of systematic bacateriology.** New York: Springer-Verlag, 2001.

GEIMBA, M.P.; TONDO, E.C.; OLIVEIRA, F.A.; CANAL, C.W.; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of spvR genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection,** Ames, v. 67, n. 6, p. 1229-1233, 2004.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 3.ed. São Paulo: Varela, 2008.

GHISALBERTI, E. L. Detection and isolation of bioactive natural products. In: COLGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. (Ed.). **Bioactive products:** detection, isolation and structural determination. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 9-57.

GONZALEZ, A.; FERREIRA, F.; VÁZQUEZ, A.; MOYNA, P.; PAZ, E.A. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. **Jounal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 39, n. 3, p. 217-220, 1993.

GOVARIS, A.; SOLOMAKOS, N.; PEXARA, A.; CHATZOPOULOU, P.S. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 137, n. 2-3, p. 175-180, 2010.

HAO, Y.Y.; BRACKETT, R.E.; DOYLE, M.P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. **Journal of Food Protection,** Ames, v. 61, n. 3, p. 307-12, 1998.

HARBORNE, J. **Biochemistry of phenolic compounds.** London: Academic Press, 1964. 618 p.

HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Jounal of Food Science,** Chicago, p. 138-151, 2007.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology,** London, v. 22, n. 4, p. 273-292, 2005.

HOLT, J.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9th ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994.

HORMAECHE, C.E.; PETER, J.D. *Salmonella*, Infection and Immunity. **Encyclopedia of immunology.** Oxford: Elsevier, p. 2131-2133, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da extração vegetal e da silvicultura.** Rio de Janeiro, 2009. v. 24, p. 45.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. **Characteristics of microbial pathogens.** London: Blackie Academic & Professional, 1996. (Microrgansims in Food 5).

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos.** 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JAYAPRAKASHA, G.K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K.K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International,** Essex, v. 36, n. 2, p. 117-122, 2003.

KATALINIC, V.; MOZINA, S.S.; SKROZA, D.; GENERALIC, I.; ABRAMOVIC, H.; MILOS, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, Barking, v. 119, n. 2, p. 715-723, 2010.

KIRAKOSYAN, A. Plant Biotechnology for the production of natural products. In: CSEKE, L.J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P.B.; WARBER, S.L.; DUKE, J.A.; BRIELMANN, H.L. (Ed.). **Natural products from plants.** Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 221-262.

KOSSAH, R.; ZHANG, H.; CHEN, W. Antimicrobial and antioxidant activities of Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit extract. **Food Control,** Guildford, 2010. In press.

LEE, O.H.; LEE, B.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresource Technology,** Essex, v. 101, n. 10, p. 3751-3754, 2010.

LIU, L.; SUN, Y.; LAURA, T.; LIANG, X.; YE, H.; ZENG, X. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, n. 1, p. 35-41, 2009.

LYNCH, M.; PAINTER, M.; WOODRUFF, R.; BRADEN, C. Surveillance for foodborne-disease outbreaks – United States, 1998-2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report, CDC Surveillance Summaries,** Atlanta, v. 55, n. 10, p. 1-34, 2006.

MADALOSSO, G.; BRITO, S.N.; PAVANELLO, E.I.; RAMOS, S.R.T.S.; ARAÚJO, E.S.; JURADO, R.A.R.; BORGHI, M.C.; EDUARDO, M.B. Foodborne disease outbreak caused by *Salmonella enterica* serotype Enteritidis at restaurant, in the city of São Paulo, SP – December 2006. **Boletim Epidemiológico Paulista,** São Paulo, v. 5, n. 55, p. 5-11, 2008.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.M. **Brock biología de los microorganismos.** 10.ed. Madri: Prentice Hall Hispanamericana, 2004.

MAHMUD, S.; SALEEM, M.; SIDDIQUE, S.; AHMED, R.; KHANUM, R.; PERVEEN, Z. Volatile components, antioxidant and antimicrobial activity of *Citrus acida* var. sour lime peel oil. **Journal of Saudi Chemical Society,** Riade, v. 13, n. 2, p. 195-198, 2009.

MAIER, T.; SCHIEBER, A.; KAMMERER, D.R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry,** Barking, v. 112, n. 3, p. 551-559, 2009.

MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry,** Barking, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007.

MAKRIS, D.P.; ANDRIKOPOULOS, N.K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis,** San Diego, v. 20, n. 2, p. 125-132, 2007.

MOREIRA, A.C.; MÜLLER, A.C.A.; PEREIRA JR, N.; ANTUNES, A.M.S. Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: policy, law and statistics. **World Patent Information,** London, v. 28, n. 1, p. 34-42, 2006.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.S. **Microbiologia médica.** 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 948 p.

NAIDU, A.S. **Natural food antimicrobial systems.** Boca Raton: CRC Press, 2000.

NUTTAWEE, N. Dairy Products. In: SCHAECHTER, M. (Ed.). **Encyclopedia of microbiology.** Oxford: Academic Press, 2009.

NYCHAS, G.J.E.; TASSOU, S.C.; BOARD, R.G. Phenolic extract from olives: inhibition of *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology,** Oxford, v. 10, n. 5, p. 217-220, 1990.

OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; FERREIRA, I.C.F.R.; BENTO, A.; ESTEVINHO, L.; PEREIRA, J.A. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. **Food and Chemical Toxicology,** London, v. 46, n. 7, p. 2326-2331, 2008.

PAGLIOSA, C.M.; VIEIRA, M.A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A.L.B.; AMANTE, E.R.; AMBONI, R.D.M.C. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry,** Barking, v. 122, n. 1, p. 173-178, 2010.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia.** 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PELTZER, P.M.; LAJMANOVICH, R.C.; SÁNCHEZ-HERNANDEZ, J.C.; CABAGNA, C.C.; ATTADEMO, A.M.; BASSÓ, A. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** Zabrze, v. 70, n. 1, p. 185-197, 2008.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W.; GHEESLING, L.L. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology,** Paris, v. 152, n. 10, p. 907-909, 2001.

PRODUCE SAFETY PROJECT. **Health-related costs from foodborne illness in the United States.** Disponível em: http://www.producesafetyproject.org. Acesso em: 20 jan. 2011.

PRZYGODDA, F.; MARTINS, Z.N.; CASTALDELLI, A.P.A.; MINELLA, T.V.; VIEIRA, L.P.; CANTELLI, K.; FRONZA, J. PADOIN, M. Effect of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) on serum cholesterol, triacylglycerides and glucose in Wistar rats fed a diet supplemented with fat and sugar. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** João Pessoa, v. 20, n. 6, p. 956-961, 2010.

PUUPPONEN-PIMIA, R.; NOHYNEK, L.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTEY, K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology,** Oxford, v. 90, n. 4, p. 494-507, 2001.

RAY, B. **Fundamental food microbiology.** 3th ed. Boca Raton: CRC Press, 2003.

ROBERTO, I.C.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; VITOLO, M.; SATO, S.; SILVA, S.S. Xylitol production by *Candida guillermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues. **Bioresource Technology,** Essex, v. 51, n. 2-3, p. 255-257, 1995.

RODRIGUES, K.L.; MOREIRA, A.N.; ALMEIDA, A.T.S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M.J.; BROD, C.S.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 34, p. 297-299, 2004.

VAQUERO, R.M.J.; TOMASSINI, S.L.R.; MANCA, N.M.C.; SAAD, S.A.M. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. **Food Control,** Guildford, v. 21, n. 5, p. 779-785, 2010.

SABULAL, B.; DAN, M.; AJ, J.; PRADEEP, N.S.; VALSAMMA, R.K.; GEORGE, V. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry,** Oxford, v. 67, n. 22, p. 2469-2473, 2006.

SAMEC, D.; GRUZ, J.; STRNAD, M.; KREMER, D.; KOSALEC, I.; GRUBESIC, R.J.; KARLOVIC, K.; LUCIC, A.; PILJAC-ZEGARAC, J. Antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L. (Lamiaceae) flower and leaf infusions (*Teucrium arduini* L. antioxidant capacity). **Food and Chemical Toxicology,** London, v. 48, n. 1, p. 113-119, 2010.

SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.O.; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, M.A.R. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 124, n. 2, p. 289-294, 2009.

SANTOS, A.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial,** Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SÃO PAULO (Estado). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 a 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico,** São Paulo, v. 6, n. 1, p. 2-7, 2005.

SCHAECHTER, M. *Escherichia coli*. In: SCHAECHTER, M. (Ed.). **Encyclopedia of microbiology.** Oxford: Academic Press, 2009.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J.C.; TOURNIER, H.; PRIETO, J.M.; SPEGAZZINI, E.; DEBENEDETTI, S.; MOSCA, S.M. Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex brasiliensis*: a comparative study with *Ilex paraguariensis* (yerba mate). **Food Research International,** Essex, v. 42, n. 10, p. 1403-1409, 2009.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals.** Boca Raton: CRC Press, 2004.

SIERRA-ALVAREZ, R.; LETTINGA, G. The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology,** Berlin, v. 34, n. 4, p. 544-550, 1991.

SIKKEMA, J.; BONT, J.A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews,** Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. (Ed.). **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, W.P.D.; LIMA, A.S.; GANDRA, E.A.; ARAÚJO, M.R.; MACEDO, M.R.P.; DUVAL, E.H. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 911-916, 2004.

SILVA, Z.N.D.; CUNHA, A.S.; LINS, M.C.; CARNEIRO, L.A.M., ALMEIDA, A.C.F.; QUEIROZ, M.L.P. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista de Saúde Pública,** São Paulo, v. 35, n. 4, p. 375-379, 2001.

SURESH BABU, K.; SRINIVAS, P.V.; PRAVEEN, B.; KISHORE, H.; SURYANARAYANA, M.; RAO, J.M. Antimicrobial constituents from the rhizomes of *Rheum emodi*. **Phytochemistry,** Oxford, v. 62, n. 2, p. 203-207, 2003.

TAJKARIMI, M.M.; IBRAHIM, S.A.; CLIVER, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, 2010.

TAN, M.; ZHOU, L.; QIN, M.; LI, D.; JIANG, W.; WANG, Y.; HAO, X. Chemical composition and antimicrobial activity of the flower oil of *Russowia sogdiana* (Bunge) B. Fedtsch. (Asteraceae) from China. **The Journal of Essential Oil Research,** Wheaton, v. 19, n. 2, p. 197-200, 2007.

TASSOU, C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G.J.E. Inhibition of *Salmonella* enteritidis and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International,** Essex, v. 33, n. 3-4, p. 273-280, 2000.

TAVARES, L.S.; SANTOS, M.O.; VICCINI, L.F.; MOREIRA, J.S.; MILLER, R.N.G.; FRANCO, O.L. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. **Peptides,** New York. v. 29, n. 10, p. 1842-1851, 2008.

TRABULSI, L.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 5.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008. 760 p.

TRAVAGIN, B. N. F. S. **Estudo da formação de biofilmes de *L. monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios.** 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TSAI, T.-H.; TSAI, T-H. ; WU, W-H. ; TSENG J.T-P.; TSAI, P.-J. In vitro antimicrobial and anti-inflammatory effects of herbs against *Propionibacterium acnes*. **Food Chemistry,** Barking, v. 119, n. 3, p. 964-968, 2010.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry.** Dordrecht: Springer Verlag, 2006.

VIGIL, A.L.; PALOU, E.; ALZAMORA, S.M. Naturally occurring compounds: plant sources. In: DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L. (Ed.). **Antimicrobials in food.** Boca Raton: CRC Press, 2005.

WAAGE, A.S.; VARDUND, T.; KAPPERUD, G. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. **Journal of Applied Microbiology,** Oxford, v. 87, n. 3, p. 418-28, 1999.

WEI, Q.; MA, X.; DONG, J. Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyroligneous acids from walnut tree branches. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis,** Amsterdam, v. 87, n. 1, p. 24-28, 2010.

YIM, N.; HA, D.T.; TRUNG, T.N.; KIM, J.P.; LEE, S.; NA, M.; JUNG, H.; SU, H.; KIM, Y.H.; BAE, K. The antimicrobial activity of compounds from the leaf and stem of *Vitis amurensis* against two oral pathogens. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,** Oxford, v. 20, n. 3, p. 1165-1168, 2010.

ZAFFARI, C.B.; MELLO, J.F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 862-867, 2007.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. (Ed.). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. Florianópolis: Ed. UFSC/UFRGS, 1999.

2 POTENCIAL ANTIMICROBIANO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Resumo

Resíduos agroindustriais são ricos em compostos bioativos. Sua utilização como fonte de antimicrobianos naturais poderá fornecer alternativas à indústria de alimentos, à medida que possibilitará a substituição de conservantes sintéticos por compostos naturais, além de evitar o descarte de subprodutos e a diminuição do impacto ambiental. Portanto, neste trabalho foram avaliados o potencial antimicrobiano e a composição química de resíduos agroindustriais contra micro-organismos patogênicos de importância em alimentos. Resíduos de talos de beterraba, película de amendoim, bagaços de uvas Pinot Noir, bagaços e sementes de uvas Petit Verdot, borra de fermentação de uvas tintas e bagaço de goiaba apresentaram atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. As concentrações inibitórias mínimas variaram de 0,78 a 25 $mg.ml^{-1}$. Os resíduos com atividade antimicrobiana apresentaram os mais elevados teores de compostos fenólicos totais dentre os resíduos estudados (3,73 a 40,02 g $EAG.100g^{-1}$). As análises por CG-EM possibilitaram a identificação dos ácidos caféico, gálico, ferúlico e ρ-cumárico, além dos flavonóides quercetina, miricetina e epicatequina nos resíduos que apresentaram atividade antimicrobiana. Este estudo demonstra que resíduos agroindustriais de indústrias vinícolas e de processamento de alimentos poderão ser utilizados como fonte de pesquisas de novos compostos antimicrobianos, para uso pela indústria de alimentos e bebidas como conservantes naturais.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais; Atividade antimicrobiana; Compostos bioativos; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*

Abstract

Antimicrobial potencial and chemical composition of agroindustrial residues

Agroindustrial residues are full of bioactive compounds. Their use as natural antimicrobial sources may provide alternatives to the food industry regarding the replacement of synthetic preservatives by natural compounds thereby avoiding the disposal of by-products and reducing their environmental impact. Thus, in this work, antimicrobial potential and chemical composition of agroindustrial residues on relevant pathogenic microorganisms in food were evaluated. Residues of beet stems, peanut skin, pomace of Pinot Noir grape, pomace and seeds of Petit Verdot grape, fermentation lees of red grapes and pomace of guava showed antimicrobial activity on *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Minimum inhibitory concentrations ranged from 0.78 to 25 $mg.ml^{-1}$. Residues with antimicrobial activity revealed the highest levels of total phenolic compounds among the considered residues (3.73 to 40.02g $EAG.100g^{-1}$). Analysis by CG-MS identified caffeic, gallic, ferulic, and ρ-coumaric acid, as well as quercetin, myricetin, and epicatechin flavonoids on residues which proved antimicrobial activity. This study asserts that agroindustrial residues of wine and food-processing industries may be used as a source for research on new antimicrobial compounds as natural preservatives for food and beverage industry.

Keywords: Agroindustrial residues; Antimicrobial activity; Bioactive compounds; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*

2.1 Introdução

O uso de antimicrobianos em alimentos se faz cada vez mais necessário à medida que a economia global impulsiona a produção e transporte de alimentos em escala mundial, porém, para que se garanta o fornecimento de alimentos de qualidade, o uso de preservativos torna-se imprescindível. (DAVIDSON; BRANEN, 2005). A crescente demanda por produtos naturais tem causado mudanças significativas em diversos setores industriais, inclusive nos setores alimentício e de bebidas, os quais têm buscado fontes naturais que sirvam de matéria-prima para o desenvolvimento de grande variedade de produtos (MOREIRA et al., 2006). O potencial de aplicação de compostos antimicrobianos naturais pela indústria alimentícia é enorme, e estudos para incorporação de antimicrobianos em alimentos, bem como para maximizar sua biofuncionalidade ocorrem no mundo todo (NAIDU, 2000).

Resíduos agroindustriais são gerados em grande quantidade pela indústria de alimentos e seu descarte cria sérios problemas ambientais (MAKRIS et al., 2007). Estudos têm demonstrado a presença de compostos bioativos em diferentes tipos de resíduos agroindustriais, representando valioso potencial de aplicação na indústria (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001; BALASUNDRAM et al., 2006). Sua reutilização diminuiria os riscos ambientais causados pelo seu descarte, além de proporcionar fonte de rentabilidade para populações que vivem no entorno de regiões industriais geradoras desses resíduos (ANASTASIADI et al., 2008). Diferentes tipos de resíduos podem ser utilizados como fonte de matéria-prima na pesquisa por antimicrobianos naturais. Estudos têm detectado compostos bioativos com atividade antimicrobiana em sementes de uva (JAYPRAKASHA et al., 2003; BAYDAR et al., 2004) bem como em seus bagaços (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001; KATALINIC et al., 2010), cascas de romã (AL-ZOREKY, 2009), cascas de limão (MAHMUD et al., 2009), cascas verdes de nozes (OLIVEIRA et al., 2008), caroço de manga (ABDALLA et al., 2007), dentre outros.

