

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA – UNIPAMPA

CARIN WERKA

**EXTRATO DE VINHO TINTO INIBE CRESCIMENTO *IN VITRO* DE
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

**DOM PEDRITO
2015**

CARIN WERKA

**EXTRATO DE VINHO TINTO INIBE CRESCIMENTO *IN VITRO* DE
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Enologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Enologia.

Orientador: Fernando Zocche

**Dom Pedrito
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

W488e Werka, Carin

EXTRATO DE VINHO TINTO INIBE CRESCIMENTO *IN VITRO* DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS / Carin Werka.

23 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-- Universidade Federal do Pampa, ENOLOGIA, 2015.

"Orientação: Fernando Zocche".

1. Vinho Tinto. 2. Vinho Branco. 3. Conservante Natural. 4. Micro-organismo. 5. Indústria Alimentícia. I. Título.

CARIN WERKA

**EXTRATO DE VINHO TINTO INIBE CRESCIMENTO *IN VITRO* DE
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Enologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Enologia.

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos

Trabalho defendido e aprovado no dia quatro de dezembro de dois mil e quinze.

Banca Examinadora

Professor Doutor Fernando Zocche
Orientador
UNIPAMPA – DOM PEDRITO

Professora Doutora Caroline Costa Moraes
Membro
UNIPAMPA - BAGÉ

Professora Doutora Ana Paula Manera
Membro
UNIPAMPA - BAGÉ

RESUMO

A indústria alimentícia está em constante busca por alternativas de conservantes naturais, investigando opções que visem eliminar perigos e diminuir os riscos à saúde do consumidor. Sabe-se que o vinho possui propriedades antimicrobianas que têm sido utilizadas ao longo dos anos. Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar o potencial antibacteriano *in vitro* do extrato de vinho tinto Merlot e branco Chardonnay, frente a estirpes de bactérias dos grupos *E. coli*, oriundas de linguiças, queijos e leites, além de cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *S. warneri* e *S. lugdunensis*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis, comparando-os com antibióticos existentes no mercado. A metodologia utilizada foi de difusão em ágar perfurado, utilizando-se duas concentrações, sendo uma por solução hidroalcolica e a outra, o extrato puro. Através dos resultados obtidos, é possível afirmar que o extrato de vinho tinto inibiu significativamente as bactérias, principalmente no que se refere às Gram positivas, especialmente a *Staphylococcus*. No vinho branco não se obteve os mesmos resultados, apontando dados por vezes nulos. Quanto ao extrato puro tinto principalmente no volume de 50µL, os resultados demonstraram uma eficácia maior sobre o extrato diluído em quaisquer das concentrações e para todos os grupos de bactérias estudadas. Sugere-se que os resultados apresentados foram causados pela presença de polifenóis, que são mais abundantes no vinho tinto do que no vinho branco. Dessa forma, conclui-se que o extrato do vinho tinto pode ser utilizado como um conservante natural na indústria alimentícia, oferecendo um meio seguro ao consumidor.

Palavras Chaves: Vinho branco; Conservante natural, Micro-organismos, Indústria Alimentícia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAIS E MÉTODO	9
2.1 Cepas Microbianas Utilizadas	9
2.1.1 Bactérias GRAM Negativas	9
2.1.2 Bactérias GRAM Positivas	9
2.2 Vinho e Extrato de Vinho	10
2.2.1 Caracterização Físico Química do Vinho e do Extrato	11
2.3 Preparação do Inóculo Bacteriano	11
2.4 Difusão em Ágar	11
2.5 Análises dos Resultados	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	12
4. CONCLUSÕES	20
5. ABSTRACT	20
6. REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO

Uma das principais preocupações da indústria alimentícia relaciona-se com o desenvolvimento microbiano, visando eliminar perigos e diminuir os riscos à saúde do consumidor, bem como prevenir ou retardar o surgimento de alterações indesejáveis nos alimentos.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 20% dos alimentos produzidos são perdidos por deterioração. Embora habitualmente sejam aplicadas às medidas e normas sanitárias na produção de alimentos, perdem-se anualmente, toneladas de alimentos de boa qualidade devido ao ataque de micro-organismos como fungos e bactérias (FOSSATI, 2014.).

De acordo com Gava (2007) a relação dessa deterioração microbiana, deve-se principalmente ao fato dos alimentos terem uma grande quantidade de nutrientes e substratos metabolizáveis, reunindo por isso, condições ideais para o crescimento de micro-organismos. Nesse contexto, também se ressalta a possibilidade da presença de micro-organismos patogênicos que, mundialmente, tem grande impacto na saúde pública, causando surtos como relatam Almeida G. et al. (2013), Almeida J. et al. (2013), Fischer (2013) Almeida et al. (2014) e Giolo et al. (2014).

Cabe ainda destacar que segundo Germano & Germano (2003), somente 10% do total de surtos de origem alimentar são notificados no Brasil, devido às falhas no sistema de notificação e de fiscalização.

Dessa forma, tem havido um interesse crescente no desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos naturais, sendo uma alternativa atrativa para oferecer produtos saudáveis e seguros, mantendo inalterada a qualidade dos alimentos. Porém, ainda são necessárias pesquisas com relação a esses novos produtos, com foco na higiene e segurança de alimentos, para adequação da provável participação na conservação que possam desempenhar.

