



EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS OBTIDOS DE FONTES NATURAIS PARA AMPLIAR A CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS.

Giovanna A. Fabiano, Fabíola L. Pena, Mariana C. de Souza, Maurício A. Rostagno, Adriane E. A. Moraes.

Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp Limeira, LabMAS e LLPP.

Agência Financiadora: PIBIC/CNPq **Vigência:** 2019-2020

INTRODUÇÃO

A atividade antimicrobiana e/ou antioxidante, provenientes de fontes vegetais, está principalmente relacionada com a presença de alguns compostos químicos, denominados na literatura como compostos bioativos (AZIZ, KARBOUNE, 2018). Estes compostos antioxidantes e antimicrobianos que são naturais das espécies podem não só desempenhar um papel conservante, do ponto de vista microbiológico, como também serem benéficos a saúde do consumidor (FRANCO, NACARRO, MARTÍNEZ-PINILLA, 2019). Diversas pesquisas científicas destacam alguns compostos extraídos de plantas e vegetais, podendo-se citar os vegetais café, tomilho, gengibre e alho como detentores de grande variedade e quantidade de componentes funcionais (DAGLIA et al., 1994; ARCHANA, ABRAHAM, 2011 STAHL-BISKUP, SÁEZ, 2003; OH et al., 2013; PANPATIL et al., 2013).

O café (*Coffea sp.*) possui diversos compostos bioativos, dentre eles destacam-se as melanoidinas, a cafeína, o ácido clorogênico e o ácido cafeico (RUFIAN-HENARES, DE LA CUEVA, 2009; ALMEIDA et al., 2006). Seu efeito antioxidante está associado a proteção e prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (GREENBERG et al., 2005; MOSTOFISKY et al., 2012), além do efeito antibacteriano para variedades bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas (DAGLIA et al., 1994).

No tomilho (*Thymus vulgaris*) os principais compostos encontrados são: flavonoides, timol, eugenol, fenóis, saponinas, luteolina e flavonas (DORMAN, DEANS, 2000). O tomilho também apresentou eficácia em estudos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MARTINS et al., 2015). Neste cenário, destacam-se os compostos timol e carvacrol, os quais foram diretamente relacionadas com o poder antibacteriano e antifúngico (GONÇALVES et al., 2017; ELAHIAN et al., 2020).

Para o gengibre (*Zingiber officinale*) os potenciais efeitos benéficos à saúde estão relacionados ao seu grande poder antioxidante (TOHMA et al., 2017). Tudo decorre dos compostos bioativos presentes, com destaque para os ácidos fenólicos e flavonoides (ZUBAIR et al., 2020). O principal componente descrito é o gingerol, que apresenta propriedades antibacterianas e antifúngicas (PARK, BAE, LEE, 2008). Conforme a literatura, o gengibre demonstrou efeito bacteriostático tanto para bactérias Gram positivas quanto para Gram negativas (ISLAM et al., 2014).

O alho (*Allium sativum*) também possui potencial antibacteriano e antifúngico (PANPATIL et al., 2013). São descritas inibições de crescimento de espécies como: *Bacillus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* e *Aspergillus niger* (KYUNG, 2012). A alicina é classificada como a principal substância antimicrobiana do alho (KYUNG, 2012). Além disso, o alho possui

componentes como alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos e esteroides de grande interesse biológico (ANGGRAINI, DWIYANTI, THURAI DAH, 2020).

MÉTODOS

Para obtenção dos extratos analisados foram obtidas amostras orgânicas de café (*Coffea sp.*) (Café 3 Corações, Minas Gerais, São Paulo, Brasil), tomilho (*Thymus vulgaris*), gengibre (*Zingiber officinale*) e alho (*Allium sativum*) (Meu Quintal Orgânicos, Limeira, São Paulo, Brasil). As amostras foram processadas utilizando a metodologia de extração sequencial com etanol (50% e 100%).

Após obtenção dos extratos estes foram armazenados à -20°C e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no sistema “Extract-US” (FAPESP 2013/04304-4 – Patente pendente), utilizando a metodologia de Rostagno e colaboradores (2011). Também foram realizadas análises de Compostos Fenólicos Totais, FRAP, ABTS e DPPH para determinação do potencial antioxidante das amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para determinação do potencial antimicrobiano, foi realizada análise de Concentração Mínima Inibitória pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2012) avaliando-se este potencial sobre microrganismos probióticos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises de HPLC estão apresentados na **Figura 1**. Para cada amostra, foram registrados dois cromatogramas, nos quais é possível observar os picos dos compostos presentes, visualizados em 260nm.