Neste estudo, resíduos da indústria de alimentos e bebidas e de grandes centros de distribuição de frutas e hortaliças foram avaliados quanto à presença de compostos antimicrobianos com atividade sobre micro-organismos comumente associados a toxinfecções alimentares, tais como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*. Além disso, também foi determinada a composição química dos resíduos que apresentaram os maiores potenciais antimicrobianos dentre os avaliados.

2.2 Materiais e métodos

Os seguintes reagentes P.A. foram utilizados no experimento: etanol e metanol (Synth®), Reagente de Folin-Ciocalteu e Carbonato de Sódio (Dinâmica®); meios de cultura Caldo Soja Tripticaseína (TSB) (Difco®), Ágar Bacteriológico e Extrato de Levedura (Oxoid®); indicador redox Resazurina e N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) (Sigma-Aldrich®).

2.2.1 Resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais de bagaço de goiaba (proveniente de indústria situada em Monte Alto, Estado de São Paulo) e de engaços de uva Cabernet Sauvignon, bagaços de uvas Pinot Noir e Isabel (provenientes do processamento vinícola de uvas na região de Bento Gonçalves, Estado do Rio Grande do Sul) foram coletados no primeiro semestre de 2009. No segundo semestre do mesmo ano, foram coletados os resíduos de bagaços de uva Petit Verdot e Verdejo, engaço de uva Syrah e Verdejo, sementes de uva Petit Verdot e borra de fermentação de uvas tintas (provenientes da Embrapa Semi-Árido, situada em Petrolina, Estado de Pernambuco), além de bagaço de tomate (proveniente de indústria situada em Monte Alto, Estado de São Paulo). Os resíduos de vegetais (talos de couve, de beterraba, de brócolis, de nabo, folhas de cenoura, de rabanete, cascas de abóbora e de maracujá) foram coletados em hortas e feiras da região de Piracicaba, Estado de São Paulo, no primeiro semestre de 2009. No mesmo período, foram coletadas também as folhas de alcachofra (proveniente de indústria situada em São Roque, Estado de São Paulo) e a película de amendoim (fornecida por indústria localizada em Dumont, Estado de São Paulo). Com exceção da película de amendoim, todos os resíduos foram liofilizados durante 5 dias a 60-100 μHg e a –50°C (Liofilizador Liotop® L101) e armazenados à temperatura de –18°C até o momento do uso (Figura 1).

2.2.2 Procedimento de extração

Os resíduos agroindustriais liofilizados foram triturados em moinho mecânico (IKA® A11). Para preparo dos extratos, as amostras (1:8 m/v) foram imersas em soluções etanólicas (40:60) e metanólicas (30:70) e mantidas em repouso sob refrigeração por 96 horas. A cada 24 horas, os

extratos foram filtrados em papel de filtro qualitativo 12,5 μm (Qualy®) e o material retido no mesmo adicionado aos respectivos solventes de extração. Os solventes presentes nos filtrados foram eliminados sob baixa pressão à temperatura de 45°C (evaporador rotativo Tecnal®), sendo que a fase aquosa resultante foi liofilizada (Liotop® L101). Os extratos liofilizados foram acondicionados em temperatura de refrigeração até o momento das análises (Figura 2). Para a realização dos ensaios, os extratos foram dissolvidos em caldo soja tripticaseína (TSB).

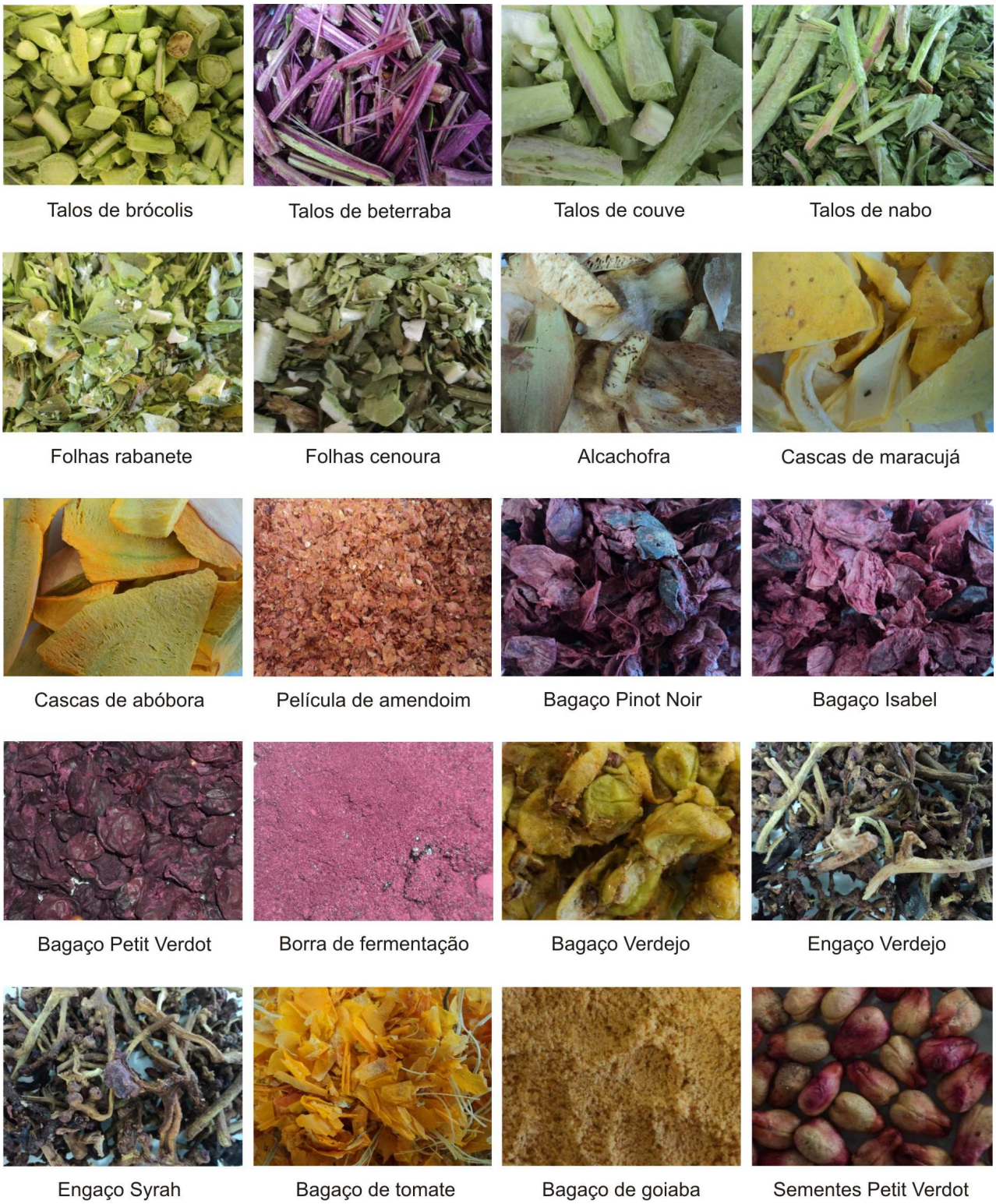


Figura 1 – Aspecto dos resíduos agroindustriais liofilizados

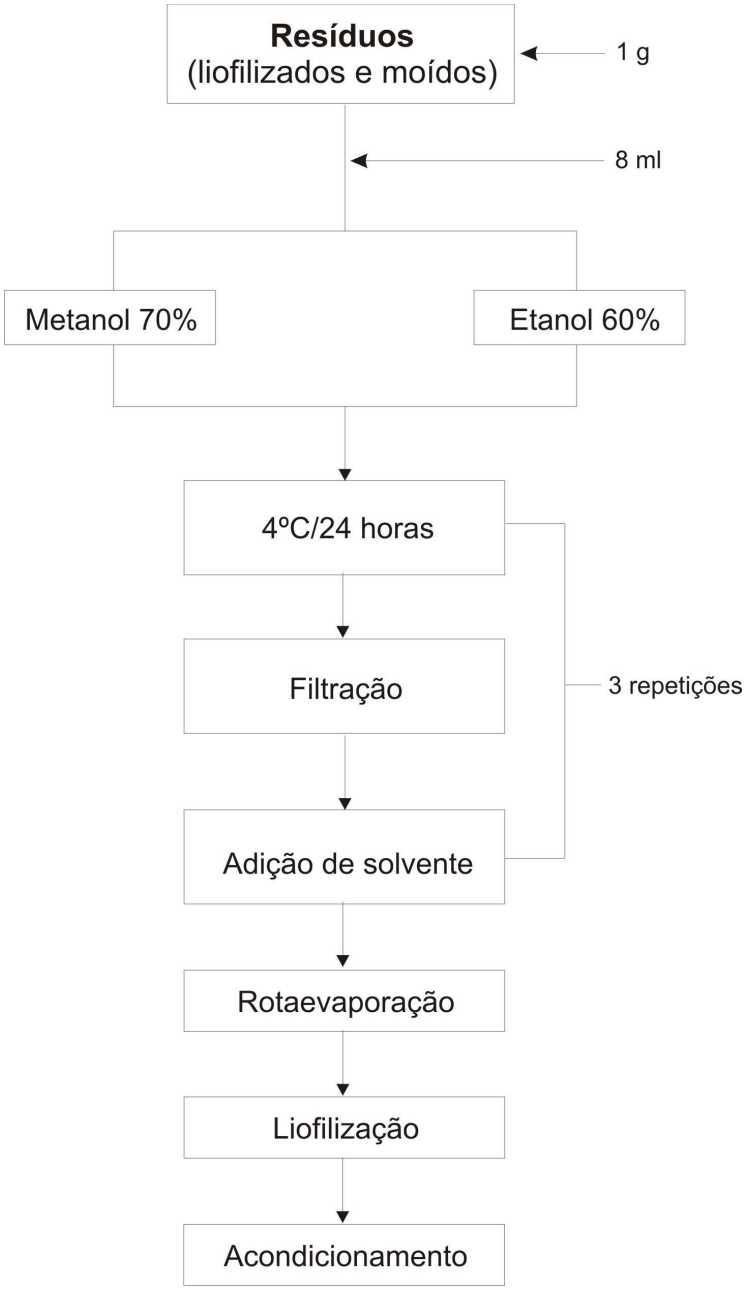


Figura 2 – Fluxograma de extração para os resíduos agroindustriais

2.2.3 Atividade antimicrobiana

2.2.3.1 Micro-organismos testados

A atividade antimicrobiana foi avaliada sobre micro-organismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 07644) e Gram-negativos (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Escherichia coli* ATCC 25922), provenientes da coleção de cepas do Laboratório de Higiene e Laticínios da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Esalq/USP.

2.2.3.2 Método de difusão em ágar

O *screning* da atividade antimicrobiana dos extratos foi realizado por meio da técnica de difusão em ágar de acordo com preconizações do Clinical and Laboratory Stardads Institute – CLSI (2009a) e Duarte et al. (2003), com modificações. Duzentos microlitros de inóculo padronizado ($1x10^8$ UFC.mL^{-1}) de cada microrganismo foram transferidos para 200 ml de caldo soja tripticaseína (TSB) acrescido de 0,7% de ágar bacteriológico a 45°C, de modo a se obter uma população bacteriana final de $1,5x10^5$ UFC.ml^{-1}. Com auxílio de uma proveta graduada esterilizada, foram transferidos para placas de Petri (150 MM) 70 ml do ágar inoculado, no qual foram produzidos, através de uma bomba de vácuo, poços com 8 mm de diâmetro, dentro dos quais foram distribuídos 40 μL dos extratos (100 mg.mL^{-1}). As placas foram mantidas em repouso por 1 hora à temperatura ambiente para permitir a difusão dos extratos no meio. Como controle negativo utilizou-se 40 μL de TSB; como controle positivo, 40 μL de solução de clorexidina 0,12% (v/v). Foram feitas triplicatas para cada extrato testado.

2.2.3.3 Concentração inibitória e bactericida mínima (CIM/CBM)

Para determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo, de acordo com o preconizado pelo CLSI (2009b), em microplacas de 96 poços. As concentrações dos extratos foram obtidas por diluição seriada de razão 2 na própria microplaca, resultando em concentrações que variaram de 25 mg.mL^{-1} a 0,78 mg.mL^{-1}, após adição de caldo TSB inoculado ($1\text{-}2x10^5$ UFC.mL^{-1}). O volume final para cada poço foi de 200 μL. Os controles foram compostos da seguinte maneira: controle positivo (200 μL de TSB acrescido de clorexidina 0,12% v/v) e controle negativo (200 μL de TSB estéril). Duzentos microlitros de TSB estéril foram utilizados

como controle de esterilidade do caldo. Após incubação a 35°C por 24 horas, todos os poços receberam 30 μL de solução de resazurina (0,01% m/v), com o objetivo de verificar, por meio de leitura visual, em quais poços houve crescimento bacteriano. Qualquer evidência na mudança de coloração foi considerada como indicativo de crescimento bacteriano. Para determinação da CBM, 10 μL de caldo foram retirados dos poços considerados inibitórios e semeados em placas de Petri contendo ágar tripticase de soja (TSA), as quais foram incubadas a 35ºC por 24 horas. A CBM foi considerada como a menor concentração na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura (CABRAL et al., 2009). Os experimentos foram realizados em triplicata para cada extrato.

2.2.3.4 Curvas de crescimento

O efeito dos extratos sobre o crescimento dos micro-organismos testados foi avaliado utilizando-se microplacas de 96 poços (GUTIERREZ et al., 2008). Todos os poços receberam 100 μL de TSB estéril. No primeiro poço de cada coluna foram adicionados 100 μL dos extratos a serem testados e seguiu-se a diluição seriada de razão 2 com o auxílio de uma micropipeta multicanal, obtendo-se concentrações finais que variaram de 25 $mg.mL^{-1}$ a 0,78 $mg.mL^{-1}$, após adição de 100 μL de caldo inoculado ($1\text{-}2x10^5$ $UFC.mL^{-1}$). Os controles consistiram em 200 μL de TSB inoculado (controle negativo), 200 μL de TSB inoculado acrescido de clorexidina 0,12% v/v (controle positivo) e 200 μL de caldo TSB acrescido de extrato, sem inóculo (branco). As microplacas foram incubadas em espectrofotômetro (Victor™X3, PerkinElmer®) a 35°C por 18 horas e as leituras das absorbâncias realizadas em intervalos de 1 hora a 600 nm. Foram feitas triplicatas para cada extrato testado.

2.2.4 Composição química

2.2.4.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado com o reagente de Folin-Ciocalteau de acordo com metodologia descrita por Singleton et al. (1999). Quinhentos microlitros dos extratos (10 $mg.ml^{-1}$) foram misturados a 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteau (1:10) e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) (4% m/v). Após incubação no escuro à temperatura ambiente por 2 horas, foi feita a leitura de absorbância a 740 nm em espectrofotômetro de luz visível (Femto®

Plus) a 740 nm. O teor de fenólicos totais foi expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG) em g por 100 g de amostra (%), a partir da curva padrão de ácido gálico. Para o ácido gálico, a curva foi estabelecida pela plotagem da concentração ($\mu g.ml^{-1}$) *versus* absorbância (nm) ($y = 42,71x + 0,3187$; $R^2 = 0,9997$, onde y é a absorbância e x é a concentração).

