

Atividade antimicrobiana de óleo de semente de uva (*Vitis vinifera*, L.)

Antimicrobial activity of grape seed oil (Vitis vinifera, L.)

Valeska Rodrigues Roque¹, Marjana Radünz², Pâmela Alves³, Eliezer Avila Gandra⁴

RESUMO

Nas atividades de processamento da uva é gerado grande quantidade de resíduo, como, por exemplo a semente, a qual é constituída de compostos, como óleos, que podem apresentar características antimicrobianas. Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de óleo de semente de uva frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*. A atividade antimicrobiana foi avaliada através dos métodos de Disco Difusão, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Foram formados halos de inibição para *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*. A concentração inibitória mínima do óleo foi de 0,33 mg mL⁻¹ para *S. Typhimurium* e 3,33 mg mL⁻¹ para *L. monocytogenes*, não foi verificada inibição de crescimento para *S. aureus* e *E. coli*. Não foi observado concentração bactericida mínima para nenhuma das bactérias testadas. Conclui-se que o óleo de semente de uva possui potencial antimicrobiano podendo ser utilizado em alimentos, entretanto novos estudos se tornam necessários para determinar adequação das concentrações.

Palavras-chave: Óleo de semente de uva. Atividade antimicrobiana. Bactérias Patogênicas.

ABSTRACT

In the grape processing activities, a large amount of residue is generated, for example the seed, which is composed of compounds that have antimicrobial characteristics. Therefore, the main objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of grape seed oil against Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Salmonella Typhimurium. The antimicrobial activity was done by the disc diffusion method, determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Inhibition halos formation was found for S. aureus, L. monocytogenes and S. Typhimurium. The minimum inhibitory concentration of the oil was 0.33 mg mL⁻¹ for S. Typhimurium and 3.33 mg mL⁻¹ for L. monocytogenes, and it was not possible to determine growth inhibition for S. aureus and E. coli. Minimum bactericidal concentration was not observed for any of the bacteria tested. It is concluded that the grape seed oil has microbial potential and can be used in food, however, new studies are necessary to determine the adequacy of the concentrations.

¹Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Pelotas.

²Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Pelotas.

³Mestranda em Nutrição e Alimentos na Universidade Federal de Pelotas.

⁴Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial na Universidade Federal de Pelotas.

Keywords: *Grape seed oil. Antimicrobial activity. Pathogenic bacteria.*

Introdução

A uva é uma fruta de elevado valor nutricional, sendo consumida *in-natura* ou utilizada para produção de vinhos, espumantes, sucos, geleias e passas. Nas atividades de processamento são geradas grandes quantidades de resíduo, sendo que a cada 100 litros de vinho tinto obtêm-se 25 kg de resíduo sendo destes 17 kg de bagaço. As sementes de uvas também são resíduos e geralmente são utilizadas como complemento de ração animal ou para a adubação do solo. Uma alternativa de uso para o resíduo da indústria vinícola é a extração de óleo de semente de uva, o qual possui características que o tornam superior a outros óleos comercializados. (CHINAZZO, 2010; FREITAS, 2007; KAJIHARA et al., 2013; MELO, 2010; OLIVEIRA, 2010; ROCKENBACH et al., 2008).

O interesse crescente em explorar os subprodutos da vinificação também se dá pelo fato de que nas vinícolas as grandes quantidades de resíduos gerados apresentam sérios problemas de armazenagem, de transformação, ou de eliminação, em termos ecológicos e econômicos. A recuperação de compostos antioxidantes e antimicrobianos, por exemplo, dos desperdícios contínuos da indústria de vinho também pode representar um avanço significativo na manutenção do equilíbrio do meio ambiente (CHINAZZO, 2010; MELO, 2010; OLIVEIRA, 2010; ROCKENBACH et al., 2008).