Além disso, o uso indiscriminado de antimicrobianos na saúde humana e animal tem causado aumento da resistência dos micro-organismos, surgindo preocupação pela procura de novas alternativas. Como exemplo, os

antimicrobianos de origem natural vêm sendo estudados (SOUZA, 2015; ROCHA et al, 2014; NAKADOMARI et al, 2014) como substitutos dos produtos químicos sintéticos, demonstrando ser uma alternativa eficaz e econômica ao setor.

Um dos primeiros antimicrobianos naturais a serem utilizados pelo homem foi o vinho, como relata Andrew Boorde em seu livro “A Dieta da Saúde”, de 1542, “...a água por si própria não é saudável para um inglês”. Sendo assim, o vinho era misturado à água pelo homem da idade média com o intuito de torná-la asséptica.

Nesse contexto, o vinho trata-se de uma fonte natural de ingredientes que possuem propriedades benéficas ao homem (antioxidante, antimicrobiano, incluindo potencial anticarcinogênico, anti-inflamatório, e cardiovascular protetor). Diversas pesquisas foram desenvolvidas para o estabelecimento da conexão entre esses compostos benéficos ao homem (compostos fenólicos e outros agentes antibacterianos) presentes no vinho contra distintas estirpes de bactérias causadoras de doenças (GARCÍA-LOMILLO et al., 2014; FRIEDMAN, 2014; CHO et al., 2015; GIOVINAZZO & GRIECO, 2015; NAKAMURA et al., 2015).

Essa associação se dá principalmente pelo vinho possuir em sua composição compostos fenólicos naturais, principalmente flavonóides, substâncias largamente distribuídas nas plantas que apresentam atividade biológica tais como potencial antioxidante, anti-inflamatório e antibacteriano (GUEDES, 2013).

Cabe salientar ainda, que o vinho enquadra-se nos moldes dos alimentos funcionais, aqueles que se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química.

Partindo do fato que as bactérias, de modo geral, necessitam de condições físico-químicas favoráveis ao seu crescimento e reprodução, o vinho associado à outras possíveis barreiras, pode auxiliar na inibição ou eliminação das bactérias, como explica a Teoria dos Obstáculos de Leistner (LEISTNER, 1992).

Para se determinar o potencial de um agente antibacteriano, inicialmente a atividade antimicrobiana é medida *in vitro*, além da sua concentração nos

líquidos ou tecidos corporais (*in vivo*). Esse potencial antimicrobiano de uma substância está associado à sua composição química, determinado através dos ensaios *in vitro* como, por exemplo, técnicas de difusão em ágar e diluição (macro e microdiluição).

Entretanto, muitos ensaios diferentes são empregados na investigação do poder antimicrobiológico dos compostos fenólicos, incluindo a técnica de diluição de ágar, o ensaio de difusão em disco de papel, o método de difusão em placa com perfuração, o método de difusão cilindro, a técnica de macrodiluição e a técnica de microdiluição em caldo (OSTROSKY et al., 2008).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* de extrato de vinho tinto e branco, contra diferentes estirpes de bactérias patogênicas ao homem.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Cepas Microbianas Utilizadas

2.1.1 Bactérias GRAM Negativas

Foram utilizadas estirpes de *E. coli* isoladas de campo, oriundas do comércio local de Dom Pedrito, RS, pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA – Dom Pedrito), sendo a estirpe 1, 5, 9, 12 e 13 oriundas de linguiça, 2 e 8 de queijo; 4 e 14 de leite, além de uma cepa padrão de *E. coli* ATCC 8739 (*American Type Culture Collection* 8739) e uma cepa padrão de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 (Cedida pela Universidade Federal de Pelotas).

2.1.2 Bactérias GRAM Positivas

Foram utilizadas estirpes padrão de *Staphylococcus*, tais como *S. aureus* FRI (*Food Research Institute*) 100, *S. aureus* FRI 196E, *S. aureus* FRI

326, *S. aureus* FRI 472, *S. aureus* FRIS6, *S. aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus lugdunensis*.

Também foi utilizada uma cepa padrão de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, ressaltando que a *Listeria* trata-se de um micro-organismo fastidioso.

2.2 Vinho e Extrato de Vinho

Os vinhos selecionados para o ensaio foram provenientes da região da Campanha Gaúcha, RS, elaborados na Vinícola Experimental da UNIPAMPA, sendo o tinto da cultivar Merlot e o branco da cultivar Chardonnay, ambos da safra de 2014.

O fluxo do processo para elaboração do vinho branco foi: colheita, desengace, esmagamento, sulfitação, adição de enzimas, prensagem, debourbagem, adição de leveduras, fermentação alcoólica, clarificação, passagem por barricas e engarrafamento.

O fluxo do processo para elaboração do vinho tinto foi semelhante ao branco, porém diferenciando-se após a adição de enzimas, onde o mosto não foi prensado e nem passou pela debourbagem, indo diretamente para a maceração em conjunto com a fermentação alcoólica. Somente posterior a fermentação alcoólica o bagaço foi retirado, extraindo-se assim, o máximo de compostos fenólicos com o auxílio das remontagens. Posteriormente o vinho foi clarificado e armazenado em tanques para maturação.

O extrato do vinho foi obtido de cada uma das amostras através do método direto para extrato seco (USSEGLIO-TOMASSET, 1961), onde 25 mL de vinho foram acondicionados em cadinhos e posteriormente colocados em banho-maria à 70°C durante 4 horas. Após a extração, foram preparadas diferentes concentrações (5µL, 12,5µL, 25µL, 37,5µL e 50µL) de extrato de vinho em solução hidroalcoólica 50% (v/v).