2.2.4.2 Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM)

Os extratos que apresentaram as melhores atividades antimicrobianas foram submetidos à análise de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG-EM), a fim de se identificar sua composição química. *Remoção de interferentes das amostras pela técnica SPE (Solid Phase Extraction)*: a purificação das amostras foi feita com a finalidade de eliminar os interferentes das amostras através da extração em fase sólida (SPE). Os extratos liofilizados foram rediluídos em água e acidificados até pH 2,0. Antes da aplicação das amostras, cartuchos SPE-LC18 (Supelco, 2 g) foram condicionados com metanol e água ácida (pH 2,0). Alíquotas de 5 ml dos extratos foram aplicadas aos cartuchos, os quais foram lavados com 15 ml de água ácida repetidas vezes. Logo após, os compostos adsorvidos foram eluídos em metanol P.A. e a fração foi coletada em *vial* silanizado e evaporada em corrente de nitrogênio. *Derivatização (formação de derivados do trimetilsilil – TMS)*: os extratos purificados foram derivatizados, a fim de se adequar as amostras, de caráter fortemente polar, para a técnica de CG-EM. As frações obtidas através da purificação por SPE foram acrescidas de 100 μl do reagente N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA). A mistura foi homogeneizada em vórtex e mantida em estufa à 60°C durante 10 minutos; em seguida, o reagente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e o produto da derivatização, rediluído em hexano (400-600 μl). Após homogeneização, o sobrenadante foi transferido a um *vial* para injeção em CG-EM. *Análise cromatográfica*: os extratos foram analisados através de cromatógrafo gasoso Shimadzu® (Modelo GC-2010) acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu® (QP 2010 *Plus*). A separação ocorreu em coluna capilar RTX5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). A temperatura do injetor foi de 280ºC e o volume de injeção foi de 0,5 μl no modo "*splitless*". A interface foi mantida a 280ºC e o detector operou no modo "*scanning*" (m/z 40-800). Condições cromatográficas: temperatura inicial de 80ºC (1 minuto), aquecimento até 250°C, com taxa de $20°C.min^{-1}$ (1 minuto), aquecimento até 300ºC (5 minutos) a uma taxa de $6ºC.min^{-1}$, aquecimento a 310ºC (10 minutos) a uma taxa de $15ºC.min^{-1}$, e aquecimento a 320ºC (10 minutos) a uma taxa de $20ºC.min^{-1}$, totalizando 40 minutos de análise. A

integração foi feita por meio do *software* LabSolutions-CGMS. Flavonóides, ácidos fenólicos e derivados foram identificados por comparação com os dados obtidos do CG-EM, tais como tempo de retenção e fragmentação iônica, de padrões autênticos silanizados e eluídos nas mesmas condições, e com a biblioteca Wiley 8.

2.2.5 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada através do software Statistical Analysis System (SAS 2002). O Teste de Tukey (0,5% de probabilidade) foi utilizado para comparação de médias.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Atividade antimicrobiana

Preliminarmente, o potencial antimicrobiano dos extratos foi avaliado de forma qualitativa através do método de difusão em ágar. Dos 20 resíduos avaliados, 7 apresentaram zonas de inibição em pelo menos um dos micro-organismos testados, os quais foram: a) talos de beterraba, b) película de amendoim, c,d) bagaços de uvas Petit Verdot e Pinot Noir, e) sementes de uva Petit Verdot, f) borra de fermentação de uvas tintas e g) bagaço de goiaba (Tabela 1 e Figura 3). A análise quantitativa do potencial antimicrobiano dos extratos foi feita por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM); os extratos que apresentaram as menores CIM frente à *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram, respectivamente, o extrato metanólico de película de amendoim (0,78 $mg.mL^{-1}$) e o extrato etanólico de bagaço de goiaba (1,56 $mg.mL^{-1}$) (Tabela 2). A concentração bactericida mínima do extrato de película de amendoim mostrou-se relativamente baixa (1,56 $mg.mL^{-1}$). Estudos já demonstraram a atividade antioxidante desse resíduo (YU et al. 2005; LOU et al., 2004; O'KEEFE; WANG, 2006; DAVIS et al., 2010), porém não há referências quanto à sua atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O extrato de bagaço de goiaba apresentou a maior atividade antimicrobiana sobre *L. monocytogenes*. Seu potencial bactericida, porém, mostrou-se reduzido, com um elevado valor de CBM (12,5 $mg.mL^{-1}$). O potencial antimicrobiano de partes de goiaba (*Psidium guajava*), como folhas e cascas, tem sido pesquisado (MAGASSOUBA et al., 2007;

GUTIÉRREZ et al., 2008; PELEGRINI et al., 2008), porém pouco se sabe sobre a exploração e utilização de resíduos provenientes do processamento da goiaba por agroindústrias (CORREIA et al., 2004).

A atividade inibitória de extratos de partes de uva, como bagaço e sementes, sobre bactérias Gram-positivas está em concordância com os resultados encontrados em estudos anteriores (JAYAPRAKASHA et al., 2003; BAYDAR et al., 2004). Atividade antilistéria de uvas e subprodutos de vinificação – tais como bagaço, sementes e engaços – reforçam o potencial de extração de compostos antimicrobianos nesse tipo de resíduo (ANASTASIADI et al., 2008), embora o presente estudo não tenha demonstrado atividade em engaços de uvas brancas. Apesar de ser um subproduto vinícola ainda pouco explorado, a borra de fermentação de uvas tintas apresentou uma das menores CIM detectadas para *S. aureus* dentre os resíduos pesquisados, assim como o extrato metanólico de talos de beterraba; alguns trabalhos relatam o potencial antioxidante e antimicrobiano da beterraba, porém, utilizando-se o tubérculo, e não os talos (RAUHA et al., 2000; REY et al., 2005).

Nenhum dos extratos inibiu o crescimento de *S.* Enteritidis e *E. coli* (Tabela 1). Bactérias Gram-negativas apresentam um segundo sistema de bicamadas lipídicas, a membrana externa, que dificulta a penetração de substâncias antimicrobianas, conferindo-lhes alto grau de resistência (SCHVED et al., 1994). Esses micro-organismos comumente apresentam valores de concentrações inibitórias mínimas significativamente superiores para muitos antibacterianos quando comparados com bactérias Gram-positivas (HÖLTJE, 2004).

Tabela 1 – Halos de inibição (mm) de extratos metanólicos e etanólicos de resíduos agroindustriais sobre micro-organismos patogênicos

	S. aureus		*L. monocytogenes*		*S.* Enteritidis		*E. coli*	
Resíduos	MeOH	EtOH	MeOH	EtOH	MeOH	EtOH	MeOH	EtOH
Talo de brócolis	-	-	-	-	-	-	-	-
Talo de beterraba	10,00±0,00	-	12,00±0,00	-	-	-	-	-
Talo de couve	-	-	-	-	-	-	-	-
Talo de nabo	-	-	-	-	-	-	-	-
Folhas de rabanete	-	-	-	-	-	-	-	-
Folhas de cenoura	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcachofra	-	-	-	-	-	-	-	-
Casca de maracujá	-	-	-	-	-	-	-	-
Cascas de abóbora	-	-	-	-	-	-	-	-
Película de amendoim	18,00±0,00	20,00±0,00	12,33±0,57	14,00±0,00	-	-	-	-
Bagaço de Pinot Noir	10,67±0,57	10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	-	-	-	-
Bagaço de Isabel	-	-	-	-	-	-	-	-
Bagaço de Petit Verdot	12,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	-	-	-	-	-
Borra de fermentação	10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	-	-	-	-
Bagaço de Verdejo	-	-	-	-	-	-	-	-
Engaço de Verdejo	-	-	-	-	-	-	-	-
Engaço de Syrah	-	-	-	-	-	-	-	-
Bagaço de tomate	-	-	-	-	-	-	-	-
Bagaço de goiaba	10,00±0,00	10,00±0,00	12,00±0,00	12,67±0,57	-	-	-	-
Sementes de P. Verdot	16,00±0,00	14,00±0,00	12,00±0,00	10,00±0,00	-	-	-	-

Médias das triplicatas ± desvio-padrão
MeOH: extratos metanólicos / EtOH: extratos etanólicos
- : sem inibição

Tabela 2 – Concentrações Inibitória e Bactericida Mínima (CIM/CBM) (em $mg.mL^{-1}$) de extratos metanólicos e etanólicos de resíduos agroindustriais com atividade antimicrobiana

	S. aureus				*L. monocytogenes*			
	MeOH		EtOH		MeOH		EtOH	
Resíduo	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Talo de beterraba	3,13	3,13	-	-	12,5	25,00	-	-
Película de amendoim	0,78	1,56	0,78	1,56	3,13	3,13	3,13	3,13
Bagaço Pinot Noir	6,25	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	12,5
Bagaço Petit Verdot	3,13	6,25	6,25	12,5	12,5	25,00	-	-
Borra de fermentação	3,13	6,25	1,56	12,5	6,25	25,00	12,5	25,00
Bagaço de goiaba	3,13	3,13	3,13	6,25	3,13	12,5	1,56	12,5
Sementes Petit Verdot	3,13	3,13	1,56	3,13	6,25	12,5	6,25	12,5

MeOH: extratos metanólicos / EtOH: extratos etanólicos

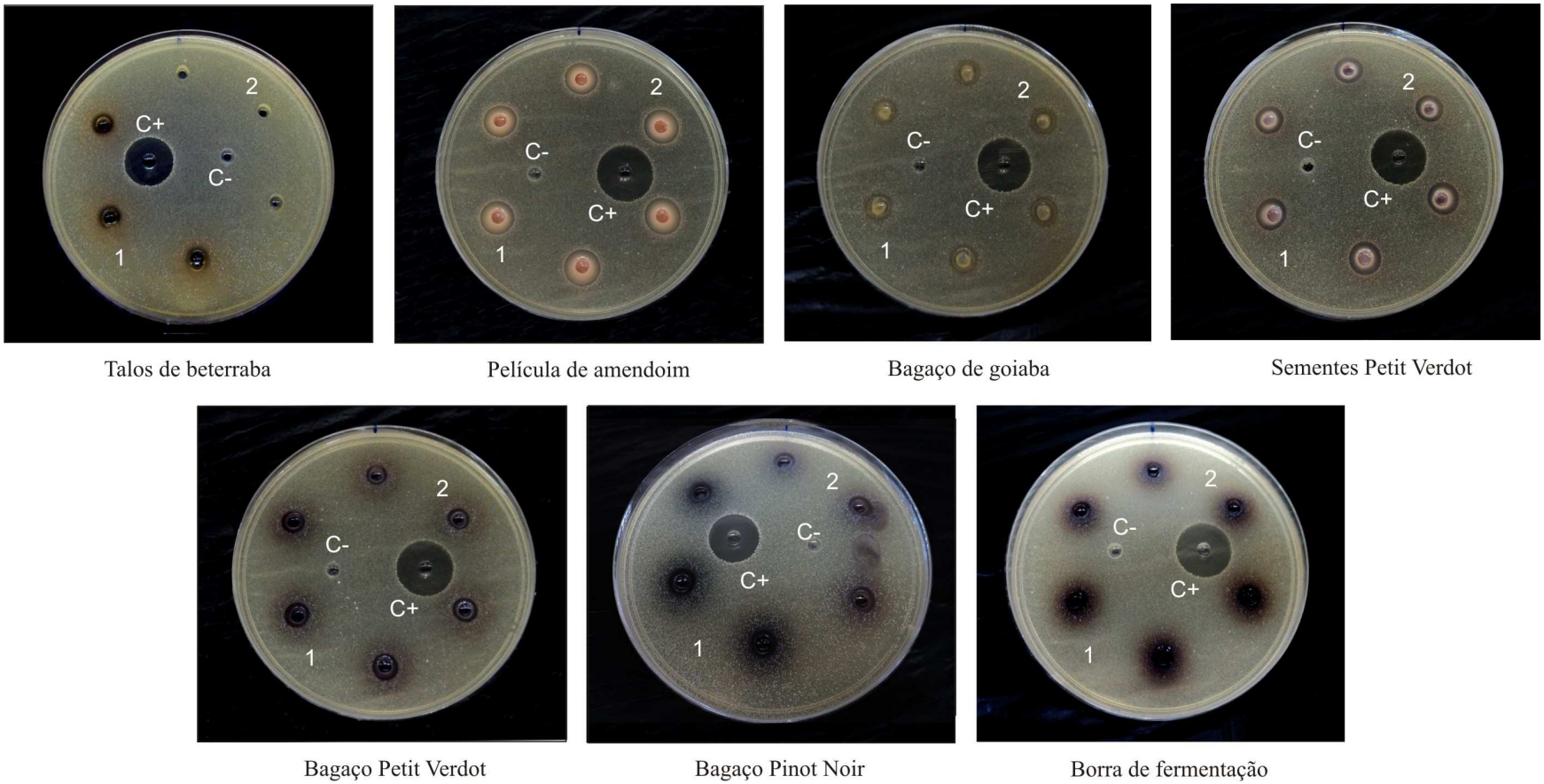


Figura 3 – Halos de inibição de *S. aureus* (ATCC 25923) pelo teste de difusão em ágar para *screening* da atividade antimicrobiana dos resíduos agroindustriais

Legenda: 1: triplicata do extrato metanólico; 2: triplicata do extrato etanólico; C+: controle positivo (clorexidina 0,12%); C-: controle negativo (caldo TSB)

Resultados para *L. monocytogenes* não representados

O efeito dos resíduos sobre o crescimento microbiano foi analisado através das curvas de crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes* frente aos seis extratos de maior atividade. Para isso, estabeleceu-se a comparação entre 2 concentrações: a CIM e a concentração imediatamente inferior à CIM, denominada de sub-CIM. A análise das curvas de crescimento confirmou a atividade antimicrobiana dos extratos e suas respectivas CIM. Para todos os extratos avaliados, a sub-CIM, apesar de não inibir o crescimento bacteriano *in vitro*, proporcionou aumento da fase *lag*, quando comparadas suas curvas com os controles negativos (Figuras 4 e 5). Para *S. aureus*, o extrato de bagaço de goiaba em sua concentração sub-CIM quadruplicou a fase *lag* do crescimento bacteriano, demonstrando o potencial de seu uso mesmo em concentrações menores que as encontradas para CIM. Para *L. monocytogenes*, o aumento na duração do período de adaptação do microrganismo ao meio também pôde ser observado, principalmente para a concentração sub-CIM do extrato metanólico de talos de beterraba (Figura 5).

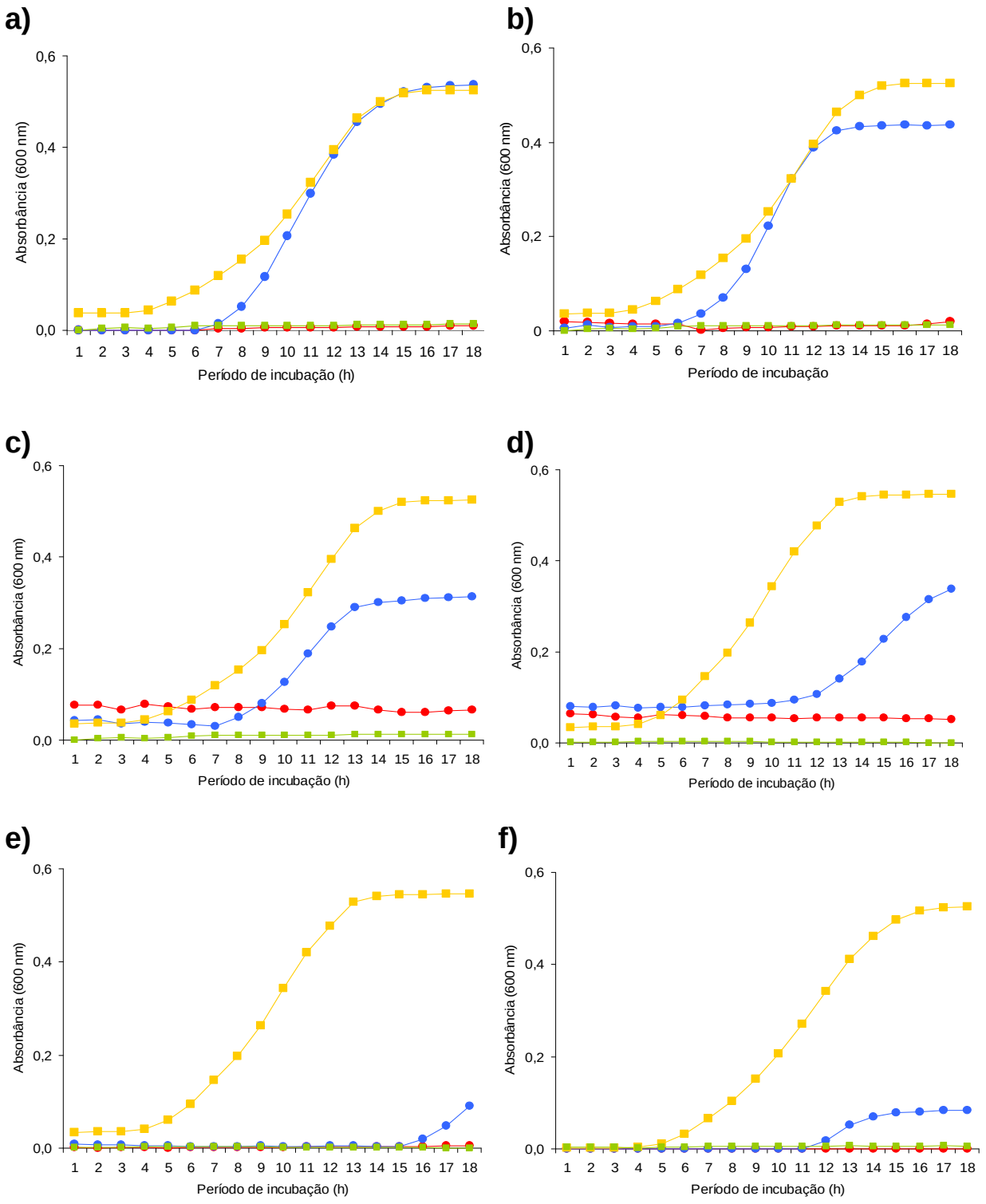


Figura 4 – Curvas de crescimento de *S. aureus* frente a extratos metanólicos (MeOH) e etanólicos (EtOH) de resíduos agroindustriais em diferentes concentrações.