O consumo de óleos vegetais vem aumentando no Brasil cada vez mais, e um dos principais fatores que levam a isso é o valor nutricional desses óleos. Óleos como de girassol, oliva, linhaça e palma já possuem um valor comercial significativo. O óleo de uva entra nesse segmento de mercado, e vem sendo bastante investigado em pesquisas científicas (CHINAZZO, 2010).

O bagaço é caracterizado como subproduto da vinificação, contendo principalmente sementes e cascas. As sementes contêm a maior parte do óleo da uva, entre 14 e 17%, de acordo com a variedade (OLIVEIRA, 2010; ROCKENBACH, 2010). O óleo extraído da semente da uva é um produto que pode ser utilizado como matéria-prima em uma grande variedade de aplicações, na indústria alimentícia, na de cosméticos, na farmacêutica e na de tintas, por exemplo (FREITAS, 2007).

Dentre os compostos fenólicos presentes na semente da uva, os flavanóis se encontram em maior teor, e as estruturas de presença dominante são os polímeros catequinas, oligômeros epicatequinas e os monômeros proantocianidinas (CHINAZZO, 2010). Além disto, o óleo é constituído por alto teor de ácidos graxos insaturados (linoleico e oleico), apresenta também atividade antioxidante, têm ação antimicrobiana e uma série de potenciais, devido a presença de vitamina E e de compostos fenólicos (FREITAS, 2007; OLIVEIRA, 2010).

O uso de produtos naturais para o tratamento de doenças é uma prática muito antiga devido aos compostos presentes nestes produtos possuírem baixa toxicidade mesmo em doses altas. Se tem conhecimento de diversos de antibióticos, mas ao longo dos anos microrganismos vem desenvolvendo resistência a diversos tipos de antimicrobianos, diminuindo a eficácia dos mesmos, e alguns antimicrobianos químicos sintéticos apresentam toxicidade. Há um crescimento do número de microrganismos resistentes aos mais variados antibióticos, incentivando a pesquisa de novas substâncias antimicrobianas, que atuam diretamente sobre os microrganismos, agindo sobre sua membrana celular, suas enzimas ou seu DNA, promovendo a inibição do seu crescimento ou sua destruição (OLIVEIRA, 2010).

Em função destes benefícios e visando reaproveitamento, o objetivo do presente trabalho é avaliar a atividade antimicrobiana de óleo de semente de uva frente a cepas bacterianas.

Materiais e métodos

Aquisição da amostra

As amostras de óleo de semente de uva foram adquiridas no comércio da cidade de Pelotas oriundas da cidade de Panambi-RS.

Atividade antimicrobiana

A avaliação do efeito antimicrobiano do óleo de semente de uva foi realizada por meio de três metodologias: disco difusão, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. O efeito foi avaliado frente a cepas padrão das espécies bacterianas

Salmonella Typhimurium (ATCC 13311), *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832).

Reativação dos microrganismos

As bactérias utilizadas eram mantidas sob congelamento em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3:1 (v:v). Para realizar a reativação, uma alçada dessas bactérias foi transferida para caldo Soja Trypticaseína (TSB) e incubadas em estufa durante 24 h a 37 °C. Após uma alçada de cada espécie foi estriada em placas de Petri com meios seletivos, sendo ágar Entérico Hektoen (HEA) para *S.*

Typhimurium, ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli*, ágar Oxford para *L. monocytogenes* e ágar Baird-Paker para *S. aureus*, e incubadas por 24/48 h a 37 °C, para o isolamento das colônias.

A partir do crescimento bacteriano nas placas de Petri, foi extraída uma alçada e ressuspendida em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada na concentração 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Disco difusão

A análise de disco difusão foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2015a) com pequenas modificações. Uma solução salina padronizada contendo inóculo bacteriano foi semeada com auxílio de um *swab* estéril na superfície de placas com ágar Muller-Hinton. Em seguida foram adicionados discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de 6 mm, em seguida 10 µL de óleo de semente de uva foram aplicados sobre os discos de papel e posteriormente as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição e os resultados expressos em centímetros.

Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2015b) com pequenas modificações. Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde foram

acrescentadas em cada poço 100 µL de caldo BHI, 100 µL de inóculo (80 µL de caldo BHI e 20 µL de água salina com crescimento bacteriano) e óleo essencial em cinco diferentes concentrações de óleo puro (100 µL de óleo de semente de uva puro); 1:5 (20 µL de óleo de semente de uva e 80 µL de dimetilsulfóxido (DMSO)); 1:10 (10 µL de óleo de semente de uva e 90 µL de DMSO); 1:100 (1 µL de óleo de semente de uva e 99 µL de DMSO) e 1:1000 (0,1 µL de óleo de semente de uva e 99,9 µL de DMSO).

Logo após as placas de microtitulação foram avaliadas em espectrofotômetro (Biochrom EZ Read 400) a 620 nm e incubadas por 24 h a 37 °C e em seguida realizada nova leitura em espectrofotômetro. A CIM foi considerada como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura.

Concentração Bactericida Mínima

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada de acordo com o método descrito por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações. Após a realização da CIM, foram retirados 15 µL dos poços das amostras que tiveram inibição e estriados em placas de Petri com ágar BHA (*Brain Heart Infusion Agar*) e incubados por 24 h a 37 °C. Foi considerada a mínima concentração bactericida as placas onde não houve crescimento bacteriano.

Resultados e discussão

A formação de halos e seu tamanho indicam a suscetibilidade das bactérias frente ao óleo, quando estes halos forem menores que 0,7 cm são considerados não-ativos frente a bactéria, e quando apresentarem diâmetro maior que 1,2 cm são considerados de efeito inibitório satisfatório segundo Arora & Kaur (1999), em razão disto observa-se que o óleo de semente de uva foi ativo frente as bactérias avaliadas, com exceção da *E. coli* (Tabela 1).

Tabela 1. Halos de inibição obtidos pelo método de disco difusão por aplicação de óleo de semente de uva frente as bactérias *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Bactérias	Halo de inibição (cm*)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,88±0,07
<i>Escherichia coli</i>	0,00±0,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,85±0,09
<i>Salmonella Thyphimurium</i>	0,88±0,07

*Média das triplicatas

Os halos de inibição encontrados no presente estudo foram diferentes do estudo realizado por Karaman et al. (2015), onde o óleo de uva não apresentou halos de inibição frente *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium*. Quando avaliada a inibição para *L. monocytogenes*, o halo de inibição foi inferior ao encontrado por Baydar et al. (2003), os quais apresentaram diâmetro de 3,35 cm.

Outro estudo avaliou a atividade antibacteriana dos extratos de sementes de três diferentes uvas e verificou-se a formação de halos de inibição frente a quinze bactérias, entre elas *E. coli* com halos entre 2,47 a 2,6 cm, *S. aureus* com 2,2 a 2,57 cm e *S. Typhimurium* com halos de 2,37 a 2,7 cm (Baydar et al., 2005). Os autores consideraram o composto fenólico ácido gálico, presente nas sementes das uvas, o componente ativo contra as bactérias testadas.

Segundo Duarte et al. (2007) um óleo deve possuir concentração inibitória mínima de até 0,5 mg mL⁻¹ para ter uma forte atividade antimicrobiana; entre 0,6 a 1,5 mg mL⁻¹ para moderada e acima de 1,6 mg mL⁻¹ para fraca atividade, portanto o óleo de semente de uva do presente estudo apresentou forte atividade antimicrobiana para *S. Typhimurium* e moderada para *L. monocytogenes*, entretanto não possuiu efeito frente a *S. aureus* e *E. coli*, conforme pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima do óleo de semente de uva frente as bactérias *Salmonella*