2.2.1 Caracterização Físico Química do Vinho e do Extrato

As análises físico químicas (gradação alcoólica, pH, acidez total e polifenóis totais) das amostras de vinho foram realizadas de acordo com o estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014). No extrato de vinho foram realizadas as análises de pH e polifenóis totais.

2.3 Preparação do Inóculo Bacteriano

Os micro-organismos estavam sobre refrigeração em ágar TSI (Triple Sugar Iron, Himedia®), foram então isoladas de três a quatro colônias de cada bactéria e repassada para caldo BHI (Brain Heart Infusion, Himedia®), com posterior incubação à 35°C durante 18 a 24h. Posteriormente, cada cultivo foi diluído em solução salina 0,85% até a turbidez alcançar o índice de 0,5 na escala nefelométrica de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ bactérias) e semeadas conforme recomendado por Bauer e Kirby (1966).

2.4 Difusão em Ágar

O meio de cultura utilizado para o teste de difusão em ágar foi o Mueller Hinton (Acumedia®), onde os micro-organismos foram inoculados na superfície do ágar com o auxílio de um suabe e posteriormente a placa foi perfurada com uma abertura de 9mm através de ponteiras.

Os micro-organismos foram desafiados com 50µL, de cada solução preparada a partir do extrato de vinho além do extrato puro nas quantidades de 10µL, 30µL e 50µL.

As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas para posterior medição dos halos de inibição.

Para o controle positivo, foram utilizado discos de Azitromicina 15µg para *Staphylococcus*, de Norfloxacin 10µg para *E. coli* e *Staphylococcus*, discos de Ampicilina 20µg para *Listeria monocytogenes*, e de Ceftriaxona 30µg para *Salmonella* Enteritidis.

2.5 Análises dos Resultados

Os resultados foram analisados via ANOVA pelo teste de média de Tukey a 5%. O programa utilizado para o fim foi o Statistix 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através deste estudo buscou-se demonstrar o potencial antimicrobiano *in vitro* de extrato de vinho, com inibição de bactérias patogênicas de importância em alimentos.

Os resultados dos desafios dos extratos de vinho tinto e branco frente à bactérias Gram negativas podem ser visualizados nas Tabela 1 e 2.

Tabela 1: Inibição (em milímetros) de *E. coli* por extratos de Vinho Tinto e Branco

Origem bactéria	<i>E. coli</i>	Solução Hidroalcoólica					Extrato Puro			Controle Positivo
		5µL	12,5µL	25µL	37,5µL	50µL	10µL	30µL	50µL	Norfloxacin 10µg
Linguiça	1 Tinto	11 ^D	11 ^D	14 ^C	15 ^C	14 ^C	0 ^F	10 ^D	19 ^B	35 ^A
	1 Branco	11 ^B	0 ^C	11 ^B	11 ^B	0 ^C	0 ^C	0 ^C	11 ^B	35 ^A
Queijo	2 Tinto	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	12 ^B	NR*	27 ^A
	2 Branco	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	NR*	27 ^A
Leite	4 Tinto	0 ^C	11 ^B	12 ^B	11 ^B	0 ^C	0 ^C	10 ^B	11 ^B	36 ^A
	4 Branco	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	36 ^A
Linguiça	5 Tinto	11 ^B	11 ^B	12 ^B	13 ^B	11 ^B	0 ^C	11 ^B	13 ^B	30 ^A
	5 Branco	11 ^B	10 ^B	0 ^C	10 ^B	10 ^B	0 ^C	0 ^C	0 ^C	30 ^A
Queijo	8 Tinto	0 ^D	11 ^C	11 ^C	0 ^D	0 ^D	0 ^D	0 ^D	15 ^B	36 ^A
	8 Branco	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	10 ^B	36 ^A
Linguiça	9 Tinto	0 ^E	0 ^E	10 ^D	10 ^D	12 ^{CD}	10 ^D	14 ^{BC}	16 ^B	27 ^A
	9 Branco	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	11 ^B	12 ^B	27 ^A
Linguiça	12 Tinto	0 ^F	13 ^{BC} _D	11 ^{DE}	12 ^{CD} _E	10 ^E	11 ^{DE}	14 ^{BC}	15 ^B	35 ^A
	12 Branco	0 ^C	11 ^B	0 ^C	0 ^C	0 ^C	10 ^B	11 ^B	10 ^B	35 ^A
Linguiça	13 Tinto	0 ^E	0 ^E	0 ^E	14 ^B	10 ^D	0 ^E	13 ^{BC}	11 ^{CD}	37 ^A
	13 Branco	0 ^C	0 ^C	0 ^C	11 ^B	0 ^C	0 ^C	11 ^B	10 ^B	37 ^A
Leite	14 Tinto	0 ^D	0 ^D	0 ^D	0 ^D	0 ^D	12 ^B	12 ^C	14 ^D	36 ^A

Padrão	14 Branco	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	11 ^B	36 ^A
	ATCC 8739	0 ^E	0 ^E	0 ^E	14 ^C	10 ^D	0 ^E	15 ^{BC}	17 ^B	29 ^A
	Tinto									
	ATCC 8739	0 ^C	0 ^C	0 ^C	11 ^B	0 ^C	0 ^C	10 ^B	10 ^B	29 ^A
	Branco									

NR* – não realizado; Letras maiúsculas distintas na linha implicam em diferença significativa, considerando o teste de variância ANOVA – TUKEY, ao nível de 5%.