Para identificação destes compostos foram injetados padrões e observadas as coincidências nos picos. Os cromatogramas, por tanto, mostram tanto os picos dos extratos quanto dos padrões analíticos testados.

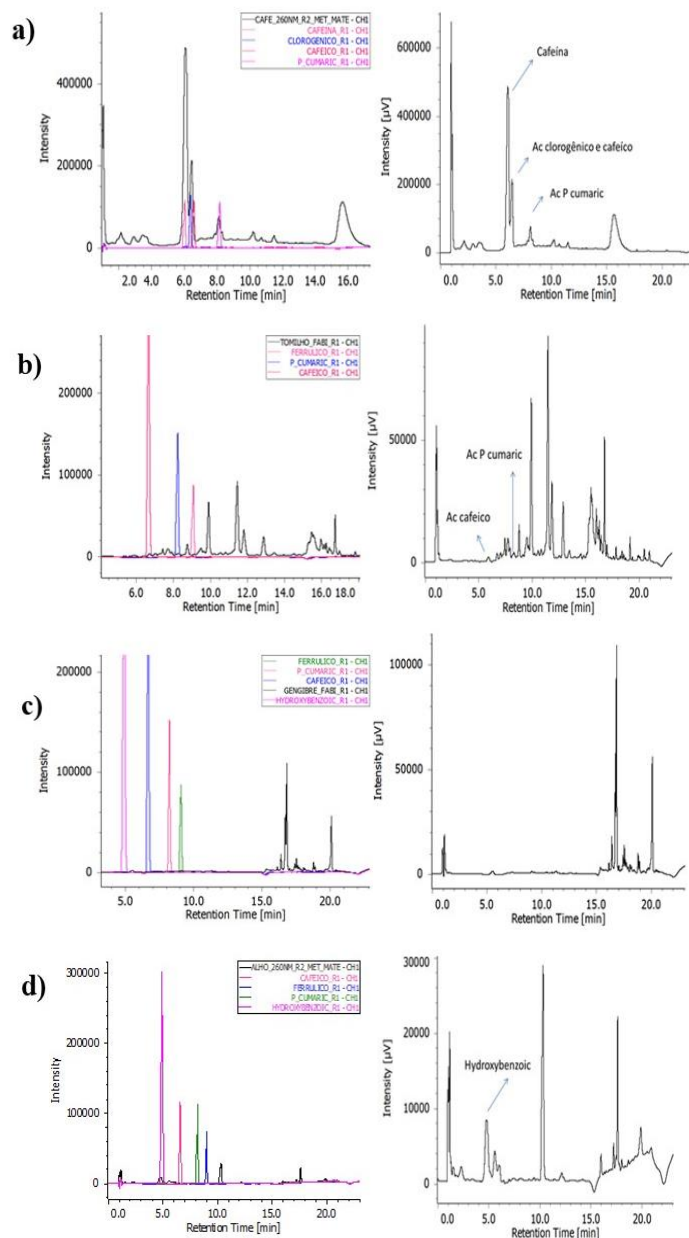


Figura 1. Perfil cromatográfico dos extratos vegetais por HPLC (260nm). Sendo: (a) café, (b) tomilho, (c) gengibre, (d) alho.

Para determinação da atividade antioxidante dos extratos foram utilizados diversos métodos a fim de apresentar um parâmetro mais abrangente desta atividade nas amostras selecionadas (**Tabela 1**). O potencial antimicrobiano pelo método de microdiluição está apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 1. Característica antioxidante dos extratos vegetais de café, tomilho, gengibre e alho.

EXTRATO	Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/L)		FRAP ($\mu\text{M FeSO}_4$)		ABTS ($\mu\text{M Trolox}$)		DPPH (%AA)	
	mean	std	mean	std	mean	std	mean	std
	Café	1.821,73	93,12	50.162,64	4.015,00	14.088,07	1439,10	77,66
Tomilho	751,57	82,69	27.773,95	3107,97	7.847,81	1372,81	79,56	0,92
Gengibre	116,07	1,48	2.938,60	32,82	2.114,11	82,84	18,69	2,67
Alho	36,20	1,67	303,28	1,63	91,22	2,55	12,89	0,86

Tabela 2. Atividade antimicrobiana de extratos brutos em microrganismos probióticos pelo método de microdiluição em caldo (concentração mínima inibitória).