Legenda: a) talos de beterraba (MeOH); b) película de amendoim (MeOH); c) bagaço Petit Verdot (MeOH); d) borra de fermentação (EtOH); e) bagaço de goiaba (EtOH); sementes Petit Verdot (EtOH).

controle negativo — controle positivo — sub-CIM — CIM

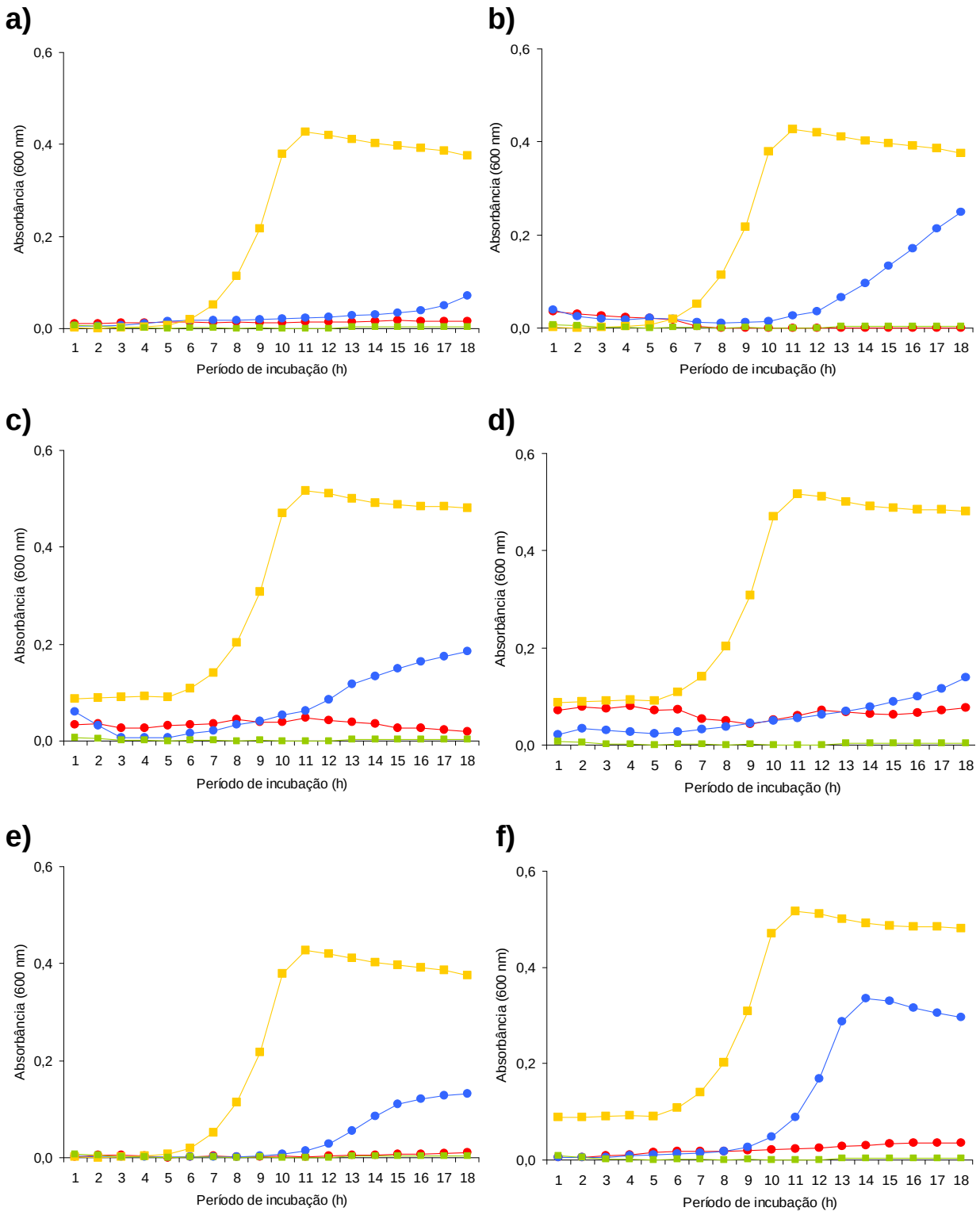


Figura 5 – Curvas de crescimento de *L. monocytogenes* frente a extratos metanólicos (MeOH) e etanólicos (EtOH) de resíduos agroindustriais em diferentes concentrações.

Legenda: a) talos de beterraba (MeOH); b) película de amendoim (MeOH); c) bagaço Petit Verdot (MeOH); d) borra de fermentação (EtOH); e) bagaço de goiaba (EtOH); f) sementes Petit Verdot (EtOH). controle negativo controle positivo sub-CIM CIM

2.3.2 Composição química

O teor de fenólicos totais encontrado para os extratos metanólicos e etanólicos dos resíduos variou de 0,70 a 40,02g EAG.100g extrato^{-1} (Tabela 3). Os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e *L. monocytogenes* estão entre os que apresentaram os maiores valores de teor de fenólicos totais, sugerindo correspondência entre a atividade antimicrobiana apresentada e os compostos fenólicos presentes nos mesmos. Extratos de película de amendoim, bagaços e sementes de Petit Verdot e de borra de fermentação de uvas tintas apresentaram as menores CIM e os maiores valores de teor de fenólicos totais.

Tabela 3 – Teor de compostos fenólicos totais (g EqAG.100g^{-1} de amostra) de extratos de diferentes resíduos agroindustriais

	Extratos	
Resíduos	MeOH	EtOH
Película de amendoim	40,02 ± 0,61 ^{aA}	37,45 ± 0,97 ^{aB}
Sementes Petit Verdot	34,8 ± 0,86 ^{bA}	29,79 ± 1,26 ^{bB}
Bagaço (Petit Verdot)	18,61 ± 0,53 ^{cA}	19,25 ± 0,39 ^{dA}
Bagaço (Pinot Noir)	16,19 ± 0,25 ^{dB}	22,92 ± 0,16 ^{cA}
Borra de fermentação	12,42 ± 0,14 ^{eB}	16,51 ± 0,27 ^{eA}
Engaço (Verdejo)	8,17 ± 0,05 ^{fA}	8,16 ± 0,17 ^{fA}
Bagaço (Isabel)	6,48 ± 0,15 ^{gA}	6,48 ± 0,15 ^{gA}
Talo de beterraba	4,95 ± 0,57 ^{hA}	5,1 ± 0,16 ^{hA}
Engaço (Syrah)	5,25 ± 0,13 ^{hB}	7,07 ± 0,18 ^{fgA}
Bagaço de goiaba	3,73 ± 0,04 ^{iB}	4,31 ± 0,09 ^{hiA}
Folhas de rabanete	3,53 ± 0,07 ^{iB}	3,67 ± 0,03 ^{ijA}
Talo de nabo	3,16 ± 0,02 ^{ijA}	3,04 ± 0,09 ^{jkA}
Talo de couve	2,49 ± 0,11 ^{jkA}	2,36 ± 0,07 ^{klmnA}
Bagaço (Verdejo)	2,48 ± 0,02 ^{jkB}	2,89 ± 0,04 ^{jklA}
Bagaço de tomate	2,21 ± 0,04 ^{jklB}	2,81 ± 0,09 ^{jklA}
Casca de maracujá	1,95 ± 0,09 ^{klB}	2,42 ± 0,06 ^{klmA}
Talo de brócolis	1,8 ± 0,02 ^{klmA}	1,73 ± 0,07 ^{lmnoA}
Folhas de cenoura	1,35 ± 0,06 ^{lmnA}	1,24 ± 0,04 ^{mnoA}
Alcachofra	0,94 ± 0,02 ^{mnB}	1,19 ± 0,02 ^{noA}
Cascas de abóbora	0,78 ± 0,06 ^{nA}	0,7 ± 0,03 ^{oA}

Médias das linhas (n=3) seguidas por letras minúsculas diferentes apresentam diferença estatística em nível de 5% (Teste de Tukey). Médias das colunas (n=3) seguidas por letras maiúsculas diferentes apresentam diferença estatística em nível de 5% (Teste de Tukey)

A composição química dos extratos avaliados pela técnica de CG-EM está apresentada na Tabela 4. Os compostos mais abundantes presentes nos talos de beterraba foram ácido 1,2,3-propanotricarboxílico (17,16%), ácido octadecanóico (8,47%), ácido hexadecanóico (5,98%), ácido oléico (3,91%) e ácido azelaico (2,88%). No extrato metanólico de película de amendoim, foram encontrados principalmente ácido 1,2,3-propanotricarboxílico (11,79%), ácido azelaico (4,35%), epicatequina (3,95%), ácido hexadecanóico (3,81%) e ácido ρ-cumárico (3,72%). No extrato metanólico de bagaço de Petit Verdot, foram encontrados em maiores quantidades a epicatequina (79,95%), ácido gálico (1,68%), ácido 5-hidroxi-n-valérico (1,06%), ácido caféico (1,05%) e ácido hexadecanóico (0,76%). Os compostos mais abundantes no extrato etanólico de borra de fermentação foram epicatequina (24,98%), ácido octadecanóico (5,32%), ácido 5-hidroxi-n-valérico (5,05%), ácido 1,2,3-propanotricarboxílico (3,30) e quercetina (3,13%). No extrato etanólico de bagaço de goiaba, os principais compostos encontrados foram epicatequina (7,92%), ácido 5-hidroxi-n-valérico (6,16%), ácido hexadecanóico (3,96%), ácido azelaico (2,41%) e quercetina (1,42%). Finalmente, os compostos mais abundantes nos extratos etanólicos de sementes de Petit Verdot foram epicatequina (75,33%), ácido gálico (2,62%), ácido 1,2,3-propanotricarboxílico (2,33%), ácido 5-hidroxi-n-valérico (1,08%) e ácido hexadecanóico (0,87%).

Tabela 4 – Composição química de extratos de resíduos agroindustriais com atividade antimicrobiana sobre micro-organismos patogênicos

(Continua)

		Porcentagem de área relativa[a]						
		Resíduos agroindustriais[b]						Íon
Compostos[c]	TR	1	2	3	4	5	6	(m/z, abundância entre parênteses)
Ácido succínico	6,19	-	0,63	-	-	-	-	147 (100), 73 (92) 44 (32), 55 (28); 247 (M^+)
Ácido 5-hidroxi-n-valerico	6,19	-	-	1,06	5,05	6,16	1,08	147 (100), 73 (49), 247 (33), 75 (27), 55 (18), 157 (13); 249 (M^+)
Ácido pentanodióico (glutárico)	6,68	-	-	-	-	0,52	-	147 (100), 73 (99), 55 (36), 45 (22), 158 (21), 129 (19); 261 (M^+)
Ácido azelaico	9,03	2,88	4,35	0,54	2,22	2,41	0,84	73 (100), 55 (40), 201 (30), 43 (30), 129 (26), 149 (26); 317 (M^+)
Ácido siríngico	9,63	-	-	0,54	3,03	-	-	327 (100), 73 (69), 312 (62), 253 (33), 283 (19), 355 (6); 342 (M^+)
Ácido p-cumárico	9,85	-	3,72	-	-	-	-	73 (100), 293 (96), 308 (73), 219 (64), 249 (56), 44 (21); 308 (M^+)
Ácido gálico	9,93	-	-	1,68	2,18	-	2,62	281 (100), 73 (89), 443 (23), 282 (22), 443 (23), 45 (12); 458 (M^+)
Ácido hexadecanóico (palmítico)	10,34	5,98	3,81	0,76	-	3,96	0,87	117 (100), 73 (87), 313 (76), 132 (51), 43 (33) 55 (24); 328 (M^+)
Ácido ferúlico	10,35	-	-	-	2,04	-	-	73 (100), 117 (74), 313 (64), 132 (38), 43 (28), 55 (21); 338 (M^+)

Tabela 4 – Composição química de extratos de resíduos agroindustriais com atividade antimicrobiana sobre micro-organismos patogênicos

(Conclusão)

Ácido caféico	10,99	-	0,46	1,05	0,48	1,11	0,35	219 (100), 73 (90,38), 381 (20), 45 (15), 191 (12), 249 (10), 396 (M^+)
Ácido oléico	11,47	3,91	-	-	-	-	-	73 (100), 117 (66), 44 (53), 129 (48), 69 (26), 145 (22); 339 (M^+)
Ácido octadecanóico (esteárico)	11,62	8,47	3,30	0,56	5,32	1,40	0,58	73 (100), 117 (97), 341 (78), 132 (54) 43 (36) 145 (30), 429 (3); 356 (M^+)
Ácido 1,2,3-propanotricarboxílico	11,80	17,16	11,79	0,58	3,30	-	2,33	185 (100), 129 (61), 259 (56), 43 (42), 157 (13), 139 (9); 329 (M^+)
Epicatequina	17,27	-	3,95	79,95	24,98	7,92	75,33	368 (100), 73 (61), 267 (9), 179 (8), 383 (7); 650 (M^+)
Quercetina	20,68	-	-	-	3,13	1,42	-	647 (100), 73 (43), 207 (20), 559 (11), 281 (10), 575 (7), 147 (4); 662 (M^+)
Miricetina	21,25	-	-	-	1,70	-	-	73 (34), 207 (18), 647 (13), 281 (8), 217 (7), 307 (6); 735 (M^+)

[a] Área do pico em relação ao porcentual total das áreas dos picos
[b] 1. Talos de beterraba (metanólico); 2. Película de amendoim (metanólico); 3. Bagaço Petit Verdot (metanólico); 4. Borra de fermentação (etanólico); 5. Bagaço de goiaba (etanólico); 6. Sementes Petit Verdot (etanólico)
[c] Todos os compostos identificados apresentaram porcentagem de similaridade >80%
TR: tempo de retenção (min)

Dentre os componentes majoritários do extrato de talo de beterraba está o ácido azelaico, ácido dicarboxilíco de cadeia saturada utilizado em tratamentos de acne e de reconhecida ação antimicrobiana (GOLLNICK; SCHRAMM, 1998). No extrato de película de amendoim foram encontrados ácido 1,2,3-propanotricarboxílico, ácidos dicarboxílicos, como succínico e azelaico, epicatequina e ácidos caféico e ρ-cumárico, encontrados em extratos vegetais com comprovadas atividades antimicrobiana e antifúngica (EL-MASSRY et al., 2009). Estudo recente aponta presença dos ácidos fenólicos siríngico e caféico em bagaços de uvas com atividade antilisterial, em concordância com os resultados do presente estudo (ANASTASIADI et al., 2008). Os autores anteriores também encontraram grandes quantidades de epicatequina em bagas, bagaço e sementes de uvas. No presente estudo, os extratos de bagaço e sementes de Petit Verdot foram os mais abundantes em epicatequina, componente também presente em grandes quantidades em sementes de guaraná com atividade sobre micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos (MAJHENIC et al., 2007). Na borra de fermentação, foi detectada presença dos ácidos gálico e ferúlico e dos flavonóides miricetina e quercetina, compostos de reconhecida atividade antimicrobiana (ONG; KHOO, 1997; RAUHA et al., 2000). Epicatequina, quercetina e ácido caféico foram os compostos fenólicos mais abundantes no extrato de bagaço de goiaba, compostos com atividade antibacteriana encontrados comumente em seus frutos e folhas

(GUTIÉRREZ et al., 2008). Nos extratos de sementes de Petit Verdot, houve predominância de epicatequina e presença dos ácidos fenólicos caféico e gálico, em concordância com resultados encontrados em estudos anteriores em sementes de uvas (SAITO et al., 1998; ANASTASIADI et al., 2008; MAIER et al., 2009).

2.4 Conclusões

Resíduos agroindustriais de talos de beterraba, película de amendoim, bagaço e sementes de uvas Petit Verdot, borra de fermentação de uvas tintas e bagaço de goiaba apresentam compostos com atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e *L. monocytogenes*, importantes bactérias patogênicas em humanos. A utilização desses resíduos pela indústria de alimentos torna-se viável, à medida que consiste em uma alternativa natural aos conservantes sintéticos e evita o descarte de resíduos no ambiente, trazendo benefícios tanto para indústria quanto para os consumidores.

Referências

ABDALLA, A.E.M.; AYAD, E.H.E. ; EL-HAMAHMY, R.M. Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. **Food Chemistry,** Barking, v. 103, n. 4, p. 1141-1152, 2007.