Fonte: Autora, 2015.

Tabela 2: Inibição (em milímetros) de *Salmonella* frente aos extratos de vinho Tinto e Branco

<i>Salmonella</i>	Solução Hidroalcoólica					Extrato Puro			Controle Positivo
	5µL	12,5µL	25µL	37,5µL	50 µL	10µL	30µL	50µL	Ceftriaxona 30µg
S. Enteritidis ATCC 13076 Tinto	0 ^E	0 ^E	0 ^E	11 ^D	14 ^C	0 ^E	17 ^B	16 ^{BC}	29 ^A
S. Enteritidis ATCC 13076 Branco	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	10 ^B	0 ^C	0 ^C	0 ^C	29 ^A

Letras maiúsculas distintas na linha implicam em diferença significativa, considerando o teste de variância ANOVA – TUKEY, ao nível de 5%.

Fonte: Autora, 2015.

No extrato de vinho foi verificado um potencial antimicrobiano não significativo frente às bactérias do gênero *E. coli* quando comparadas ao controle positivo (Norfloxacin). No entanto, foi possível observar que, ainda que não significativo, o tamanho do halo de inibição chegou a 19mm com o extrato puro de vinho tinto quando a estirpe 1 de *E. coli* foi desafiada utilizando uma concentração de 50µL. Verificou-se que, quando a estirpe 1 de *E. coli* foi desafiada com a mesma concentração (50µL) de extrato puro de vinho branco chegou ao máximo de 11mm de inibição, menor do que quando desafiada com extrato de vinho tinto. Esse mesmo comportamento (halos de inibição com extrato de vinho tinto maiores do que halos de inibição com extrato de vinho branco) foi evidenciado em todas as cepas de *E. coli* testadas, inclusive na cepa padrão, assim como também evidenciado com *Salmonella* Enteritidis (Tabela 2). O comportamento das bactérias Gram negativas foi similar com os dois distintos gêneros testados, com uma significativa inibição quando o extrato de vinho tinto foi utilizado.

Observou-se que as cepas de *E. coli* 2 (queijo) e 14 (leite) não apresentaram inibição nos tratamentos da solução hidroalcoólica. Porém, há de se ressaltar que para essas cepas, assim como para a maioria das cepas testadas, a concentração de 37,5µL da solução com extrato de vinho tinto proporcionou os melhores resultados de inibição. Ressalta-se também que, quando uma mesma concentração de extrato foi utilizada, houve variação dos índices de inibição entre as cepas, o que pode ser atribuído às características individuais das estirpes testadas, dada a distinta origem de cada micro-organismo.

Ressalta-se que, ainda que a inibição das bactérias Gram negativas testadas (pelo extrato de vinho tinto) tenha sido inferior ao do controle positivo (antibiótico), pelos índices evidenciados há uma clara evidencia de restrição de crescimento no entorno do extrato de vinho tinto.

Os resultados dos desafios dos extratos de vinho tinto e branco frente à bactérias Gram positivas podem ser visualizados nas Tabela 3 e 4.

Tabela 3: Inibição (em milímetros) de *Staphylococcus* frente aos extratos de Vinho Tinto e Branco

<i>Staphylococcus</i>	Solução Hidroalcoólica					Extrato Puro			Controle Positivo	
	5µL	12,5µL	25µL	37,5µL	50µL	10µL	30µL	50µL	Azitromicina 15µg	Norfloxacina 10µg
<i>S.aureus</i> FRI 100 Tinto	11 ^F	14 ^{DEF}	16 ^D	16 ^{CD}	12 ^{EF}	12 ^{DE} _F	19 ^{BC}	21 ^B	15 ^{DE}	26 ^A
<i>S.aureus</i> FRI 100 Branco	0 ^D	0 ^D	0 ^D	0 ^D	0 ^D	0 ^D	0 ^D	12 ^C	15 ^B	26 ^A
<i>S.aureus</i> FRI 196E Tinto	11 ^E	12 ^E	17 ^C	15 ^{CD}	17 ^C	13 ^{DE}	22 ^B	25 ^A	21 ^B	26 ^A
<i>S.aureus</i> FRI 196E Branco	0 ^E	0 ^E	0 ^E	0 ^E	0 ^E	0 ^E	10 ^D	15 ^C	21 ^B	26 ^A
<i>S.aureus</i> FRI 326 Tinto	11 ^F	14 ^E	13 ^{EF}	17 ^D	18 ^{CD}	13 ^{EF}	23 ^B	24 ^B	20 ^C	28 ^A
<i>S.aureus</i> FRI 326 Branco	0 ^D	0 ^D	0 ^D	0 ^D	11 ^C	0 ^D	11 ^C	10 ^C	20 ^B	28 ^A
<i>S.aureus</i> FRI 472 Tinto	0 ^G	11 ^F	12 ^{EF}	14 ^{DE}	14 ^{DE}	15 ^D	20 ^C	20 ^C	24 ^B	32 ^A
<i>S.aureus</i> FRI 472 Branco	0 ^D	0 ^D	0 ^D	0 ^D	0 ^D	0 ^D	11 ^C	10 ^C	24 ^B	32 ^A
<i>S.aureus</i> FRI S6 Tinto	0 ^E	14 ^{CD}	13 ^D	22 ^B	15 ^{CD}	16 ^C	21 ^B	21 ^B	20 ^B	27 ^A
<i>S.aureus</i> FRI S6 Branco	0 ^D	0 ^D	0 ^D	0 ^D	0 ^D	11 ^C	10 ^C	0 ^D	20 ^B	27 ^A
<i>S.aureus</i>	0 ^E	0 ^E	10 ^D	0 ^E	12 ^{CD}	13 ^C	17 ^B	18 ^B	NR*	30 ^A