Microrganismo	CMI (mg GAE/L)			Alho
	Café	Tomilho	Gengibre	
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> (BB12)	*ND	*ND	*ND	18,1
<i>Lactocaseibacillus casei</i> (BGP93)	*ND	*ND	*ND	18,1

CMI = Concentração mínima inibitória;

Concentrações iniciais de fenólicos totais nos extratos: alho = 36,20mg GAE/L; tomilho = 751,57mg GAE/L; gengibre = 116,07mg GAE/L; café = 1821,73mg GAE/L.

De acordo com as análises de antioxidantes realizadas, o café apresentou a maior quantidade de compostos fenólicos totais e maior atividade antioxidante pelo método FRAP e ABTS. Somente na análise por DPPH se apresentou semelhante ao tomilho. Tais resultados estão em concordância com os resultados encontrados a partir da análise de HPLC, sendo possível observar a cafeína, o ácido clorogênico, o ácido cafeico e o ácido p-cumárico. Também por HPLC, Santiago e colaboradores (2020), identificaram trigonelina, ácido clorogênico, cafeína e ácidos orgânicos em amostras de café. O processo de torrefação do café adiciona alguns compostos, principalmente melanoidinas, que é obtida por meio da reação de Maillard (NEBESNY, BUDRYN, 2003). A partir disso, percebe-se que as diferentes espécies e o processamento do café podem interferir na presença e quantidade de compostos.

Unindo-se aos resultados de demais estudos, é possível inferir que quanto maior a atividade e conteúdo antioxidante, melhor é a atividade antibacteriana de um determinado sistema (TASEW et al., 2020). Em nossa análise piloto de Concentração Mínima Inibitória (CMI), houve crescimento de probióticos na presença do extrato alcóolico de café para todas as concentrações testadas. Estudos anteriores comprovaram a ação antimicrobiana do café em bactérias Gram-positivas e negativas e em fungos. Segundo Lian (2020), essa ação seria mais potente em bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, (CMI de 8mg/mL) do que Gram-negativas (32 a 64 mg/mL). De acordo com Lobato-Calleros e colaboradores (2020), a atividade antifúngica seria pela predominância do ácido clorogênico e ácido cafeico, os quais foram identificados na análise de HPLC.

Dentre os extratos vegetais analisados, o tomilho apresentou a segunda melhor ação antioxidante, com destaque na quantidade dos fenólicos totais. Na análise de HPLC, identificou-se a presença do ácido cafeico e ácido p-cumárico. Porém, já foram descritas na literatura a partir do mesmo método, a presença dos ácidos rosmarínico, p-cumárico, cafeico, cinâmico, clorogênico e dos compostos ferúlico, apigenina, luteolina, quercetina, linalol, carvacrol, sendo que o principal componente presente no tomilho é o timol (ROBY et al., 2013; PALMIERI et al., 2020; KOSAKOWSKA et al., 2020). Pelo o método de microdiluição, o tomilho não inibiu o crescimento das cepas probióticas. Entretanto, para Paulus e colaboradores (2020), foram necessários baixos valores de CMI (0,195 µL/mL) para inibir *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis*. Além disso, descreveu-se também ação inibitória de *Salmonella* em carnes suínas, com CMI de 320 a 640 µg/ml (BOSKOVIC et al., 2017).

O gengibre demonstrou-se como o terceiro extrato vegetal analisado com melhor concentração e ação antioxidante pelos métodos avaliados. A análise de HPLC demonstrou no estudo de Yamprasert e colaboradores (2020) e Salmon e seus colaboradores (2012), o 6-gingerol como principal componente do gengibre. A análise de CMI não demonstrou inibição dos probióticos pelo extrato de gengibre. Contudo, na literatura foram descritas atividades antimicrobianas contra *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, espécies de *Shigella*, espécies de *Bacillus* e *Escherichia coli* (TRENTIN et al., 2020; NWOKAFOR et al., 2020).