AL-ZOREKY, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 134, n. 3, p. 244-248, 2009.

ANASTASIADI, M.; CHORIANOPOULOS, N.G.; NYCHAS, G.J. Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 57, n. 2, p. 457-463, 2008.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry,** Barking, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BAYDAR, N.G.; ÖZKAN, G. ; SAGADIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control,** Guildford, v. 15, n. 5, p. 335-339, 2004.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.B.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests:** approved standard – 10th ed. CLSI document M2-A10, 2009a.

_____. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard – 8th ed. CLSI document M7-A8, 2009b.

CORREIA, R.T.P.; MCCUE, P.; MAGALHÃES, M.M.A.; MACÊDO, G.R.; SHETTY, K. Phenolic antioxidant enrichment of soy flour-supplemented guava waste by *Rhizopus oligosporus* mediated solid-state bioprocessing. **Journal of Food Biochemistry,** Westport, v. 28, n. 5, p. 404-418, 2004.

DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. Food antimicrobials: an introduction. In: DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L. (Ed.). **Antimicrobials in food.** Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 1-10.

DAVIS, J.P.; DEAN, L.L.; PRICE, K.M.; SANDERS, T.H. Roast effects on the hydrophilic and lipophilic antioxidant capacities of peanut flours, blanched peanut seed and peanut skins. **Food Chemistry,** Barking, v. 119, n. 2, p. 539-547, 2010.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; MITSUE, F.H.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin,** Tokyo, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.

EL-MASSRY, K.F.; GHORAB, A.H.; HAMDY, A.S.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 57, n. 12, p. 5265-5270, 2009.

GOLLNICK, H.; SCHRAMM, M. Topical therapy in acne. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology,** Nice, v. 11, n. 1, p. 8-12, 1998.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

GUTIÉRREZ, R.M.P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 117, n. 1, p. 1-27, 2008.

HÖLTJE, J. V. Cell walls, bacterial. In: SCHAECHTER, M. (Ed.). **The desk encyclopedia of microbiology.** San Diego: Elsevier Academic Press. Cap.19, p. 239-250, 2004.

JAYAPRAKASHA, G.K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K.K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International,** Essex, v. 36, n. 2, p. 117-122, 2003.

KATALINIC, V.; MOZINA, S.S.; SKROZA, D.; GENERALIC, I.; ABRAMOVIC, H.; MILOS, M.; LJUBENKOV, I.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry,** Barking, v. 119, n. 2, p. 715-723, 2010.

LOU, H.; YUAN, H.; MA, B.; REN, D.; JI, M.; OKA, S. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. **Phytochemistry,** Oxford, v. 65, n. 16, p. 2391-2399, 2004.

MAGASSOUBA, F.B.; DIALLO, A.; KOUYATÉ, M.; MARA, F.; MARA, O.; BANGOURA, O.; CAMARA, A.; TRAORÉ, S. DIALLO, A.K.; ZAORO, M.; LAMAH, K.; DIALLO, S.; CAMARA, G.; KÉITA, A.; CAMARA, M.K.; BARRY, R.; KÉITA, S.; OULARÉ, K.; BARRY, M.S.; DONZO, M.; CAMARA, K.; TOTÉ, K.; BERGHE, D.V.; TOTTÉ, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. BALDÉ, A.M. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 114, n. 1, p. 44-53, 2007.

MAHMUD, S.; SALEEM, M.; SIDDIQUE, S.; AHMED, R.; KHANUM, R.; PERVEEN, Z. Volatile components, antioxidant and antimicrobial activity of *Citrus acida* var. sour lime peel oil. **Journal of Saudi Chemical Society,** Riade, v. 13, n. 2, p. 195-198, 2009.

MAIER, T.; SCHIEBER, A.; KAMMERER, D.R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, n. 3, p. 551-559, 2009.

MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry,** Barking, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007.

MAKRIS, D.P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N.K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis,** San Diego, v. 20, n. 2, p. 125-132, 2007.

MOREIRA, A.C.; MÜLLER, A.C.A.; PEREIRA JR, N.; ANTUNES, A.M.S. Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: policy, law and statistics. **World Patent Information,** London, v. 28, n. 1, p. 34-42, 2006.

NAIDU, A. S. **Natural food antimicrobial systems.** Boca Raton: CRC Press, 2000.

O'KEEFE, S. F.; WANG, H. Effects of peanut skin extract on quality and storage stability of beef products. **Meat Science,** Barking, v. 73, n. 2, p. 278-286, 2006.

OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; FERREIRA, I.C.F.R.; BENTO, A.; ESTEVINHO, L.; PEREIRA, J.A. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. **Food and Chemical Toxicology,** London, v. 46, n. 7, p. 2326-2331, 2008.

ONG, K. C.; KHOO, H.-E. Biological effects of myricetin. **General Pharmacology: Vascular System,** Bristol, v. 29, n. 2, p. 121-126, 1997.

PELEGRINI, P.B.; MURAD, A.M.; SILVA, L.P.; DOS SANTOS, R.C.; COSTA, F.T.; TAGLIARI, P.D.; BLOCH JR, C.; NORONHA, E.F.; MILLER, R.N.; FRANCO, O.L. Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. **Peptides**, New York, v. 29, n. 8, p. 1271-1279, 2008.

PUUPPONEN-PIMIA, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTEY, K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology,** Oxford, v. 90, n. 4, p. 494-507, 2001.

RAUHA, J.-P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.

REY, A.I.; HOPIA, A.; KIVIKARI, R.; KAHKONEN, M. Use of natural food/plant extracts: cloudberry (*Rubus Chamaemorus*), beetroot (*Beta Vulgaris* "Vulgaris") or willow herb (*Epilobium angustifolium*) to reduce lipid oxidation of cooked pork patties. **Food Science and Technology,** London, v. 38, n. 4, p. 363-370, 2005.

SAITO, M.; HOSOYAMA, H.; ARIGA, T.; KATAOKA, S.; YAMAJI, N. Antiulcer Activity of Grape Seed Extract and Procyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 46, n. 4, p. 1460-1464, 1998.

SCHVED, F.; HENIS, Y.; JUVEN, B.J. Response of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 4, p. 305-14, 1994.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; RAVENTÓS-LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology,** New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. **Food Chemistry,** Barking, v. 90, n. 1-2, p. 199-206, 2005.

3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE ERVA-MATE *(Ilex paraguariensis* St. Hil.) CONTRA MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS

Resumo

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) tem sido objeto de diversos estudos devido às suas importantes atividades biológicas, atribuídas principalmente à classe dos compostos fenólicos. O presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos e metanólicos de erva-mate sobre *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*, por meio das Concentrações Inibitória (CIM) e Bactericida Mínimas (CBM), além da determinação do teor de compostos fenólicos totais. O extrato de maior atividade antimicrobiana e conteúdo de compostos fenólicos teve sua composição química determinada pela técnica de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM) e sua atividade antimicrobiana avaliada sob diferentes condições de pH, por meio da análise de curvas de crescimento. Os extratos inibiram o crescimento de todos os micro-organismos testados, exceto *E. coli*. O extrato etanólico apresentou os menores valores de CIM/CBM (0,78/0,78 $mg.ml^{-1}$), e o maior teor de fenólicos totais (19,39 g $EAG.g^{-1}$ de extrato). A caracterização química demonstrou abundância em derivados do ácido clorogênico, principalmente ácido 3-o-cafeoilquínico, e ácido caféico, compostos fenólicos de reconhecidas atividades biológicas. O extrato etanólico não foi capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos em pH 6, diferentemente do observado para os pH 7 e 8.

Palavras-chave: Erva-mate; Atividade antimicrobiana; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella* Enteritidis

Abstract

Chemical composition and antimicrobial activity of yerba mate extracts (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on relevant pathogenic microoganisms in food

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) has been the object of much research due to important biological properties, mainly attributed to its phenolic compound content. This study evaluated antimicrobial activity of ethanol and methanol yerba mate extracts on *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli*, through Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), and the determination of content of total phenolic compounds. The extract with the highest antimicrobial activity and content of phenolic compounds had its chemical characterization determined through use of the gas chromatography-mass spectrometry technique (CG-MS) and its antimicrobial activity evaluated under different pH conditions through growth curves analysis. Extracts inhibited growth of all microorganisms tested, except *E. coli*. Ethanol extract showed the lowest MIC/MBC values (0.78/0.78 $mg.ml^{-1}$), and the highest total phenolic content (19.39g $EAG.g^{-1}$ extract). Chemical characterization revealed an abundance of chlorogenic acid derivatives, especially 3-o-caffeoylquinic and caffeic acid, which are phenolic compounds of acknowledged biological activities. Ethanol extract did not succeed in inhibiting growth of microorganisms at pH 6, unlike that observed at pH 7 and 8.

Keywords: Yerba mate; Antimicrobial activity; *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Salmonella* Enteritidis

3.1 Introdução

Nas últimas décadas, pesquisas têm demonstrado o potencial de exploração de produtos vegetais como fonte de compostos bioativos de interesse industrial. Folhas, ramos, rizomas e sementes podem conter componentes com atividades biológicas importantes (ABDALLA et al., 2007; AIDI WANNES et al., 2010). Além dessas fontes, o estudo de produtos utilizados em infusões, tais como chás e outros tipos de bebidas, tem ganhado cada vez mais destaque (BAHORUN et al., 2010; SINGH et al., 2010; VON STASZEWSKI et al., 2011). Dentre esses produtos, encontra-se a erva-mate, produto bastante utilizado por populações da América do Sul tanto como fonte de cafeína, em substituição ou em paralelo ao chá e café, quanto como agente terapêutico, devido às suas conhecidas propriedades farmacológicas (BRACESCO et al., 2010).

As atividades biológicas atribuídas à erva-mate compreendem atividade antioxidante (BRACESCO et al., 2003; VAQUERO et al., 2010), antiinflamatória (TSAI et al., 2010), antitumoral (DE MEJÍA et al., 2010) e redutora de peso (ANDERSEN; FOGH, 2001; DICKEL et al., 2007; PRZYGODDA et al., 2010). Nos últimos anos, pesquisas revelaram o potencial antimicrobiano da erva-mate, cujo espectro de ação alcança bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (DE BIASI et al., 2009; COGO et al., 2010).

Essas bioatividades relacionam-se diretamente com a presença de diferentes classes de compostos químicos, principalmente os compostos fenólicos, cujos principais representantes na erva-mate são os ácidos gálico, siríngico, caféico, ferúlico, ρ-cumárico, os flavonóides rutina e quercetina e os derivados do ácido clorogênico (BASTOS et al., 2006; BRAVO et al., 2007; PAGLIOSA et al., 2010).

No presente estudo, foi avaliada a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos e metanólicos de erva-mate para preparo de chimarrão sobre micro-organismos patogênicos de importância em alimentos e sua relação com o teor de compostos fenólicos totais. O extrato de maior atividade teve sua caracterização química determinada pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e sua atividade antimicrobiana avaliada sob diferentes condições de pH.

3.2 Materiais e métodos

Os seguintes reagentes P.A. foram utilizados no experimento: etanol e metanol (Synth®), Reagente de Folin-Ciocalteu e Carbonato de Sódio (Dinâmica®); meios de cultura Caldo Soja Tripticaseína (TSB) (Difco®), Ágar Bacteriológico e Extrato de Levedura (Oxoid®); indicador redox Resazurina e N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) (Sigma-Aldrich®).

3.2.1 Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) para preparo de chimarrão foi adquirida em estabelecimento comercial na cidade de Campinas-SP, sendo seu aspecto mostrado na Figura 1.

Figura 1 – Aspecto da erva-mate para preparo de chimarrão utilizada nos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da composição química por CG-EM

3.2.2 Procedimento de extração

Para preparo dos extratos, a erva-mate (1:8 m/v) foi imersa em soluções etanólicas (40:60) e metanólicas (30:70) e mantidas sob refrigeração por 96 horas. A cada 24 horas, os extratos foram filtrados em papel de filtro qualitativo 12,5 μm (Qualy®) e a amostra de cada resíduo retida no filtro adicionada aos respectivos solventes de extração. Os solventes das extrações foram evaporados em evaporador rotativo à temperatura de 45°C (Tecnal®). Em seguida, o volume final foi, então, liofilizado (Liotop®L101), e os extratos acondicionados em temperatura de refrigeração (Figura 2). Para a realização dos ensaios, os extratos foram dissolvidos em caldo soja tripticaseína (TSB).

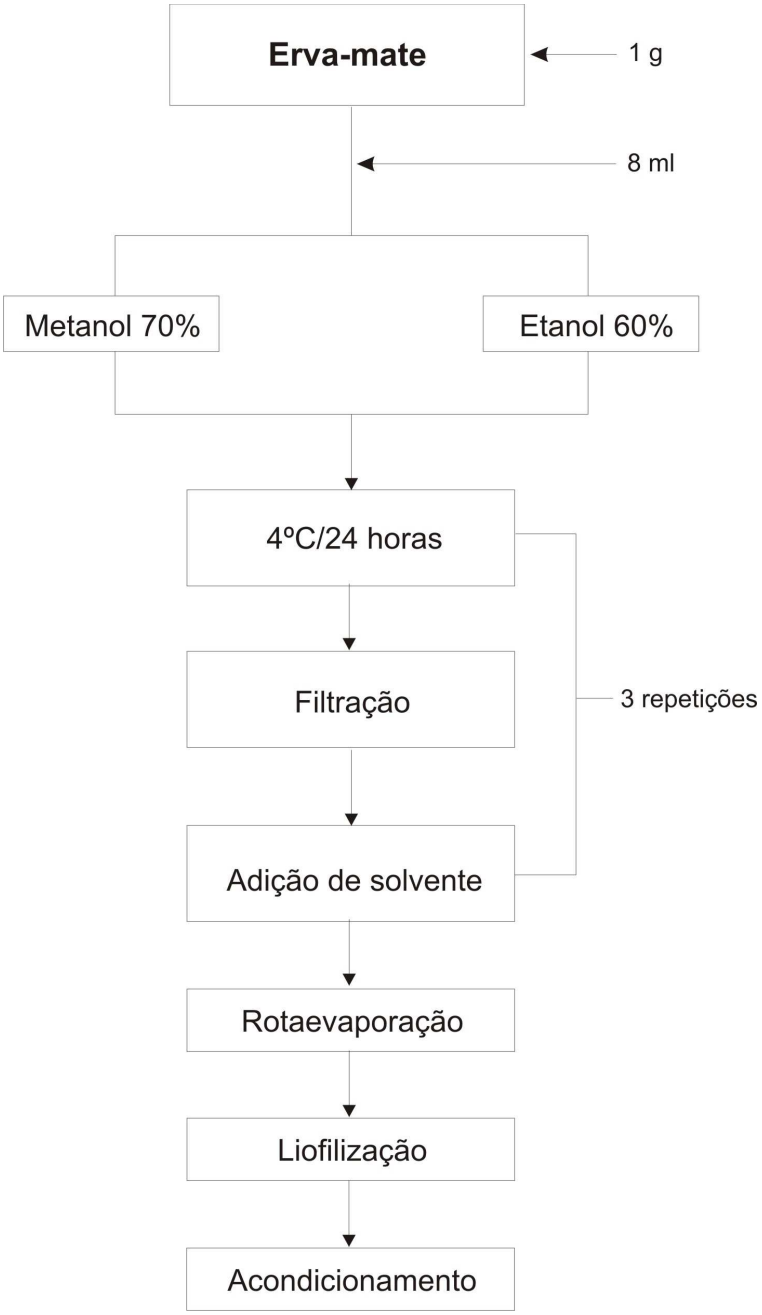


Figura 2 – Fluxograma de extração da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) para preparo de chimarrão

3.2.3 Atividade antimicrobiana

3.2.3.1 Micro-organismos testados

A atividade antimicrobiana foi avaliada contra micro-organismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 07644) e Gram-negativos (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922), provenientes da coleção de cepas do Laboratório de Higiene e Laticínios da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Esalq/USP.

3.2.3.2 Método de difusão em ágar

O *screnning* da atividade antimicrobiana dos extratos foi realizado através da técnica de difusão em ágar de acordo com preconizações do CLSI (2009a) e Duarte et al. (2003), com modificações. Duzentos microlitros de inóculo padronizado ($1x10^8$ UFC.mL^{-1}) de cada microrganismo foram transferidos para 200 ml de caldo soja tripticaseína (TSB) acrescido de 0,7% de ágar bacteriológico a 45°C, de modo a se obter uma população bacteriana final de $1,5x10^5$ UFC.ml^{-1}. Com auxílio de uma proveta graduada esterilizada, foram transferidos para placas de Petri (150 MM) 70 ml do ágar inoculado, no qual foram produzidos, através de uma bomba de vácuo, poços com 8 mm de diâmetro, dentro dos quais foram distribuídos 40 μL dos extratos (100 mg.mL^{-1}). As placas foram mantidas em repouso por 1 hora à temperatura ambiente para permitir a difusão dos extratos no meio. Como controle negativo utilizou-se 40 μL de TSB; como controle positivo, 40 μL de solução de clorexidina 0,12% (v/v). Foram feitas triplicatas para cada extrato testado.