ATCC 25923										
Tinto										
<i>S.aureus</i>	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	12 ^B	11 ^B	NR*	30 ^A
ATCC 25923										
Branco										
<i>S. warneri</i>	11 ^E	12 ^{DE}	14 ^D	17 ^C	12 ^{DE}	12 ^{DE}	18 ^C	23 ^B	27 ^A	26 ^A
Tinto										
<i>S. warneri</i>	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	13 ^B	27 ^A	26 ^A
Branco										
<i>S.lugdunensis</i>	0 ^F	15 ^{CD}	15 ^{CD}	15 ^{CD}	16 ^C	12 ^E	21 ^B	23 ^B	13 ^{DE}	32 ^A
Tinto										
<i>S.lugdunensis</i>	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	0 ^C	14 ^B	13 ^B	32 ^A
Branco										

NR*- não realizado; Letras maiúsculas distintas na linha implicam em diferença significativa, considerando o teste de variância ANOVA – TUKEY, ao nível de 5%.

Fonte: Autora, 2015.

Tabela 4: Inibição (em milímetros) de *Listeria monocytogenes* frente aos extratos de Vinho Tinto e Branco

<i>Listeria</i>	Solução Hidroalcoólica					Extrato Puro			Controle Positivo
	5µL	12,5µL	25µL	37,5µL	50µL	10µL	30µL	50µL	Ampicilina 20µg
<i>L.monocytogenes</i> ATCC 13076 Tinto	0 ^D	0 ^D	0 ^D	14 ^{BC}	13 ^C	0 ^D	14 ^{BC}	16 ^B	22 ^A
<i>L.monocytogenes</i> ATCC 13076 Branco	0 ^D	0 ^D	0 ^D	12 ^B	10 ^C	0 ^D	0 ^D	12 ^B	22 ^A

Letras maiúsculas distintas na linha implicam em diferença significativa, considerando o teste de variância ANOVA – TUKEY, ao nível de 5%.

Fonte: Autora, 2015.

Observando-se os resultados de inibição de bactérias Gram positivas pelos extratos de vinho, verifica-se maior inibição da mesma cepa quando utilizado extrato de vinho tinto, num comportamento similar ao observado nas bactérias Gram negativas. Observa-se que para *Staphylococcus*, no entanto, há uma maior aproximação estatisticamente significativa dos resultados de inibição com extrato de vinho tinto em relação os dados de inibição obtidos pelos antibióticos.

Inicialmente pode-se observar que o extrato do vinho tinto inibiu mais do que o extrato do vinho branco. Considerando a aplicação do extrato puro, a inibição foi ainda mais significativa para todos os ensaios das bactérias Gram positivas. Além disso, as estirpes que apresentaram a maior fragilidade frente ao antimicrobiano natural foram as do grupo das *Staphylococcus*, quando comparada as demais testadas.

Verificou-se proporcionalidade entre os halos de inibição de *S. aureus* em relação às maiores concentrações de extrato de vinho tinto utilizados. O tamanho do halo de inibição para o gênero *Staphylococcus* variou de 18 a 25mm para o extrato puro de vinho tinto e de 10 a 15mm para o extrato puro de vinho branco, na concentração de 50 μ L de extrato puro, exceto para a cepa *S. aureus* FRI S6 que apresentou valor nulo para essa concentração. Considerou-se também que a *Staphylococcus aureus* FRI 326 apresentou ser a menos resistente ao antimicrobiano, indicando uma inibição de 25mm frente ao extrato puro na concentração de 50 μ L (Tabela 3), superior aos índices verificados para as Gram negativas testadas e para *Listeria monocytogenes*.

Neste experimento, o controle positivo com Azitromicina se mostrou por vezes inferior ao extrato do vinho tinto, destacando o potencial efeito antimicrobiano do extrato de vinho tinto. Porém, o mesmo efeito não foi observado quando utilizado o antibiótico Norfloxacin, o que também demonstra a variabilidade de resistência que os indivíduos de um mesmo gênero podem demonstrar frente a distintos antimicrobianos. Além disso, há de serem consideradas também as variações individuais das cepas de *Staphylococcus*.

Quanto a inibição pela solução hidroalcoólica de vinho branco, somente foi observado efeito na cepa *S. aureus* FRI 326, que havia demonstrado ser a estirpe mais vulnerável do gênero, quando desafiado a uma quantidade de 50 μ L, uma inibição de 11mm. Na solução hidroalcoólica de vinho tinto, os halos tiveram um efeito antimicrobiano que chegou a 18mm na mesma estirpe, *S. aureus* FRI 326.