Bactérias	Concentração* (mg mL ⁻¹)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ns**
<i>Escherichia coli</i>	ns**
<i>Listeria monocytogenes</i>	3,33
<i>Salmonella Typhimurium</i>	0,33

*Concentração diluída com dimetilsulfóxido

** ausência de inibição nas concentrações testadas

O estudo de Rotava et al. (2009) avaliou o extrato da semente de uva e encontrou para *E. coli* valores de concentração inibitória mínima de 39,36 mg mL⁻¹ e para concentração bactericida mínima 103,9 mg mL⁻¹. Para *S. aureus*, os valores foram de 20,6 e 45,2 mg mL⁻¹, para concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima, respectivamente.

Quando avaliada a concentração bactericida mínima do óleo de semente de uva nas concentrações 3,33 mg mL⁻¹ e 0,33 mg mL⁻¹, observou-se que não ocorreu morte bacteriana de *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*.

Tabela 3. Concentração bactericida mínima do óleo de semente de uva frente as bactérias *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes*

Bactérias	Concentrações (mg mL ⁻¹)	
	3,33*	0,33*
<i>Salmonella Typhimurium</i>	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+

*Número de diluições do óleo essencial com dimetilsulfóxido; + Crescimento do microrganismo

Conclusões

O óleo de semente de uva puro apresentou efeito inibitório frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes* pela técnica de disco difusão. Promoveu ainda inibição de *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes* nas concentrações 0,33 mg mL⁻¹ e 3,33 mg mL⁻¹ respectivamente, não

apresentando efeito bactericida para nenhuma das cepas testadas. Com base nisto, pode-se concluir que o óleo de semente de uva pode ser utilizado para controle microbiano de alimentos, entretanto novos estudos devem ser realizados para adequação das concentrações frente aos agentes antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

ARORA, D. S.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. Internation. **Journal of Antimicrobials Agents**, v. 12, p. 257-262, 1999.

BAYDAR, N. G.; ÖZKAN G.; SAGDIÇ, O. Total phenolic content and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**, v. 15, p. 335-339, 2003.

BAYDAR, N. G.; SAGDIC, O.; OZKAN, G., CETIN, S. Determination of antibacterial effects and total phenolic content of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. *Food and Science Technology*, v. 41, p. 799-804, 2005.

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

CLSI, 2015a. M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35.

CLSI, 2015b. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35.

CHINAZZO, I. R. **Influência da cultivar e do tipo de agricultura na concentração de compostos antioxidantes em óleos de semente de uva**. Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para a graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

DUARTE, M. C. T.; LEME, C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 139-143, 2006.

FREITAS, L. S. **Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química. Porto Alegre, 2007.



KARAMAN, S.; KARASU, S.; TORNUK, F.; TOKER, O. S.; GEÇGEL, U.; SAGDIC, O.; ÖZCAN, N.; GUL, O. Recovery Potential of Cold Press By-Products Obtained from Oil Industry: Pshysicochemical, Bioactive and Antimicrobial Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p 2305-2313, 2015.

MELO, P. S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais.** Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em ciências.na Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2010.

OLIVEIRA, D. A. **Caracterização fitoquímica e biológica de Extratos obtidos de bagaço de uva (vitis vinifera) Das variedades merlot e syrah.** Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos. Florianópolis/SC, 2010.

ROCKENBACH, I. I. et al. Composição de ácidos graxos de óleo de semente de uva (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.). **Braz. J. Food. Technol.** Preprint Series, n. 04, 2010.

ROCKENBACH, I. I., SILVA, G. L., RODRIGUES, E., KUSKOSKI, E. M., FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 28(Supl.): 238-244, dez. 2008.

ROTAVA, R.; ZANELLA, I.; SILVA, L. P.; MANFRON, M. P.; CERON, C. S.; ALVES, S. H.; KARKOW, A. K.; SANTOS, J. P. A. Antibacterial, antioxidante and tanning activity of grape by-product. **Ciência Rural**, v. 39, p. 941-944, 2009.