O alho foi o extrato que apresentou menor capacidade antioxidante, quando comparado aos demais. Apesar disso, foi o extrato bruto com inibição no crescimento das duas culturas de probióticos testadas (CMI de 18,1 mg GAE/L em ambas), confirmando um potencial antimicrobiano importante para este grupo de microrganismos. A HPLC permitiu identificar o composto hidroxibenzoico nesta amostra. Ichikawa e colaboradores (2003) identificaram em extratos de gengibre os demais compostos: ácido p-cumárico e ácido ferúlico. Em outro projeto, o extrato aquoso

de alho branco teve a melhor atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* e sua ação foi comparável à do antibiótico tetraciclina (SERRANO et al., 2020).

Apesar do alho apresentar uma menor concentração de compostos fenólicos totais, ele foi o único extrato que apresentou CMI com inibição de probióticos. Dessa forma, sua ação antimicrobiana pode não estar relacionada somente com a quantidade de fenólicos e sim com o tipo de composto presente. Booyens e colaboradores (2014), demonstraram que o composto alicina, em concentrações bactericidas mínimas, teve um efeito inibidor de bifidobactérias de maneira semelhante aos patógenos. Nesse estudo, alerta-se para a perda de viabilidade das bifidobactérias com o uso do alho cru esmagado, pois esse processamento libera ainda mais alicina, interferindo no probiótico (BOOYENS et al., 2014). Com isso, a metodologia de processamento e extração do alho podem determinar diferentes ações antimicrobianas em uma mesma cepa (ALTUNTAS, KORUKLUOGLU, 2019). Seriam necessários mais estudos para avaliar a composição química e verificar com qual composto chave está ligada essa inibição.

CONCLUSÃO

As análises realizadas e o compilado dos estudos avaliados, buscaram explorar a ideia de que os potenciais antioxidantes e antimicrobianos de vegetais podem estar intimamente ligados. Por meio da determinação do potencial antimicrobiano em probióticos foi possível avaliar a possibilidade da associação de componentes vegetais antioxidantes tais como café, tomilho ou gengibre, sem apresentar efeito inibitório no potencial probiótico, tanto do alimento veiculado, quanto na própria microbiota. Foi observado que o alho talvez não possa ser utilizado da mesma maneira, devido ao seu efeito antimicrobiano para esta classe de microrganismos. Neste cenário, propõe-se novos estudos para empregar tais extratos vegetais em alimentos e, com isso, beneficiar não só a vida de prateleira e contaminação, como também efeitos de controle do estresse oxidativo, potencializando a saúde dos consumidores.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. A. P. et al. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8738-8743, 2006.
- ALTUNTAS, S.; KORUKLUOGLU, M. Growth and effect of garlic (*Allium sativum*) on selected beneficial bacteria. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 4, p. 897-904, 2019.
- ANGGRAINI, A. L.; DWIYANTI, R. D.; THURAI DAH, A. Garlic Extract (*Allium sativum* L.) Effectively Inhibits *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by Invitro Test. **Tropical Health and Medical Research**, v. 2, n. 2, p. 61-68, 2020.
- ARCHANA, S.; ABRAHAM, Jayanthi. Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 8, p. 149, 2011.
- AZIZ, M.; KARBOUNE, S. Natural antimicrobial/antioxidant agents in meat and poultry products as well as fruits and vegetables: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 3, p. 486-511, 2018.
- BOOYENS, J.; LABUSCHAGNE, M. C.; THANTSHA, M. S. In vitro antibacterial mechanism of action of crude garlic (*Allium sativum*) clove extract on selected probiotic *Bifidobacterium* species as revealed by SEM, TEM, and SDS-PAGE analysis. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 6, n. 2, p. 82-87, 2014.
- BOSKOVIC, M. et al. Inhibition of Salmonella by thyme essential oil and its effect on microbiological and sensory properties of minced pork meat packaged under vacuum and modified atmosphere. **International journal of food microbiology**, v. 258, p. 58-67, 2017.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2012.
- DAGLIA, M.; CUZZONI, M. T.; DACARRO, C. Antibacterial activity of coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 2270-2272, 1994.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.
- ELAHIAN, F. et al. Variety of antibacterial and antifungal activity of *Thymus kotschyanus* essential oil collected from fourteen regions of Iran. **J Birjand Univ Med Sci**, v. 27, n. 3, 2020.
- FRANCO, R.; NAVARRO, G.; MARTÍNEZ-PINILLA, E. Antioxidants versus Food Antioxidant Additives and Food Preservatives. **Antioxidants**, v. 8, n. 11, p. 542, 2019.