3.2.3.3 Concentração inibitória e bactericida mínima (CIM/CBM)

Para determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo, de acordo com o preconizado pelo CLSI (2009b), em microplacas de 96 poços. As concentrações dos extratos foram obtidas por diluição seriada de razão 2 na própria microplaca, resultando em concentrações que variaram de 25 mg.mL^{-1} a 0,78 mg.mL^{-1}, após adição de TSB inoculado (1-$2x10^5$ UFC.mL^{-1}). O volume final para cada poço foi de 200 μL. Os controles foram compostos da seguinte maneira: controle positivo (200 μL de TSB acrescido de clorexidina 0,12% v/v) e controle negativo (200 μL de TSB estéril). Duzentos microlitros de TSB estéril foram utilizados

como controle de esterilidade do caldo. Após incubação a 35°C por 24 horas, todos os poços receberam 30 μL de solução de resazurina (0,01% m/v), com o objetivo de verificar, por meio de leitura visual, em quais poços houve crescimento bacteriano. Qualquer evidência na mudança de coloração foi considerada como indicativo de crescimento bacteriano. Para determinação da CBM, 10 μL de caldo foram retirados dos poços considerados inibitórios e semeados em placas de Petri contendo ágar tripticase de soja (TSA), as quais foram incubadas a 35ºC por 24 horas. A CBM foi considerada como a menor concentração na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura (CABRAL et al., 2009). Os experimentos foram realizados em triplicata para cada extrato.

3.2.3.4 Curvas de crescimento

O crescimento dos micro-organismos frente ao extrato de erva-mate de melhor atividade antimicrobiana foi avaliado em 3 diferentes condições de pH: 6, 7 e 8. Os testes foram realizados utilizando-se microplacas de 96 poços (GUTIERREZ et al., 2008). Todos os poços receberam 100 μL de TSB estéril. Na primeira linha de cada coluna foram adicionados 100 μL dos extratos a serem testados e seguiu-se a diluição seriada de razão 2 com o auxílio de uma micropipeta multicanal, obtendo-se concentrações finais que variaram de 25 $mg.mL^{-1}$ a 0,78 $mg.mL^{-1}$, após adição de 100 μL de TSB inoculado (1-2x10^5 $UFC.mL^{-1}$). Os controles consistiram em 200 μL de TSB inoculado (controle negativo), 200 μL de TSB inoculado acrescido de clorexidina 0,12% v/v (controle positivo) e 200 μL de caldo TSB acrescido de extrato, sem inóculo (branco). As microplacas foram incubadas em espectrofotômetro (Victor™X3, PerkinElmer®) a 35°C por 18 horas e as leituras das absorbâncias realizadas em intervalos de 1 hora a 600 nm. Foram feitas triplicatas para cada extrato testado.

3.2.4 Composição química

3.2.4.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado com o reagente de Folin-Ciocalteau de acordo com metodologia descrita por Singleton et al. (1999). Quinhentos microlitros dos extratos (10 $mg.ml^{-1}$) foram misturados a 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteau (1:10) e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) (4% m/v). Após incubação no escuro à temperatura ambiente por 2

horas, foi feita a leitura de absorbância a 740 nm em espectrofotômetro de luz visível (Femto Plus) a 740 nm. O teor de fenólicos totais foi expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG) em g por 100 g de amostra (%), a partir da curva padrão de ácido gálico. Para o ácido gálico, a curva foi estabelecida pela plotagem da concentração ($\mu g.ml^{-1}$) *versus* absorbância (nm) ($y = 42,71x + 0,3187$; $R^2 = 0,9997$, onde y é a absorbância e x é a concentração).

3.2.4.2 Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM)

O extrato que apresentou a melhor atividade antimicrobiana foi submetido à análise de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG-EM), a fim de se identificar sua composição química. *Remoção de interferentes das amostras pela técnica SPE (Solid Phase Extraction)*: a purificação da amostra foi feita com a finalidade de eliminar os interferentes das amostras através da extração em fase sólida (SPE). O extrato liofilizado foi rediluído em água e acidificado até pH 2,0. Antes da aplicação da amostra, cartucho SPE-LC18 (Supelco, 2 g) foi condicionado com metanol e água ácida (pH 2,0). Alíquota de 5 ml do extrato foi aplicada ao cartucho, o qual foi lavado repetidas vezes com 15 ml de água ácida. Logo após, os compostos adsorvidos foram eluídos em metanol P.A. e a fração foi coletada em *vial* silanizado e evaporada em corrente de nitrogênio. *Derivatização (formação de derivados do trimetilsilil – TMS)*: o extrato purificado foi derivatizado, a fim de se adequá-lo à técnica de CG-EM. A fração obtida através da purificação por SPE foi acrescida de 100 µl do reagente N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA). A mistura foi homogeneizada em vórtex e mantida em estufa à 60°C durante 10 minutos; em seguida, o reagente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e o produto da derivatização, rediluído em hexano (400-600 µl). Após homogeneização, o sobrenadante foi transferido a um *vial* para injeção em CG-EM. *Análise cromatográfica*: os extratos foram analisados através de Shimadzu® (Modelo GC-2010) acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu® (QP 2010 *Plus*). A separação ocorreu em coluna capilar RTX5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A temperatura do injetor foi de 280ºC e o volume de injeção foi de 0,5 µl no modo "*splitless*". A interface foi mantida a 280ºC e o detector operou no modo "*scanning*" (m/z 40-800). Condições cromatográficas: temperatura inicial de 80ºC (1 minuto), aquecimento até 250°C, com taxa de $20°C.min^{-1}$ (1 minuto), aquecimento até 300ºC (5 minutos) a uma taxa de $6ºC.min^{-1}$, aquecimento a 310ºC (10 minutos) a uma taxa de $15ºC.min^{-1}$, e aquecimento a 320ºC (10 minutos) a uma taxa de $20ºC.min^{-1}$, totalizando 40 minutos de análise. A integração foi feita

por meio do *software* LabSolutions-CGMS. Flavonóides, ácidos fenólicos e derivados foram identificados por comparação com os dados obtidos do CG-EM, tais como tempo de retenção e fragmentação iônica, de padrões autênticos silanizados e eluídos nas mesmas condições, e com a biblioteca Wiley 8.

3.2.5 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada através do software Statistical Analysis System (SAS 2002). O Teste de Tukey (0,5% de probabilidade) foi utilizado para comparação de médias.

3.3 Resultados e Discussão

Os extratos etanólicos e metanólicos de erva-mate apresentaram atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis (Figura 3). *E. coli* não foi inibida por nenhum dos extratos (Tabela 1). O extrato etanólico produziu os maiores halos de inibição e as menores concentrações inibitórias mínimas (CIM) sobre *S. aureus* e *Salmonella* Enteritidis; para *L. monocytogenes*, os valores mantiveram-se praticamente os mesmos. O extrato etanólico de erva-mate apresentou a menor CBM frente à *S. aureus*, o que demonstra seu alto poder bactericida *in vitro* sobre esse microrganismo.

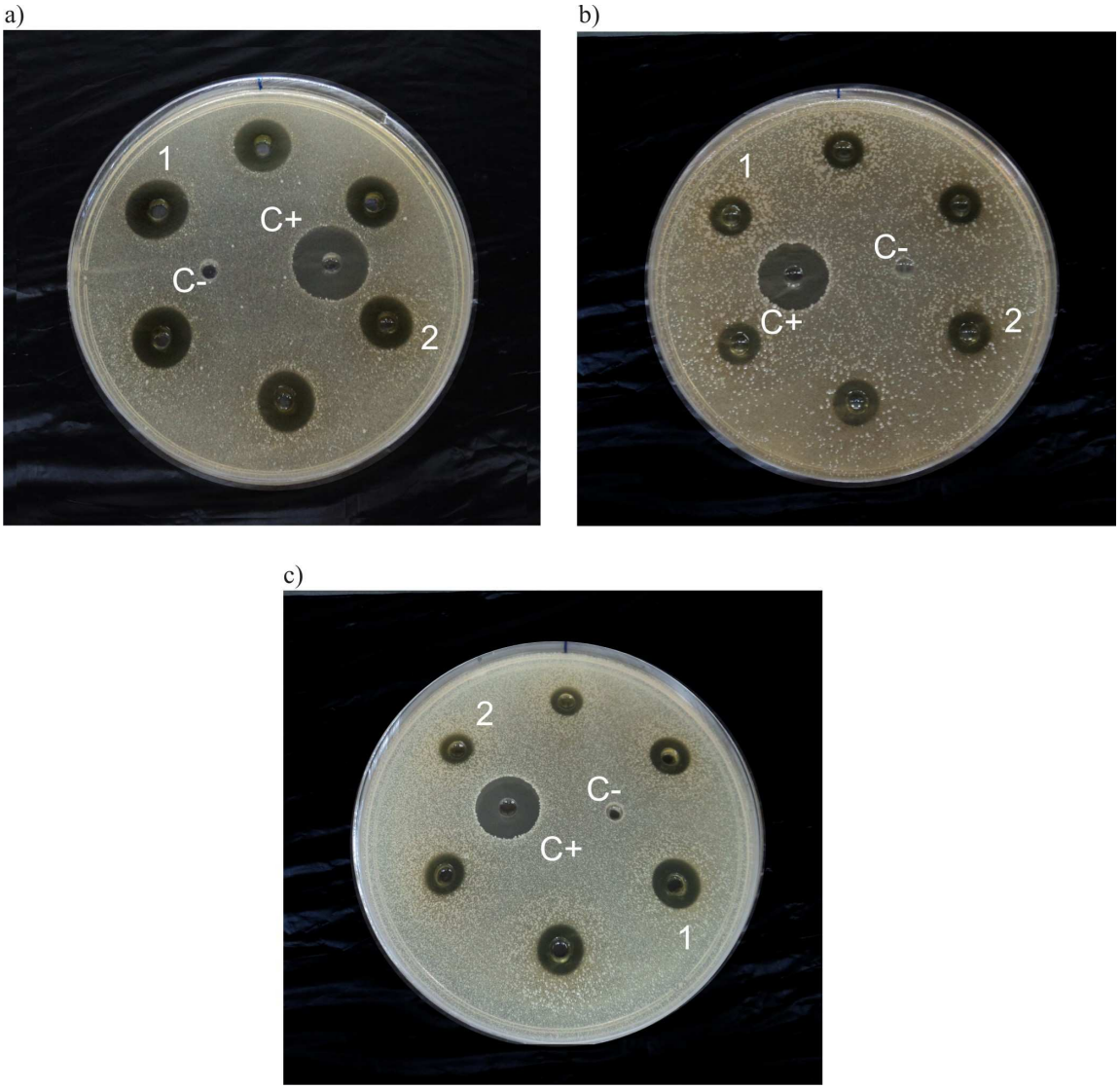


Figura 3 – Inibição de a) *S. aureus*, b) *L. monocytogenes*, c) *S.* Enteritidis pelo teste de difusão em ágar para *screening* da atividade antimicrobiana da erva-mate. Resultados para *E. coli* não representados.

Legenda: 1: triplicata do extrato etanólico; 2: triplicata do extrato metanólico; C+: controle positivo (clorexidina 0,12%); C-: controle negativo (caldo TSB)

Tabela 1 – Halos de inibição (mm) e Concentrações Inibitória e Bactericida Mínimas (CIM/CBM) ($mg.ml^{-1}$) de extratos de erva-mate sobre micro-organismos patogênicos

	S. aureus		*L. monocytogenes*		*S.* Enteritidis		*E. coli*	
	MeOH	EtOH	MeOH	EtOH	MeOH	EtOH	MeOH	EtOH
Halos de inibição	21,67±0,57	23,67±0,57	10,00±0,00	10,33±0,58	10,00±0,00	13,67±0,57	-	-
CIM	1,56	0,78	3,13	3,13	6,25	3,13	-	-
CBM	3,13	0,78	3,13	3,13	6,25	6,25	-	-

Médias das triplicatas ± desvio-padrão
MeOH: extrato metanólico / EtOH: extrato etanólico
- : sem inibição

No estudo de De Biasi et al. (2009) foi encontrada atividade inibitória de extratos etanólicos de partes de erva-mate sobre diversos grupos de micro-organismos; destes, apenas *E. coli* não foi inibida pelos extratos, em concordância com os resultados obtidos neste trabalho. Porém, Vaquero et al. (2010) demonstraram o potencial antimicrobiano de infusão de erva-mate sobre *E. coli*, sendo este o microrganismo mais inibido dentre os avaliados. Cogo et al. (2010) relatam atividade antimicrobiana de extratos etanólicos das folhas de erva-mate sobre *Helicobacter pylori*, em concentrações inibitórias mínimas tão baixas quanto às encontradas pelo presente estudo. Estes dados reforçam a importância da erva-mate como fonte de pesquisa de novos antimicrobianos naturais, principalmente como conservante natural pela indústria de alimentos e bebidas.

De acordo com a Figura 4, o extrato etanólico de erva-mate apresentou o maior teor de fenólicos totais. Foi observada diferença estatisticamente significativa no teor de fenólicos totais entre os dois solventes de extração utilizados; o etanol 60% (v/v) foi o solvente que melhor extraiu esses compostos. Comparando-se os dados referentes à atividade antimicrobiana e o teor de fenólicos totais, é possível inferir que a concentração desses compostos nos extratos esteja diretamente relacionada ao potencial antimicrobiano dos mesmos, observação também apontada em estudos anteriores (TSAI et al., 2010).

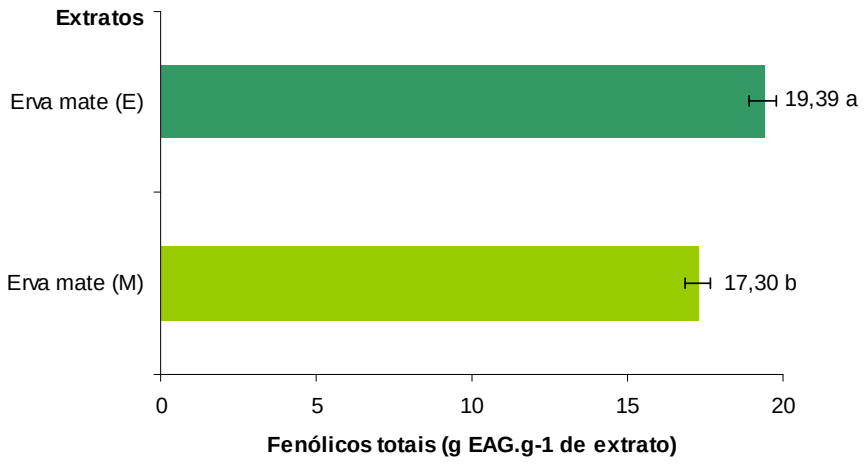


FIGURA 4 – Comparação do teor de compostos fenólicos dos extratos de erva-mate, em relação aos solventes de extração (E: etanol; M: metanol). Médias seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey p<0,05)

Por apresentar a melhor atividade antimicrobiana sobre os micro-organismos testados, o extrato etanólico de erva-mate foi escolhido para ser analisado pela técnica de CG-EM. Os componentes majoritários do extrato etanólico de erva-mate estão apresentados na Tabela 2, e seu perfil cromatográfico na Figura 5.