Listeria é um micro-organismo fastidioso, ou seja, necessita de um meio definido com muitos fatores necessários para o crescimento e são classificadas como muito exigentes em termos nutricionais. Dessa forma, para as condições testadas, com os resultados evidenciados na Tabela 4, *L. monocytogenes* ATCC 13076 foi inibida em 16mm para a concentração de 50 μ L do extrato puro do vinho tinto. Na solução hidroalcoólica de vinho tinto a 37,5 μ L a inibição foi semelhante a 30 μ L do extrato puro de vinho tinto, com halo de inibição de 14mm, inibindo mais do que a concentração de 50 μ L da solução, 13 mm.

Quanto aos vinhos utilizados neste ensaio, no vinho tinto Merlot detectou-se um índice polifenólico de 44,2, ao passo que no vinho branco Chardonnay foi evidenciado um índice de polifenóis de 9.

Em relação às outras análises físico-químicas, no vinho tinto Merlot verificou-se teor alcoólico de 12,81% v/v, com pH de 3,82, acidez de 74mEq/L⁻¹ e SO₂ livre de 25,3mg/L⁻¹ e total de 116mg/L⁻¹. Observou-se os seguintes parâmetros no vinho branco Chardonnay: graduação alcoólica de 12,28% v/v, pH de 3,75, acidez em 66mEq/L⁻¹ e SO₂ livre de 19mg/L⁻¹ e total de 121mg/L⁻¹ (Tabela 5).

Tabela 5: Análises Físico-Químicas do Vinho Tinto Merlot e Branco Chardonnay e seus respectivos extratos

Análise	Vinho Tinto Merlot	Vinho Branco Chardonnay	Extrato Branco	Extrato Tinto
Álcool	12,81% v/v	12,28% v/v		
Ácidez Total	74 mEq/L ⁻¹	66 mEq/L ⁻¹		
SO ₂ Livre	25,3mg/L ⁻¹	19mg/L ⁻¹		
SO ₂ Total	116mg/L ⁻¹	121mg/L ⁻¹		
Ph	3,82	3,75	3,82	3,75
Polifenóis Totais	44,2	9	253,0	122,7

Fonte: Autora, 2015.

Os extratos passaram pelas análises de polifenóis totais através da mesma técnica aplicada aos vinhos, apresentando o extrato tinto como resultado um índice de 253,0. Já no extrato de vinho branco o índice foi de 122,7. Ainda foi realizada uma análise de pH, onde o extrato tinto apontou o valor de 3,82, e quando comparado ao extrato branco, 3,75, não demonstrou significativa diferença. Dessa maneira, muito provavelmente os resultados de inibição das bactérias patogênicas testadas sejam devidos aos compostos fenólicos presentes no vinho tinto, excluindo os outros fatores intrínsecos (pH) e extrínsecos (adição de SO₂ – anidrido sulfuroso- ao mosto) que poderiam afetar o ensaio.

Com relação ao extrato de vinho puro, evidenciou-se melhores resultados em relação a solução hidroalcoólica para todos os ensaios. Sugere-

se a possibilidade de que a água e o álcool empregados na solução terem evaporado no período de incubação, diminuindo assim o potencial antimicrobiano das concentrações.

Ressalta-se que por diversas vezes o extrato de vinho branco apresentou inibição nula, reforçando assim, o quão os compostos fenólicos podem influenciar no aspecto bactericida do vinho. Ainda, cabe ressaltar que de acordo Ribéreau-Gayon et al. (2003) um dos pontos determinantes na quantidade de compostos fenólicos no vinho, é a maturação da uva que, embora não testado neste experimento, é possível inferir na relação do estágio de maturação (mais polifenóis) com o potencial bactericida. A afirmação do potencial antimicrobiano dos compostos fenólicos é reforçada pelo trabalho de Lopes (2005) onde a autora relata que o etanol do vinho desprovido do seu conteúdo em polifenóis, apresentou uma redução estatisticamente significativa do efeito antimicrobiano.

Em estudos dirigidos por Moretro & Daeschel (2004) demonstrou-se que os compostos isolados não apresentam a mesma eficácia que o vinho em si. Lopes (2005), concluiu que o etanol, por exemplo, quando apresentado nas concentrações encontradas geralmente nos vinhos, entre 10% e 15%, apresenta um efeito antimicrobiano limitado quando comparado com o vinho.

Neste estudo pode-se observar ainda que os micro-organismos Gram positivos, *Staphylococcus* e *Listeria*, possuem uma maior pré-disposição a inibição por parte do extrato de vinho, quando comparadas aos Gram negativos, *Salmonella* e *Escherichia*. Isso pode ser explicado pela particularidade dessas bactérias, conforme explica Sartori (2005), que diz que a parede celular bacteriana dos Gram positivos é menos complexa e apresenta maior permeabilidade quando comparada às Gram negativas. Dessa forma, a membrana externa das bactérias Gram negativas apresenta-se como uma barreira a penetração de numerosas moléculas de antibióticos, e, além disso, o espaço periplasmático contém enzimas capazes de quebrar moléculas estranhas, diferentemente das Gram positivas, o que pode ter acontecido com o extrato dos vinhos.