- GONÇALVES, N. D. et al. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. **Food Research International**, v.96, p.154-160, 2017.
- GREENBERG, J. A. et al. Coffee, tea and diabetes: the role of weight loss and caffeine. **International journal of obesity**, v. 29, n. 9, p. 1121-1129, 2005.
- ISLAM, K. et al. Antimicrobial activity of ginger (*Zingiber officinale*) extracts against food-borne pathogenic bacteria. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 3, n. 3, p. 867-871, 2014.
- KOSAKOWSKA, O. et al. Morphological and Chemical Traits as Quality Determinants of Common Thyme (*Thymus vulgaris* L.), on the Example of 'Standard Winter' Cultivar. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 909, 2020.
- KYUNG, K. H. Antimicrobial properties of allium species. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 142-147, 2012.
- LIAN, Y. L. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities in Spent Coffee Grounds. **Tunku Abdul Rahman University College**, 2020.
- LOBATO-CALLEROS, C. et al. Wet processing coffee waste as an alternative to produce extracts with antifungal activity: In vitro and in vivo valorization. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 19, n. Sup. 1, p. 135-149, 2020.
- MARTINS, N. et al. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. **Food chemistry**, v. 167, p. 131-137, 2015.
- MOSTOFISKY, E. et al. Habitual coffee consumption and risk of heart failure: a dose-response meta-analysis. **Circulation: Heart Failure**, v. 5, n. 4, p. 401-405, 2012.
- NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convection and microwave roasting methods and content of certain compounds. **European Food Research and Technology**, v. 217, n. 2, p. 157-163, 2003.
- NWOKAFOR, C. V. et al. Antimicrobial Activities of Moringa, Neem and Ginger Plant Extracts against Bacteria Associated with the Spoilage of Fruit Juice. **South Asian Journal of Research in Microbiology**, p. 21-30, 2020.
- OH, J. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food control**, v. 31, n. 2, p. 403-409, 2013.
- PALMIERI, S. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Thyme, Hemp and Coriander Extracts: A Comparison Study of Maceration, Soxhlet, UAE and RSLDE Techniques. **Foods**, v. 9, n. 9, p. 1221, 2020.
- PANPATIL, V. V. et al. In vitro evaluation on antioxidant and antimicrobial activity of spice extracts of ginger, turmeric and garlic. **J. Pharmacogn. Phytochem.**, v. 2, p. 143-148, 2013.
- PARK, M.; BAE, J.; LEE, D. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 22, n. 11, p. 1446-1449, 2008.
- ROBY, M. H. H. et al. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 827-831, 2013.
- ROSTAGNO, M. A. et al. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. **Analytica chimica acta**, v. 685, n. 2, p. 204-211, 2011.
- RUFIAN-HENARES, J. A.; DE LA CUEVA, S. P. Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins: A Study of Their Metal-Chelating Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 432-438, 2009.
- SALMON, C. N. et al. Characterisation of cultivars of Jamaican ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by HPTLC and HPLC. **Food chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1517-1522, 2012.
- SANTIAGO, W. D. et al. Development and validation of chromatographic methods to quantify organic compounds in green coffee (*Coffea arabica*) beans. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14(08), p.1275-1282, 2020.
- STAHL-BISKUP, E.; SÁEZ, F. Thyme: the genus *Thymus*. **CRC Press**, 2003.
- TASEW, T. et al. In Vitro Antibacterial and Antioxidant Activities of Roasted and Green Coffee Beans Originating from Different Regions of Ethiopia. **International Journal of Food Science**, v. 2020, 2020.
- TOHMA, H. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. **Journal of food measurement and characterization**, v. 11, n. 2, p. 556-566, 2017.
- TRENTIN, M. M. et al. O óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e peptídeo sintetizado pelo *Lactococcus lactis* como agentes antimicrobianos contra *Salmonella Enteritidis* e *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 3, p. 5381-5391, 2020.
- YAMPRASERT, R. et al. Accelerated Stability Study on Anti-Allergic, Anti-inflammatory Activities and Phytochemical Contents of the Ethanolic Extract of *Zingiber officinale* Roscoe. **Science & Technology Asia**, p. 86-96, 2020.
- ZUBAIR, S. et al. Studies on impact of different processing methods on phyto-chemical and antioxidant activity of dried ginger (*Zingiber officinale* L.) rhizome. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 4, p. 3153-3158, 2020.