Tabela 2 – Composição química de extrato etanólico de erva-mate com atividade antimicrobiana sobre micro-organismos patogênicos

Compostos[b]	TR	Porcentagem de área relativa[a]	Íon (m/z, abundância entre parênteses)
Ácido caféico	11,00	2,99	219 (100), 396 (95), 73 (72), 381 (24), 191 (12), 45 (13); 401 (M+)
Ácido 5-o-cafeoilquínico	19,99	28,45	345 (100), 73 (94), 255 (58), 307 (41), 147 (21), 397 (15); 786 (M+)
Ácido 4-o-cafeoilquínico	20,64	20,83	307 (100), 73 (72), 255 (46), 219 (15), 489 (15), 147 (12); 786 (M+)
Ácido 3-o-cafeoilquínico	20,93	34,02	307 (100), 73 (76), 345 (68), 255 (30), 447 (21), 147 (17); 771 (M+)

[a] Área do pico em relação ao porcentual total das áreas dos picos
[b] Todos os compostos identificados apresentaram porcentagem de similaridade >80%
TR: tempo de retenção (min)

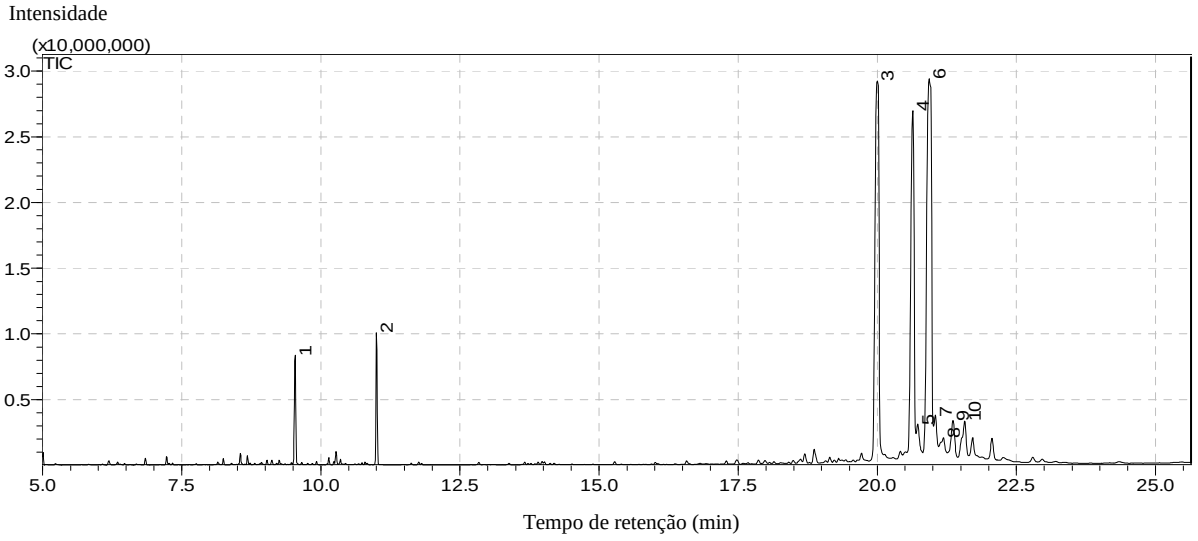


Figura 5 – Perfil cromatográfico de extrato etanólico de erva-mate. Picos dos componentes majoritários identificados por CG-EM: 2. Ácido caféico; 3. Ácido 5-o-cafeoilquínico; 4. Ácido 4-o-cafeoilquínico; 6. Ácido 3-o-cafeoilquínico

Os componentes identificados em maior abundância no extrato etanólico de erva-mate foram o ácido 3-o-cafeoilquínico (34,02%), ácido 5-o-cafeoilquínico (28,45%), ácido 4-o-cafeoilquínico (20,83%) e ácido caféico (2,99%). Ácidos cafeoilquínicos são os derivados clorogênicos encontrados em maior abundância na erva-mate (BIXBY et al., 2005; ISOLABELLA et al., 2010), e sua presença tem sido relatada em diversos estudos (FILIP et al., 2001; NEGISHI et al., 2004; LIU et al., 2009). Desempenham diversas atividades biológicas importantes, como antioxidante, anti-enzimática (NAKAJIMA et al., 2007), antiviral (LI et al., 2005) e analgésica (DOS SANTOS et al., 2005). O ácido caféico, cuja quantidade detectada foi menor que as dos ácidos cafeoilquínicos, foi encontrado em extratos vegetais com atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas (ANASTASIADI et al., 2008; GUTIÉRREZ et al., 2008) e fungos (EL-MASSRY et al., 2009); seu potencial inibitório é eficiente, ainda, contra vírus (SHAHIDI; NACZK, 2004) e contra a produção de aflatoxinas (DAVIDSON; NAIDU, 2000).

O efeito do pH sobre a atividade do extrato etanólico de erva-mate foi avaliado por meio da análise das curvas de crescimento de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis, cuja construção se baseou nas CIM do extrato sobre os micro-organismos em pH neutro, descritas

anteriormente na Tabela 1. De acordo com a Figura 6, em pH 7 e 8 o extrato inibiu o crescimento de *S. aureus*; o mesmo não foi observado para o extrato em pH 6, que foi incapaz de inibir o crescimento do microrganismo. Esse comportamento se repetiu em relação à *L. monocytogenes*; apenas em pH baixo (6,0) o extrato mostrou-se ineficiente na inibição microbiana (Figura 7). A curva de crescimento de *S.* Enteritidis mostra ligeira tendência a crescimento frente ao extrato em pH 8 (Figura 8); em pH 6, o extrato, como nos outros casos, não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para todos os micro-organismos testados, a alteração de pH não causou alteração significativa no crescimento dos controles negativos.

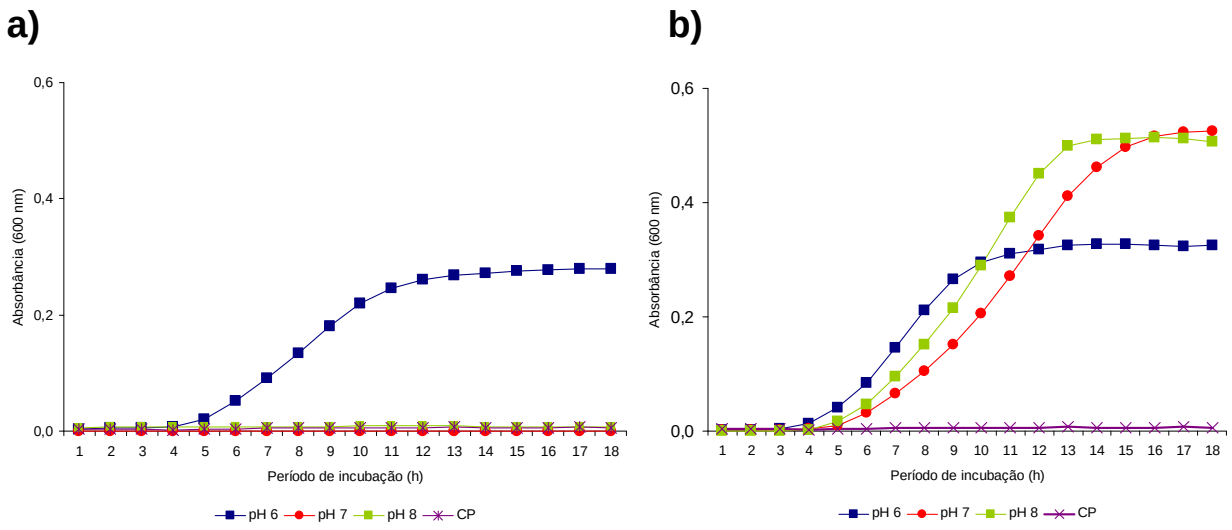


Figura 6 – Curvas de crescimento de *S. aureus*. a) Sob ação de extrato etanólico de erva-mate na concentração inibitória mínima (CIM = 0,78 $mg.ml^{-1}$ em pH 7); b) Controles negativos (ausência de extrato)

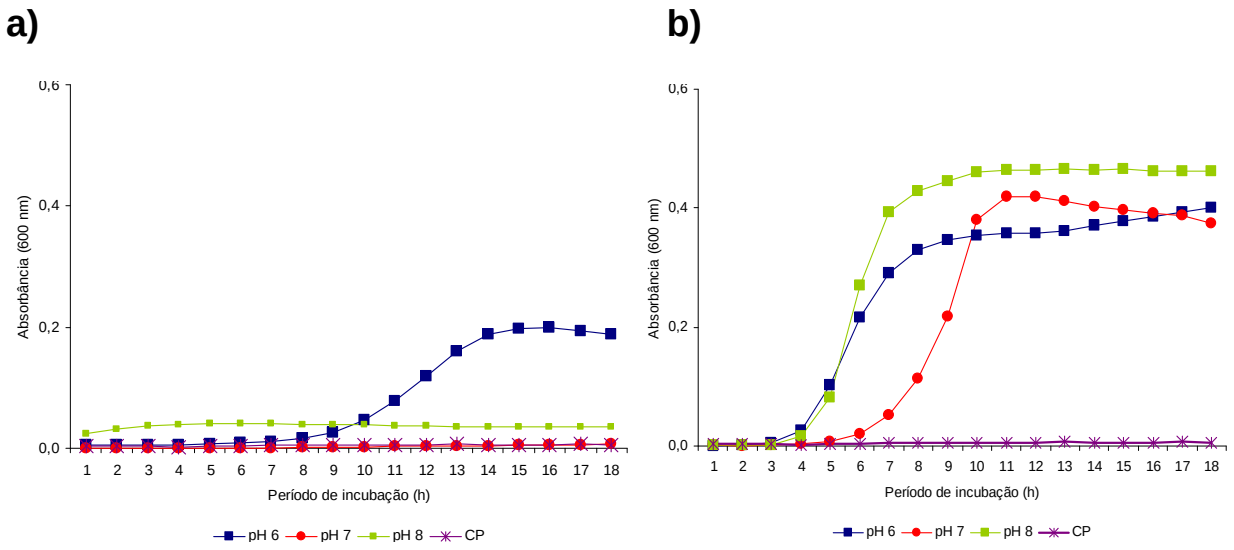


Figura 7 – Curvas de crescimento de *L. monocytogenes.* a) Sob ação de extrato etanólico de erva-mate na concentração inibitória mínima (CIM = 3,13 mg.ml^{-1} em pH 7); b) Controles negativos (ausência de extrato)

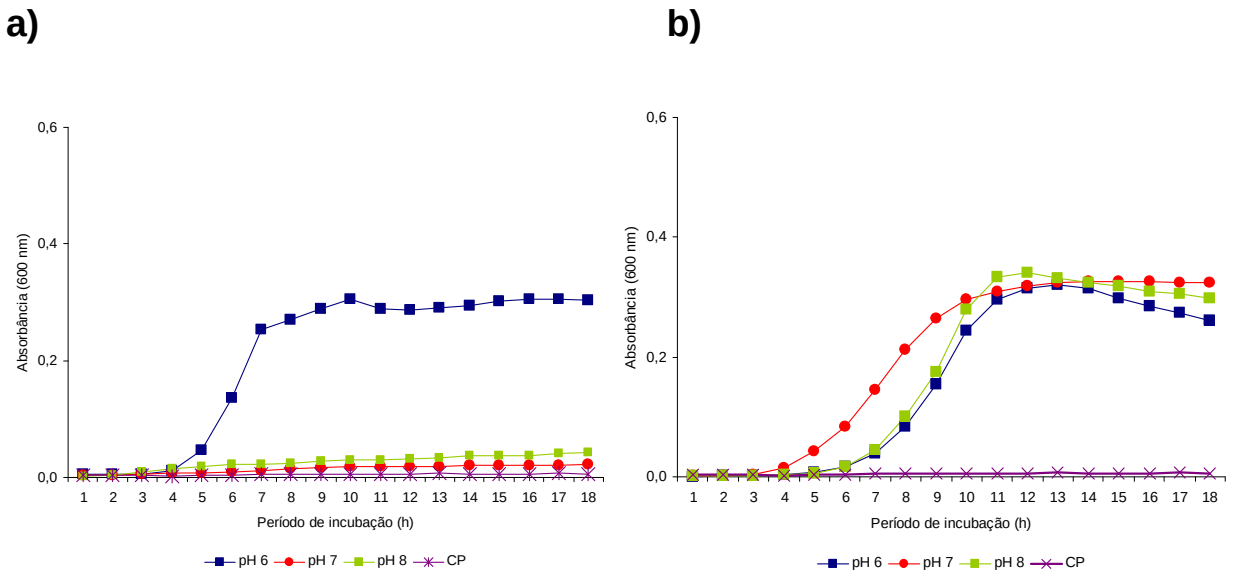


Figura 8 – Curvas de crescimento de *S.* Enteritidis. a) Sob ação de extrato etanólico de erva-mate na concentração inibitória mínima (CIM = 3,13 mg.ml^{-1} em pH 7); b) Controles negativos (ausência de extrato)

Estudo realizado por Gutierrez et al. (2008) avaliou a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de orégano e tomilho em diferentes valores de pH; em pH 6, a fase *lag* na curva de

crescimento de *L. monocytogenes* foi menor que a observada em pH neutro, em concordância com os resultados obtidos pelo presente estudo, embora em pH 5 tenha sido observado aumento considerável da fase *lag*. Wen et al. (2003) observaram aumento da atividade antilisterial de ácidos fenólicos com o decréscimo do pH; o ácido clorogênico, porém, teve atividade antibacteriana maior em pH mais elevados. Esta discrepância, segundo os autores, pode estar relacionada a mudanças no estado de ionização e proporção de moléculas dissociadas em diferentes valores de pH, resultando em diminuição da atividade do ácido clorogênico em pH menores.

Como os valores das constantes de dissociação (*pK*) dos ácidos fenólicos são geralmente maiores que 8,0, a concentração de íons fenóxido é baixa em soluções com pH menores que 7,0 (FRIEDMAN, HENIKA *et al.*, 2003). De acordo com Sauerwald, Schwenk *et al.* (1998), o ácido clorogênico apresenta $pK \approx 8{,}5$. Se a atividade antimicrobiana estiver relacionada com a concentração de íons fenóxido, será mais acentuada quanto maior for o pH do meio. Essa maior atividade antimicrobiana decorre, provavelmente, da capacidade da carga negativa dos íons fenóxidos em alterar o balanço eletroquímico junto ao microambiente bacteriano, facilitando a morte celular (FRIEDMAN, HENIKA *et al.*, 2003). Informações acerca da influência do pH sobre o efeito do extrato são de extrema importância, à medida que essa variante é fundamental para o sucesso da aplicação de antimicrobianos em matrizes alimentares.

3.4 Conclusões

De acordo com os resultados obtidos pelo presente estudo, conclui-se que extratos etanólicos e metanólicos de erva-mate apresentam atividade antimicrobiana sobre bactérias patogênicas de importância em alimentos. O extrato etanólico foi mais eficaz que o metanólico na inibição do crescimento de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *S.* Enteritidis. A atividade antimicrobiana observada parece estar relacionada à presença de compostos derivados do ácido clorogênico, de reconhecidas atividades biológicas. O extrato etanólico mostrou-se ativo em pH neutro e 8, sendo que em pH 6 não demonstrou atividade. A erva-mate consiste, portanto, em uma fonte potencial de extração de compostos antimicrobianos, para aplicação pela indústria de alimentos como conservante natural em alimentos e bebidas.

Referências

ABDALLA, A.E.M.; AYAD, E.H.E. ; EL-HAMAHMY, R.M. Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. **Food Chemistry,** Barking, v. 103, n. 4, p. 1141-1152, 2007.

AIDI WANNES, W.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; BEM JEMIA, M.; OUCHIKH, O.; HAMDAOUI, G.; KCHOUK, M.E.; MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. italica L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology,** London, v. 48, n. 5, p. 1362-1370, 2010.

ANASTASIADI, M.; CHORIANOPOULOS, N.G.; NYCHAS, G.J. Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 57, n. 2, p. 457-463, 2008.

ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **Jounal of Human Nutrition and Dietetics,** Londres, v. 14, n. 3, p. 243-250, 2001.

BAHORUN, T.; LUXIMON-RAMMA, A.; GUNNESS, T.K.; SOOKAR, D.; JUGESSUR, R.; REEBYE, D.; GOOGOOLYE, K.; CROZIER, A.; ARUOMA, O.I. Black tea reduces uric acid and C-reactive protein levels in humans susceptible to cardiovascular diseases. **Toxicology,** Amsterdam, v. 278, n. 1, p. 68-74, 2010.

BASTOS, D.H.M.; ISHIMOTO, E.Y.; MARQUES, M.O.M.; FERRI, A.F.; TORRES, E.A.F.S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis,** San Diego, v. 19, n. 6-7, p. 538-543, 2006.

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences,** Amsterdam, p. 345-58, 2005.

BRACESCO, N.; DELL, M.; ROCHA, A.; BEHTASH, H.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A.; NUNES, E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **Jounal of the Alternative and Complementary Medicine: Research on Paradigm, Practice and Policy,** New York, v. 9, n. 3, p. 379-87, 2003.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, 2010. In press.

BRAVO, L.; GOVA, L.; LECUMBERRI, H. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International,** Essex, v. 40, n. 3, p. 393-405, 2007.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.B.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests:** approved standard – 10th ed. CLSI document M2-A10, 2009a.

_____. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically:** approved standard – 8th ed. CLSI document M7-A8, 2009b.

COGO, L.L.; MONTEIRO, C.L.B.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; CUNICO, M.M.; RIBEIRO, M.L.; CAMARGO, E.R.; KUSSEN, G.M.B.; NOGUEIRA, K.S.; COSTA, L.M. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Brazilian Journal of Microbiology,** São Paulo, v. 41, n. 2, p. 304-309, 2010.

DAVIDSON, P.M.; NAIDU, A.S. Phyto-Phenols. In: NAIDU, A.S. (Ed.). **Natural food antimicrobial systems.** Bocan Raton: CRC Press, p. 265-294, 2000.