No estudo de Bussmann et al. (2010) com 141 espécies vegetais ricas em compostos fenólicos, verificaram que os extratos etanólicos de 51 espécies

inibiram o crescimento de *E. coli*, entretanto um total de 114 extratos etanólicos inibiram o crescimento da *S. aureus*, demonstrando assim uma maior atividade sobre as bactérias Gram positivas (MIRANDA et al, 2013). Sugere-se então uma eliminação dos micro-organismos através de rompimento de membrana. Como observado nos estudos conduzidos por Mirzoeva, Grishanin & Calde (1997) que a quercetina, um flavonóide do vinho, causou um aumento na permeabilidade da membrana bacteriana interior e fez desaparecer o potencial protetor da membrana, devido a interrupção da força motriz dos prótons de bactérias *Staphylococcus*.

Porém, em estudos como os de Xu & Lee (2001), apontou-se a atividade de flavonóides, tais como a miricetina, a quercetina, a luteolina e o kaempferol em bloquear a síntese de proteínas em *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA).

Ainda, estudos mais antigos (Mori et al, 1987) sugerem que alguns flavonóides inibiram a síntese de DNA e RNA em *Staphylococcus aureus* através da inibição do DNA girase (topoisomerase), enzima essencial envolvida na replicação, transcrição e reparação do DNA bacteriano. O mecanismo de ação se baseia na ligação do flavonóide a esta subunidade de DNA girase e impede o enrolamento do DNA, evitando assim a síntese de DNA, o que também pode ter acontecido neste estudo.

Assim sendo, não há como estabelecer com precisão qual foi o mecanismo de efeito inibitório das bactérias testadas, uma vez que os constituintes do extrato do vinho não foram testados individualmente. Entretanto, pode-se afirmar que os extratos dos vinhos, principalmente o extrato do vinho tinto Merlot permitiu um interessante potencial de inibição sobre bactérias Gram positivas em estudo, sugerindo dois mecanismos de controle, através de rompimento de membrana ou impossibilidade de replicação do DNA e RNA através dos compostos fenólicos.

A partir do exposto, pode-se corroborar a premissa que o vinho é um potencial antimicrobiano, e assim sendo, sua utilização pode ser relacionada a diversas indústrias, principalmente como aditivo em alimentos, na forma de um conservante natural alimentício.

4. CONCLUSÕES

O extrato de vinho tinto puro foi mais efetivo que extrato de vinho branco na inibição de crescimento *in vitro* de *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus* e *Listeria*. Demonstrando-se os melhores resultados frente a Gram positiva *Staphylococcus*, apresentando por diversas vezes resultados superiores ao do controle positivo, o antibiótico Azitromicina.

Pode ser utilizado na indústria alimentícia como um conservante natural destinado a um produto diferenciado, visto o alto custo da produção do vinho em si.

Destaca-se ainda que são necessárias mais pesquisas na área, devido à escassez e a demanda do setor na busca por alternativas de antimicrobianos de origem natural, em substituição aos produtos químicos sintéticos utilizados atualmente.

5. ABSTRACT

EXTRACT OF RED WINE INHIBIT INCREASE *IN VITRO* PATHOGENIC BACTERIA

The food industry is in constant search for alternative natural preservatives, investigating options that aim to eliminate hazards and reduce risks to consumer health. It is known that wine has antimicrobial properties have been used over the years. Thus, this study aimed to evaluate the potential antibacterial *in vitro* of red wine extract Merlot and white Chardonnay, against strains of the bacteria *E. coli* groups, coming from sausages, cheese and milk, as well as standard strains of *Staphylococcus aureus*, *S. warneri* and *S. lugdunensis*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis, comparing them with antibiotics on the market. The methodology used was punched agar diffusion, using two concentrations, one for alcohol solution and the other, pure extract. From the results obtained it can be stated that red wine extract significantly inhibited the bacteria, particularly in respect to Gram positive bacteria, especially *Staphylococcus*. In the white wine were not obtained the same results, indicating data at times zero. As for the red pure extract mainly in the volume of 50µL. Results showed a greater efficacy of the extract in diluted concentrations and any of the groups for all the studied bacteria. It is suggested

that the results were caused by the presence of polyphenols, which are more abundant in red wine than in white wine. Thus, it is concluded that red wine extract can be used as a natural preservative in the food industry, providing a secure way to the consumer.

Keywords: White Wine, Natural Preservative; Micro-organisms; Food Industry.

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G., MAGALHÃES, R., SANTOS, I., FERREIRA, V., SILVA, J., MENDES, M. M., TEIXEIRA, P. **Reconhecimento do primeiro surto de listeriose em Portugal**, 2013.

ALMEIDA, J. C., DE PAULA, C. M. S., SVOBODA, W. K., LOPES, M. O., PILONETTO, M. P., ABRAHÃO, W. M., GOMES, E. C. Perfil epidemiológico de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, 34(1), 97-106, 2013.

ALMEIDA, I. A. Z. C., PERESI, J. T. M., ALVES, E. C., MARQUES, D. F., TEIXEIRA, I. S. C., SILVA, S. I. L., PEDRO, N. F. *Salmonella Alachua*: agente causal de surto de doença transmitida por alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 73(1), 1-1, 2014.

BAUER, A. W.; KIRBY, E. M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single Disk method. **Am. J. Clin. Path.**, 45(4), 493-496, 1966.

BOORDE, A. A dietary of health (1542). **EETS, Extra Series**, 10, 1870.

BRASIL, MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Laboratório**. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/laboratorios>> Acesso em 12/11/2015.

BUSSMANN, R. W., MALCA-GARCÍA, G., GLENN, A., SHARON, D., CHAIT, G., DÍAZ, D., BENITO, M. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of ethnopharmacology**, 132(1), 101-108, 2010.

CHO, H. S., LEE, J. H., CHO, M. H., LEE, J. Red wines and flavonoids diminish *Staphylococcus aureus* virulence with anti-biofilm and anti-hemolytic activities. **Biofouling**, 31(1), 1-11, 2015.

FISCHER, M. M. **Contaminação microbiológica de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridas no Estado do Rio Grande do Sul entre 2004 e 2012**, 2013.

FOSSATI, A. A. N. **Influência de aditivos alimentares sobre as Características físico-químicas, sensoriais e Microbiológicas do camarão *Xiphopenaeus kroyeri***, 2014.

FRIEDMAN, M. Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content. **Journal of agricultural and food chemistry**, 62 (26) 6025-6042, 2014.

GARCÍA-LOMILLO, J., GONZÁLEZ-SAN JOSÉ, M. L., DEL PINO-GARCÍA, R., RIVERO-PÉREZ, M. D., MUÑIZ-RODRÍGUEZ, P. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Wine Byproducts and Their Potential Uses in the Food Industry. **Journal of agricultural and food chemistry**, 62(52), 12595-12602, 2014.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. Editora Nobel, São Paulo, 2007.

GERMANO P. M. L. & GERMANO M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela; 2003

GIOVINAZZO, G., & GRIECO, F. (2015). Functional Properties of Grape and Wine Polyphenols. **Plant Foods for Human Nutrition**, 1-9, 2015.

GIOLO, N. L., TEIXEIRA, I. S. C., SILVA, S. I. L., GONÇALVES, M. G., DE ALMEIDA, I. A. Z. C., PERESI, J. T. M. *Staphylococcus aureus* como agente causal de surtos de doenças transmitidas por alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 73(1), 6-1, 2014.

GROVE D. C., RANDALL W. A. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual (**Antibiotics monographs, 02**). New York: Medical Encyclopedia Inc., 1955.

GUEDES, J. R. O. **Efeitos sobre a saúde do consumo moderado de vinho tinto**. Dissertação, Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2013.

LAJOLO, F.M. Functional foods: Latin American Perspectives. **Br. J. Nut**, 88(2), 145-150, 2002.

LÁZARO, N. S., REIS E. M. F., PEREIRA, C. S., RODRIGUES, D. P. Gênero *Salmonella*: Características Epidemiológicas e Laboratoriais. **Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ –LRNCEB/LABENT**, 2008.

LEISTNER, L. Food preservation by combined methods. **Food Research International**, Oxford, 25 (2), 151-158, 1992.

LOPES, M. P. M. **Efeito de bebidas alcoólicas no crescimento in vitro de *Helicobacter pylori***. Dissertação, Universidade do Porto. Porto, 2005.

LUCILE TIEMI, A. B. E., DA MOTA, R. V., LAJOLO, F. M., GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. Technol. Aliment**, 27(2), 394-400, 2007.

MIRANDA, G. S., SANTANA, G. S., MACHADO, B. B., COELHO, F. P., CARVALHO, C. A. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 15(1), 104-111, 2013.

MIRZOEVA, O. K., GRISHANIN, R. N., CLADER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiol Res**, 1997.

MORETRO, T. DAESCHEL, M. A. Wine is Bactericidal to Foodborne Pathogens. **Journal of Food Science**, 69, 251–257, 2004.

MORI, A., NISHINO, C., ENOKI, N., TAWATA, S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Potenus vulgaris* *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**, 26, 2231 - 2234, 1987.

NAKADOMARI, G. H., VIGNOTO, V. K. C., BARBOSA, M. J. B., CARDOZO, R. M., WOSIACKI, G., & WOSIACKI, S. R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos benzênicos de plantas medicinais frente às cepas padrão de

Staphylococcus aureus e *Escherichia coli*. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, 1(2), 74, 2014.

NAKAMURA K., ISHIYAMA K., SHENG H., IKAI H., KANNO T., NIWANO Y. Bactericidal Activity and Mechanism of Photoirradiated Polyphenols against Gram-Positive and -Negative Bacteria. **J Agric Food Chem**, 63(35), 7707-7713, 2015.

OSTROSKY, E. A., MIZUMOTO, M. K., LIMA, M. E., KANEKO, T. M., NISHIKAWA, S. O., FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev bras farmacogn**, 18(2), 301-307, 2008.

RIBÉREAU-GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., DUBOURDIEU, D. Compuestos fenólicos. **Tratado de enología**, 2, 177-257, 2003.

ROCHA, T. J. M., FREITAS, R. C., AZEVEDO, R. R. D. S., SOUZA, L. I. O., SANTOS, A. F. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante das espécies *Plectranthus amboinicus* (Lour.) e *Mentha x villosa* (Huds.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 35(1), 113-118, 2014.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de fração de compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae)**. Dissertação, Universidade do Vale do Itajai, Santa Catarina, 2005.

SOUZA, A. A. **Análise química e potencial antimicrobiano de óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica na conservação de carne moída**, Repositório Ufla, 2015.

USSEGLIO-TOMASSET, L. Osservazione sull'estrato dei most e dei vini. **Riv Vitic Enol, Conegliano**, 8, 267-273, 1961.

XU, H. X. & LEE, S. F. Activity of Plant Flavonoids Against Antibiotic – Resistant Bacteria. **Phytotherapy Research**, 15, 39 – 43, 2001.