DE BIASI, B.; GRAZZIOTIN, N.A.; HOFMANN JÚNIOR, A.E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** João Pessoa, v. 19, n. 2b, p. 582-585, 2009.

DE MEJÍA, E.G.; SONG, Y.S.; HECK, C.I.; RAMÍREZ-MARES, M.V. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods,** New York. v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

DICKEL, M.L.; RATES, S.M.K.; RITTER, M.R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 109, n. 1, p. 60-71, 2007.

DOS SANTOS, M.D.; GOBBO-NETO, L.; ALBARELLA, L.; DE SOUZA, G.E.; LOPES, N.P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 96, n. 3, p. 545-549, 2005.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; MITSUE, F.H.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin,** Tokyo, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.

EL-MASSRY, K.F.; GHORAB, A.H.; HAMDY, A.S.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agriculture and Food Chemistry,** Easton, v. 57, n. 12, p. 5265-5270, 2009.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia,** Milano, v. 72, n. 7, p. 774-778, 2001.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MANDRELL, R.E. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Jounal of Food Protection,** Ames, v. 66, n. 10, p. 1811-21, 2003.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

GUTIÉRREZ, R.M.P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology,** Lausanne, v. 117, n. 1, p. 1-27, 2008.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry,** Barking, v. 122, n. 3, p. 695-699, 2010.

LI, Y.; BUT, P.P.; OOI, V.E. Antiviral activity and mode of action of caffeoylquinic acids from *Schefflera heptaphylla* (L.) Frodin. **Antiviral Research,** Amsterdam, v. 68, n. 1, p. 1-9, 2005.

LIU, L.; SUN, Y.; LAURA, T.; LIANG, X.; YE, H.; ZENG, X. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng. **Food Chemistry,** Barking, v. 112, n. 1, p. 35-41, 2009.

NAKAJIMA, Y.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Sciences,** Amsterdam, v. 80, n. 4, p. 370-377, 2007.

NEGISHI, O.; NEGISHI, Y.; YAMAGUCHI, F.; SUGAHARA, T. Deodorization with ku-ding-cha containing a large amount of caffeoyl quinic acid derivatives. **Journal of Agriculture and Food Chemistry,** Easton, v. 52, n. 17, p. 5513-8, 2004.

PAGLIOSA, C.M.; VIEIRA, M.A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A.L.B.; AMANTE, E.R.; AMBONI, R.D.M.C. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry,** Barking, v. 122, n. 1, p. 173-178, 2010.

PRZYGODDA, F.; ZENILDE, M.N.; CASTALDELLI, A.P.A.; MINELLA, T.V.; VIEIRA, L.P.; CANTELLI, K.; JORDANA, F.; PADOIN, J. Effect of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) on serum cholesterol, triacylglycerides and glucose in Wistar rats fed a diet supplemented with fat and sugar. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** João Pessoa, v. 20, n. 6, p. 956-961, 2010.

VAQUERO, R.M.J.; TOMASSINI, S.L.R.; MANCA, N.M.C.; SAAD, S.A.M. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. **Food Control,** Guildford, v. 21, n. 5, p. 779-785, 2010.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals.** Boca Raton: CRC Press, 2004.

SINGH, R.; AKHTAR, N.; HAGGI, T.M. Green tea polyphenol epigallocatechi3-gallate: Inflammation and arthritis. **Life Sciences,** Amsterdam, v. 86, n. 25-26, p. 907-918, 2010.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; RAVENTÓS-LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology,** New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SAUERWALD, N.; SCHWENK, M.; POLSTER, J.; BENGSCH, E. Spectrometric pK Determination of Daphnetin, Chlorogenic Acid and Quercetin. **Zeitschrift für Naturforschung,** Wiesbaden Tubingen, v. 53b, p. 315-321, 1998.

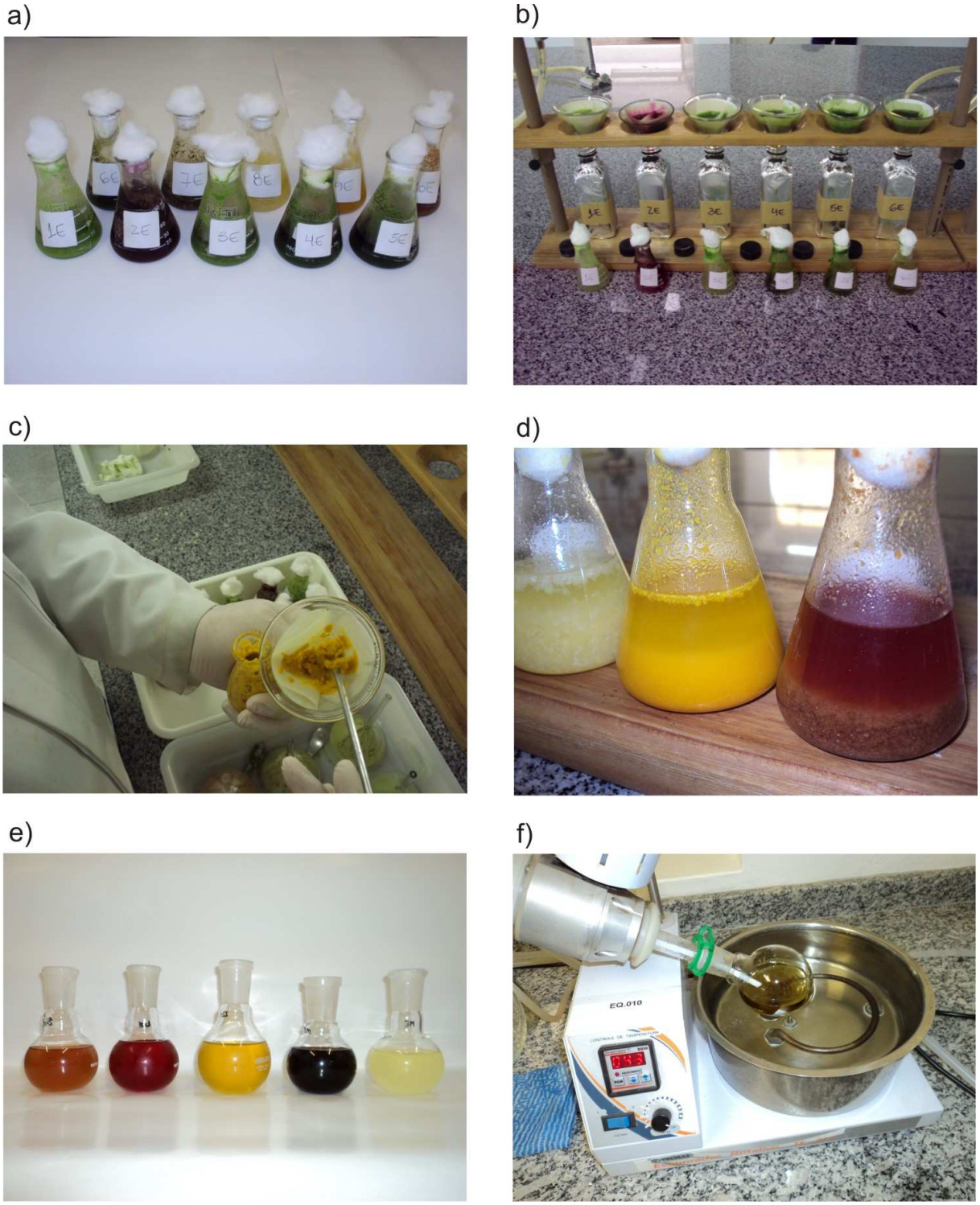
TSAI, T.-H.; TSAI, T-H. ; WU, W-H. ; TSENG J.T-P.; TSAI, P.-J. In vitro antimicrobial and anti-inflammatory effects of herbs against *Propionibacterium acnes*. **Food Chemistry,** Barking, v. 119, n. 3, p. 964-968, 2010.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry.** Dordrecht: Springer Verlag, 2006.

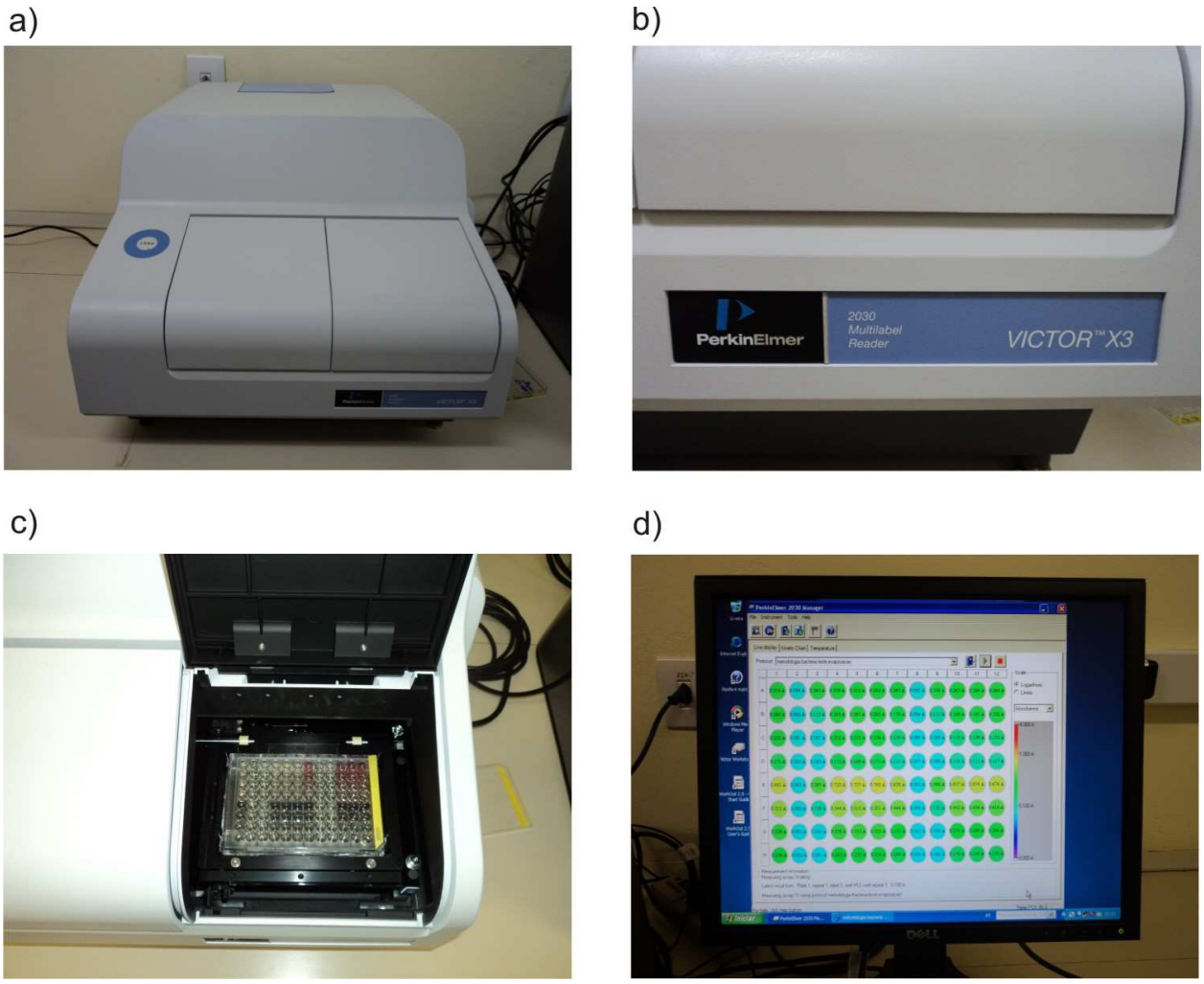
VON STASZEWSKI, M.; PILOSOF, A.M.R.; JAGUS, R.J. Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, n. 1, p. 186-192, 2011.

WEN, A.; DELAQUIS, P.; STANICH, K.; TOIVONEN, P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 3, p. 305-311, 2003.

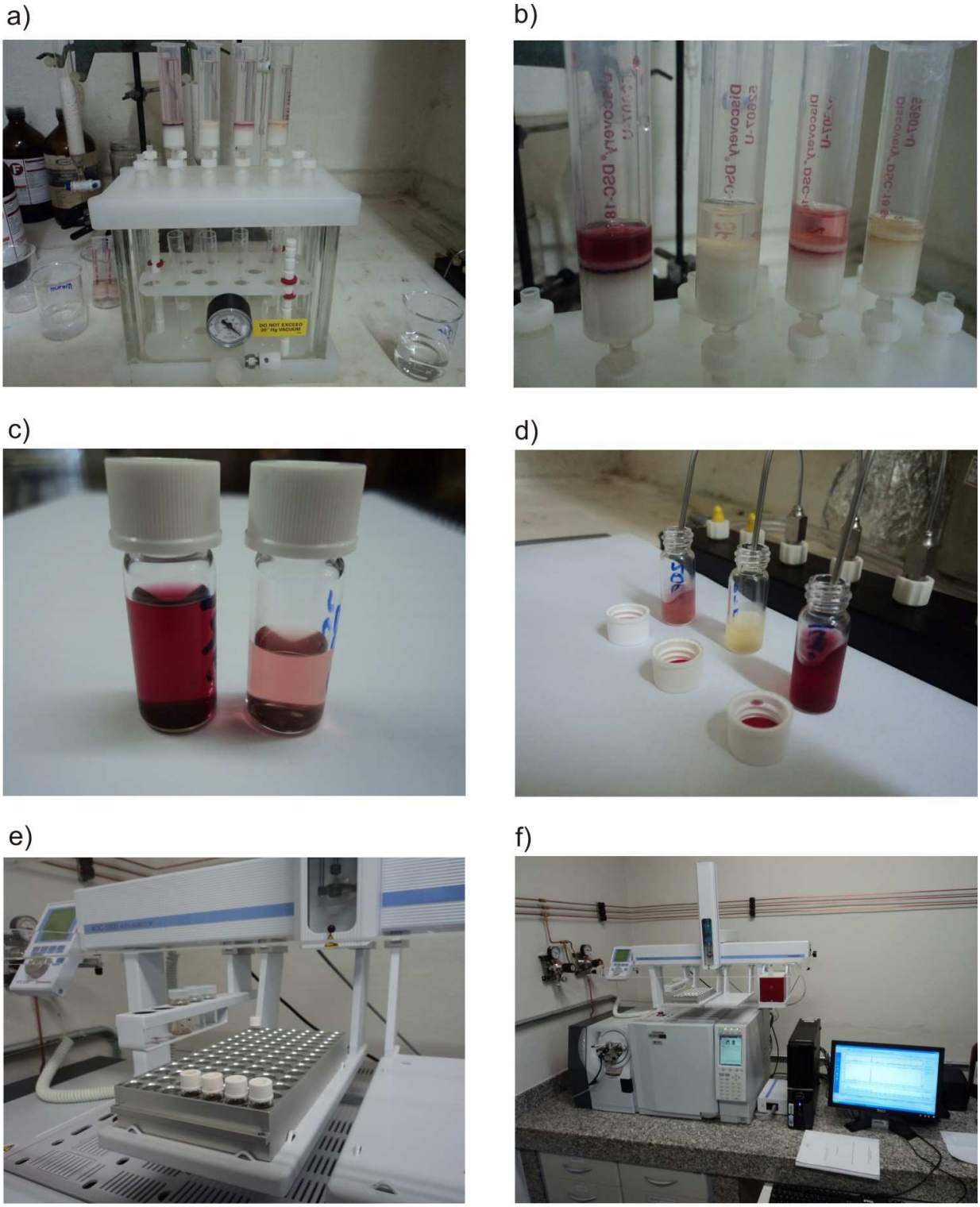
ANEXOS



ANEXO A – Etapas de extração metanólica e etanólica dos resíduos agroindustriais. a) manutenção dos resíduos em contato com os solventes (metanol e etanol) a 4ºC; b) filtração dos extratos após 24 horas; c) coleta do material retido no filtro; d) lavagem do retido e adição de solvente de extração; e) volume total do filtrado obtido após 96 horas; f) evaporação do solvente em evaporador rotativo a 45ºC



ANEXO B – Estudo do crescimento microbiano frente aos extratos estudados. a,b) leitor de microplacas Victor™X3 (PerkinElmer®); c) câmara de incubação contendo microplaca com extratos em diferentes diluições; d) leituras das absorbâncias gerados pelo software VictorStation



ANEXO C – Composição química dos resíduos agroindustriais. a) remoção de interferentes das amostras pela técnica SPE (*Solid Phase Extraction*); b) detalhe das colunas de separação; c) *vial* contendo fração coletada após remoção dos interferentes da amostra; d) evaporação do eluente por corrente de nitrogênio; e,f) análise das amostras por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM)