



**VANESSA APARECIDA PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS  
PROVENIENTES DE SUBPRODUTOS DA OLIVICULTURA SOBRE BACTÉRIAS  
CONTAMINANTES DE ALIMENTOS.**

**LAVRAS - MG**

**2019**

**VANESSA APARECIDA PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS  
PROVENIENTES DE SUBPRODUTOS DA OLIVICULTURA SOBRE BACTÉRIAS  
CONTAMINANTES DE ALIMENTOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentada à Universidade  
Federal de Lavras, como parte das  
exigências do Curso de Nutrição,  
para a obtenção do título de  
Bacharel.

Dr. Disney Ribeiro Dias - Dep. de Ciências dos alimentos – UFLA

Orientador

Dr. Sabrina Carvalho Bastos Dep. de Nutrição – UFLA

Luara Aparecida Simões Dep. de Biologia – UFLA

Coorientadora (s)

**LAVRAS - MG**

**2019**

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço à Deus por iluminar o meu caminho durante esta caminhada, me abençoando e me concedendo forças para enfrentar os desafios, graças a ELE eu cheguei até aqui!

Aos meus pais Maria Aparecida e Devair pelo amor, apoio, incentivo, orações e por nunca ter medido esforços em me ajudar, sem vocês eu não teria conseguido! Aos meus irmãos Alan e Alex pelo carinho, amizade e apoio. Eu amo muito todos vocês!

Ao meu namorado Ewerton, pelo amor, companheirismo, amizade, apoio, paciência e incentivo. Obrigada por acreditar nos meus sonhos, e por sempre me ajudar. Você é muito especial para mim! Amo você!

Ao meu orientador Professor Dr. Disney Ribeiro Dias, pela oportunidade, orientação, paciência, dedicação e disposição em me ajudar sempre.

Às minhas coorientadoras, Luara e Sabrina, pela amizade, atenção, paciência, confiança e orientação.

À Amanda membro da banca pela atenção, dedicação e amizade.

Aos professores do Departamento de Nutrição (DNU) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela amizade e por compartilhar seus conhecimentos contribuindo para a minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

Enfim, à todos que contribuíram para essa conquista.

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1 Local de coleta e amostragem</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2 Preparação dos extratos</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2.1 Extrato aquoso</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2.2 Extrato etanólico</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3 Microrganismos testados</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3.1 Atividade antimicrobiana</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4 Concentração Mínima Bactericida (CMB)</b> .....	<b>10</b>
<b>2.5 Análises estatísticas</b> .....	<b>11</b>
<b>3.RESULTADOS</b> .....	<b>11</b>
<b>4.DISSCUSSÕES</b> .....	<b>17</b>
<b>5.CONCLUSÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>6.REFERÊNCIAS</b> .....	<b>19</b>

## RESUMO

As oliveiras são nativas dos países do Mediterrâneo, sendo essa região a maior produtora de oliveira, portanto devido a sua importância a cultura se espalhou por várias regiões. Os subprodutos mais abundantes da olivicultura são as folhas de oliveira e resíduos da extração do azeite, existindo vários relatos que estes subprodutos possuem atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de microrganismos, podendo assim, substituir os conservantes químicos que contêm propriedades tóxicas e carcinogênicas. O objetivo desse trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana de extratos derivados de folhas de oliveira (*Olea europaea*) e de resíduos da extração de azeite de oliva, ambos das variedades Ascolano e Grappolo sobre bactérias contaminantes de alimentos. As folhas de oliveira foram colhidas aleatoriamente de galhos de oliveira retirados para fazer mudas, nativas da cidade de Maria da Fé, Minas Gerais, Brasil. Foram utilizados extratos aquosos e etanólicos. A atividade antimicrobiana dos extratos obtidos foi avaliada contra bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Staphylococcus aureus* ATCC 8702 e *Bacillus cereus* ATCC 14579) e bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* EPEC055 e *Salmonella Enteritidis* 13076). A porcentagem de inibição de todas as bactérias analisadas, variou de acordo com as concentrações, sendo maior na concentração de 50% para todos os extratos. Os extratos etanólicos apresentaram maior inibição quando comparados aos extratos aquosos, sendo as bactérias gram-positivas mais sensíveis aos extratos do que bactérias gram-negativas. Em relação a concentração mínima bactericida (CMB), o extrato EE2, apresentou concentração mínima bactericida (CMB) de 50% para os microrganismos *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Esses resultados evidenciaram o uso potencial de extratos de folha de oliveira e de resíduos da extração de azeite de oliva como antimicrobianos naturais contra alguns microrganismos que causam doenças transmitidas por alimentos, sendo uma alternativa econômica sustentável e acessível para tratamento antimicrobiano, podendo substituir conservantes químicos, exigindo que estudos sejam realizados para que estes extratos possam ser aplicados como conservantes naturais em alimentos.

**Palavras-chave:** Olivicultura. Atividade antimicrobianas. Subprodutos.

## ABSTRACT

The olive trees are native to the Mediterranean countries, and this region is the largest producer of olive trees, therefore due to its importance the culture has spread to several regions. The most abundant by-products of olive cultivation are olive leaves and residues from the extraction of olive oil, there are several reports that these byproducts have antimicrobial activity against a wide range of microorganisms and can thus replace chemical preservatives that contain toxic and carcinogenic properties. The objective of this work was to investigate the antimicrobial activity of extracts derived from olive leaves (*Olea europaea*) and residues from the extraction of olive oil, both of the Ascolano and Grappolo varieties on food contaminating bacteria. The olive leaves were harvested at random from olive branches removed to make seedlings, native from Maria da Fé, Minas Gerais, Brazil. Aqueous and ethanoic extracts were tested. The antimicrobial activity of extracts obtained was evaluated against Gram-positive bacteria (*Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Staphylococcus aureus* ATCC 8702 and *Bacillus cereus* ATCC 14579) and Gram-negative bacteria (*Escherichi coli* EPEC055 and *Salmonella Enteritidis* 13076). The percentage of inhibition of all the bacteria analyzed varied according to the concentrations, being higher in the concentration of 50% for all the extracts. The ethanolic extracts presented greater inhibition when compared to the aqueous extracts, being the gram-positive bacteria more sensitive to the extracts than gram-negative bacteria. In relation to the minimum bactericidal concentration (CMB), the ethanolic extract had a minimum bactericidal concentration (CMB) of 50% for microorganisms *Bacillus cereus*, *Escherichi coli* e *Staphylococcus aureus*. These results evidenced the potential use of olive leaf extracts and residues from the extraction of olive oil as natural antimicrobials against some microorganisms which cause food-borne diseases, being a sustainable and affordable economic alternative for antimicrobial treatment, being able to substitute chemical preservatives, requiring studies to be performed so that these extracts can be applied as natural preservatives in food.

**Keywords:** Oliviculture. Antimicrobial activity. By-products.

## 1. INTRODUÇÃO

As oliveiras, *Olea europaea L.*, pertence à família botânica *Oleaceae*, são nativas dos países do Mediterrâneo, portanto, essa região é a maior produtora de azeitona e de azeite de oliva, sendo responsável por 98% da área total de produção de oliveira mundial. Tem-se que os produtos da oliveira são ricos em substâncias importantes do ponto de vista nutricional (EL & KARAKAYA, 2009), uma vez que possuem propriedades antioxidantes e antimicrobianas atribuídas aos seus compostos fenólicos, particularmente o hidroxitirosol e a oleuropeína (MEDEIROS et al., 2016). Considerando a importância da oliveira, aumentou-se a necessidade de expansão das áreas de plantio pelo mundo, no Brasil as entidades governamentais incentivaram o cultivo devido ao aumento da demanda da oliveira e seus produtos, para o mercado brasileiro (TERAMOTO et al., 2010).

Na produção de azeite, são gerados subprodutos, como o bagaço, o caroço da azeitona e folhas, e o uso de ambos pode ser o foco para a valorização sustentável de novos produtos (ROMERO-GARCIA et al., 2014). Um dos subprodutos mais abundantes da olivicultura são as folhas de oliveira, estas apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antiviral, portanto podem ser consideradas uma matéria-prima de baixo custo fonte natural de antioxidantes (ABAZA et al., 2011). Além das folhas, tem-se os resíduos do processamento de azeitonas para extração do azeite, que possuem compostos fenólicos, como o hidroxitirosol, oleuropeína, tirosol, ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido vanílico, ácido elenólico, catecol e rutina, sendo interessante do ponto de vista econômico e ambiental, por prevenir a deterioração de alimentos, devido a atividade antimicrobiana e antioxidante, podendo ser tratados ou reaproveitados para prevenir danos ambientais oriundos de seu mau direcionamento (MEDEIROS, 2016).

Um grave problema de saúde pública são as doenças transmitidas por alimentos (DTA) causadas por microrganismos, os quais penetram no organismo humano através da ingestão de água e alimentos contaminados, sendo os sintomas mais comuns dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e febre (WELKER et al., 2009). Dentre os principais patógenos que apresentam risco alimentar encontraram-se as bactérias *Salmonella ssp* e *Escherichia coli*, sendo as responsáveis, juntamente com o *Staphylococcus aureus*, pelos maiores números de contaminações no Brasil, entre os anos de 2000 e 2017 (BRASIL, 2018). Devido ao aumento da resistência de microrganismos patogênicos as inúmeras drogas e a susceptibilidade de atuarem

sobre vários tipos de substratos, surge a preocupação para a procura de novas alternativas, o que incentiva a procura por antibióticos naturais.

Os subprodutos da olivicultura, sendo compostos naturais, podem surgir como uma alternativa na obtenção de antimicrobianos, resultando na substituição de conservantes químicos, os quais podem conter propriedades tóxicas e carcinogênicas (GUTIERREZ et al., 2008).

Diante do exposto, objetiva-se no presente trabalho investigar a atividade antimicrobiana de extratos derivados de folhas de oliveira (*Olea europaea*) e de resíduos da extração de azeite de oliva sobre bactérias contaminantes de alimentos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Local de coleta e amostragem**

O resíduo de extração de azeite e as folhas de oliveira utilizadas para a fabricação dos extratos foram coletados em março de 2017, ambos gentilmente cedidos pela Fazenda Experimental da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) em Maria da Fé, Minas Gerais, Brasil.

As folhas de oliveira foram colhidas aleatoriamente de galhos de oliveira retirados para fazer mudas, sendo das variedades Ascolano e Grapollo. Aproximadamente 1 kg de resíduos da extração de azeite foram coletados.

Todos os materiais foram coletados em sacos plásticos estéreis e levados sobre refrigeração para o Laboratório de Microbiologia das Fermentações, no setor de Microbiologia, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Brasil, para a fabricação dos extratos.

### **2.2 Preparação dos extratos**

Foram utilizados dois métodos de extração, sendo um deles em água e o outro em etanol 92,5%, resultando em extratos aquosos e etanólico. Para os métodos de extração foram preparados 6 diferentes extratos:

EA1: Extrato aquoso de folhas de oliveira da variedade Ascolano;

EA2: Extrato aquoso de folhas de oliveira da variedade Grapollo;

EA3: Extrato aquoso do resíduo da extração de azeite de oliva;

EE1: Extrato etanólico de folhas de oliveira da variedade Ascolano;

EE2: Extrato etanólico de folhas de oliveira da variedade Grapollo;

EE3: Extrato etanólico do resíduo da extração de azeite de oliva.

### **2.2.1 Extrato aquoso**

Utilizou-se a metodologia descrita por Al-Attar, Abu Zeid (2013) com algumas modificações. As folhas de oliveira foram lavadas com água desionizada e secas a 37 ° C durante 3 dias. Já o resíduo da produção de azeite de oliva, foi diretamente colocado em estufa para a secagem. Em seguida, as folhas e o resíduo secos foram trituradas em um liquidificador convencional, a fim de diminuir o tamanho de partícula para 90-150 µm.

As folhas de oliveira e o resíduo da produção de azeite de oliva secos (50 g) foram adicionados a 2 L de água quente. Após 3 h, a mistura foi fervida lentamente durante 30 min. Após o período de ebulição, a mistura foi arrefecida à temperatura ambiente e foi submetida a um misturador elétrico durante 20 min.

Posteriormente, as soluções foram filtradas e o filtrado foi evaporado em evaporador rotativo a 40 ° C para produzir resíduos secos (princípios ativos).

Após a obtenção do resíduos secos, estes foram ressuspensos em 10 ml de água estéril e armazenados em temperatura de refrigeração para serem utilizados ao longo do experimento.

### **2.2.2 Extrato etanólico**

Os extratos foram obtidos pela metodologia proposta por Ling, et al. (2009) com algumas modificações. As folhas de oliveira e o resíduo da produção de azeite de oliva secos (50 g) pulverizados foram adicionados de 300 ml de etanol 92,5%. Após 24 h de tempo de extração, os extratos foram filtrados e centrifugados durante 5 min a 5000 rpm. Em seguida, o solvente de extração foi removido usando evaporador rotativo a 38 ° C com rotação de 120 rpm sob vácuo. Os extrato foram mantidos em temperatura de refrigeração para serem utilizados ao longo do experimento.

## **2.3 Microrganismos testados**

Foram utilizados as seguintes bactérias: Gram-positivas (*Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Staphylococcus aureus* ATCC 8702 e *Bacillus cereus* ATCC 14579) e bactérias Gram-

negativas (*Escherichia coli* EPEC055 e *Salmonella enterites* ATCC 564). Os inóculos foram padronizados à  $10^8$  UFC/mL, com o auxílio de uma curva de crescimento, acompanhando-se a absorvância em espectrofotômetro (D.O. 600nm), e a contagem em placa utilizando-se agar BHI (Brain heart infusion). As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas.

Os inóculos foram, estocados em freezer a -70°C, e descongeladas no momento do uso à temperatura ambiente ao longo do experimento.

### **2.3.1 Atividade antimicrobiana**

Para a determinação da porcentagem de inibição utilizou-se o protocolo estabelecido pelo CLSI (2005) com algumas adaptações, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo (microplacas de 96 poços estéreis). O meio de cultura utilizado foi o caldo BHI (Brain heart infusion).

A cada poço foram adicionados 100 µl de caldo BHI. No primeiro poço de cada coluna das microplacas também foi adicionado um volume de 100µL do respectivo extrato a ser analisado, obtendo-se a concentração inicial de cada extrato (50%). A partir dos poços iniciais, diluições seriadas foram realizadas nos demais poços, obtendo-se concentrações decrescentes de 50%, 25%, 12,5%; 6,25%, 3,12%, 1,56% 0,78%, 0,39% (v/v). Alíquotas de 10 µL de cada suspensão bacteriana foram inoculadas nos poços contendo o caldo BHI e a respectiva concentração dos extratos. As microplacas foram seladas e incubadas em estufa B.O.D., a 37°C, por 24 horas.

Após 24 horas de incubação, os resultados foram avaliados nas microplacas. O valor da porcentagem de inibição foi determinado com o auxílio de um anteparo luminoso, como a menor diluição dos extratos capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano visível a olho nu.

### **2.4 Concentração Mínima Bactericida (CMB)**

Após o período de incubação das microplacas e determinação da porcentagem de inibição foi realizado o plaqueamento de três alíquotas de 10 µL das culturas dos poços em que não houve turvação. Utilizou-se a técnica de microgotas com plaqueamento em ágar BHI, as placas foram incubadas a 37°C/24h. Após incubação, foi determinada a CMB dos extratos, como sendo sua menor concentração capaz de promover a ausência de crescimento das bactérias testadas em placa (BONA et al., 2014).

O experimento foi realizado em triplicata e três repetições utilizando um controle negativo para cada extrato testado, contendo 100 µL de BHI acrescido de 100 µL de extrato.

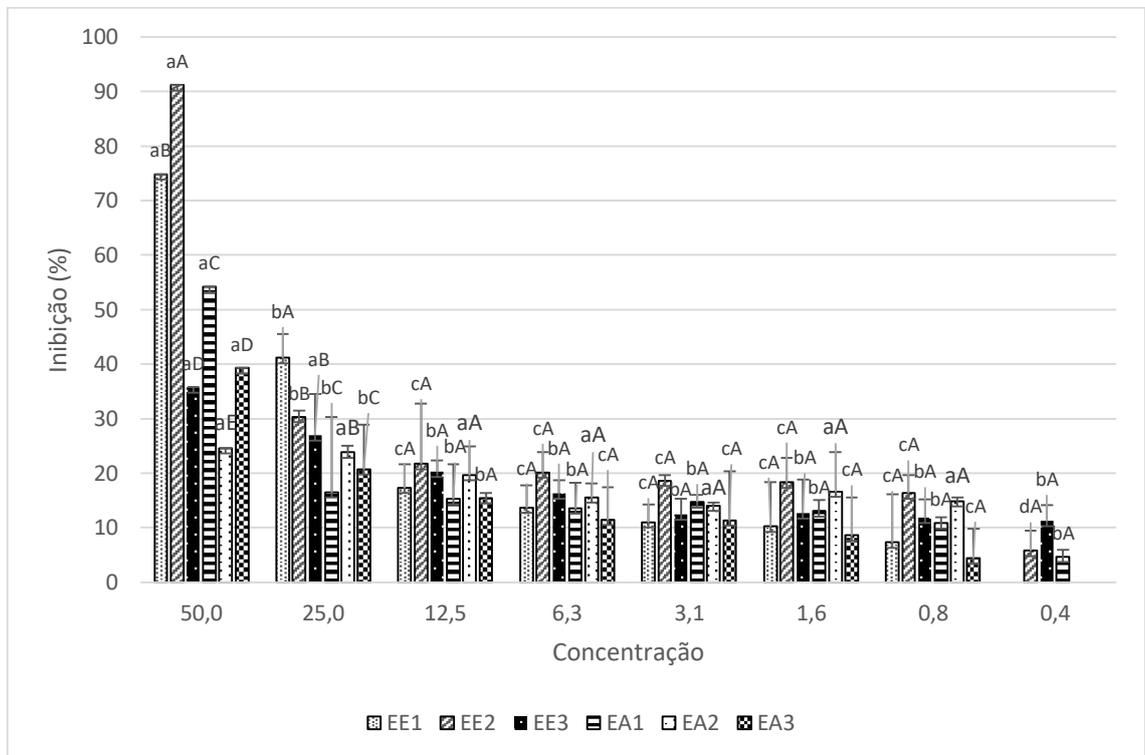
## **2.5 Análises estatísticas**

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo a comparação entre as médias estabelecidas pelo teste de Scott-Knott, adotando um nível de 5% de significância, utilizando o programa SISVAR 5.1.

## **3.RESULTADOS**

Os resultados dos gráficos evidenciaram a atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólicos contra bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Staphylococcus aureus* ATCC 8702 e *Bacillus cereus* ATCC 14579) e bactérias Gram-negativas (*Escherichi coli* EPEC055 e *Salmonella Enteritidis* 13076).

**Figura 1-** Porcentagem de inibição de extratos derivados de folhas de oliveira e de resíduos da extração de azeite de oliva sobre *Listeria monocytogenes*.

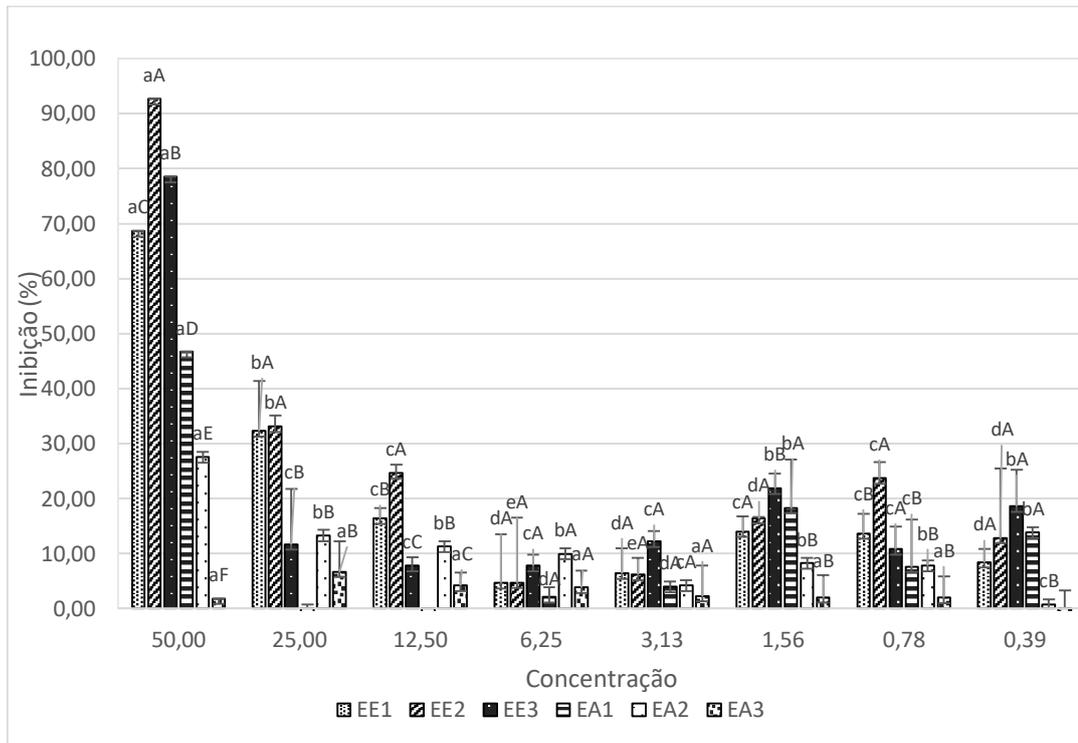


Valores apresentados foram determinados em triplicata;  $\pm$  indica desvios padrão da média. Valores médios seguidos de letras diferentes, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Scott-Knott. EE1: Extrato etanólico de folhas de oliveira da variedade Ascolano; EE2: Extrato etanólico de folhas de oliveira da variedade Grapollo; EE3: Extrato etanólico do resíduo da extração de azeite de oliva EA1: Extrato aquoso de folhas de oliveira da variedade Ascolano; EA2: Extrato aquoso de folhas de oliveira da variedade Grapollo; EA3: Extrato aquoso do resíduo da extração de azeite de oliva.

Fonte: Do autor (2019).

Os extratos etanólicos apresentaram maior inibição quando comparados aos extratos aquosos, sendo as bactérias gram-positivas mais sensíveis aos extratos do que bactérias gram-negativas. O extrato EE2, foi o mais eficaz contra a bactéria *Listeria monocytogenes*, abrangendo uma média de inibição de  $91,98 \pm 1,10$  na concentração de 50%, se diferindo estatisticamente das demais ( $p < 0,05$ ). Entre as concentrações 12,5% e 0,8% de todos os extratos analisados, não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de inibição (figura 1). Em relação às bactérias Gram-positivas, a *Listeria monocytogenes* foi a bactéria mais susceptível à atividade antimicrobiana, em relação à todos os extratos analisados (figura 1).

**Figura 2-** Porcentagem de inibição de extratos derivados de folhas de oliveira e de resíduos da extração de azeite de oliva sobre *Bacillus cereus*.



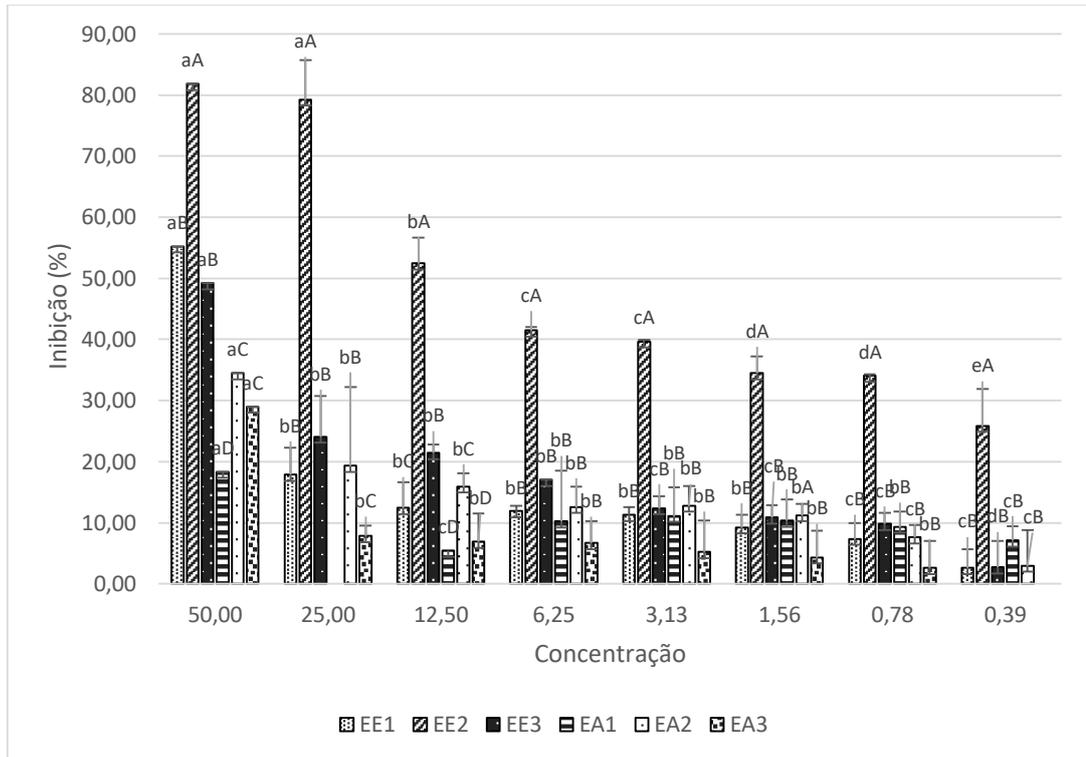
Valores apresentados foram determinados em triplicata;  $\pm$  indica desvios padrão da média. Valores médios seguidos de letras diferentes, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Scott-Knott. EE1: Extrato etanólico de folhas de oliveira da variedade Ascolano; EE2: Extrato etanólico de folhas de oliveira da variedade Grapollo; EE3: Extrato etanólico do resíduo da extração de azeite de oliva EA1: Extrato aquoso de folhas de oliveira da variedade Ascolano; EA2: Extrato aquoso de folhas de oliveira da variedade Grapollo; EA3: Extrato aquoso do resíduo da extração de azeite de oliva.

Fonte: Do autor (2019).

A ação antimicrobiana dos extratos foi maior com o aumento das concentrações testadas, para todas as bactérias analisadas, atingindo o valor máximo de  $92,24 \pm 2,02$  para o extrato EE2, na concentração de 50% (figura 2).

Comparativamente aos demais extratos, dois mostraram maior porcentagem de inibição contra a bactéria *Bacillus cereus*, sendo eles o extrato EE2  $92,64 \pm 2,02$  e EE3  $78,53 \pm 10,10$ , na concentração 50%, se diferindo estatisticamente entre si e entre os demais ( $p < 0,05$ ). Entretanto, o extrato que apresentou os menores valores de inibição foi o EA3, com médias variando de  $6,72 \pm 2,83$  à  $1,83 \pm 5,48$  respectivamente (figura 2).

**Figura 3** - Porcentagem de inibição de extratos derivados de folhas de oliveira e de resíduos da extração de azeite de oliva sobre *Salmonella Enteritidis*.

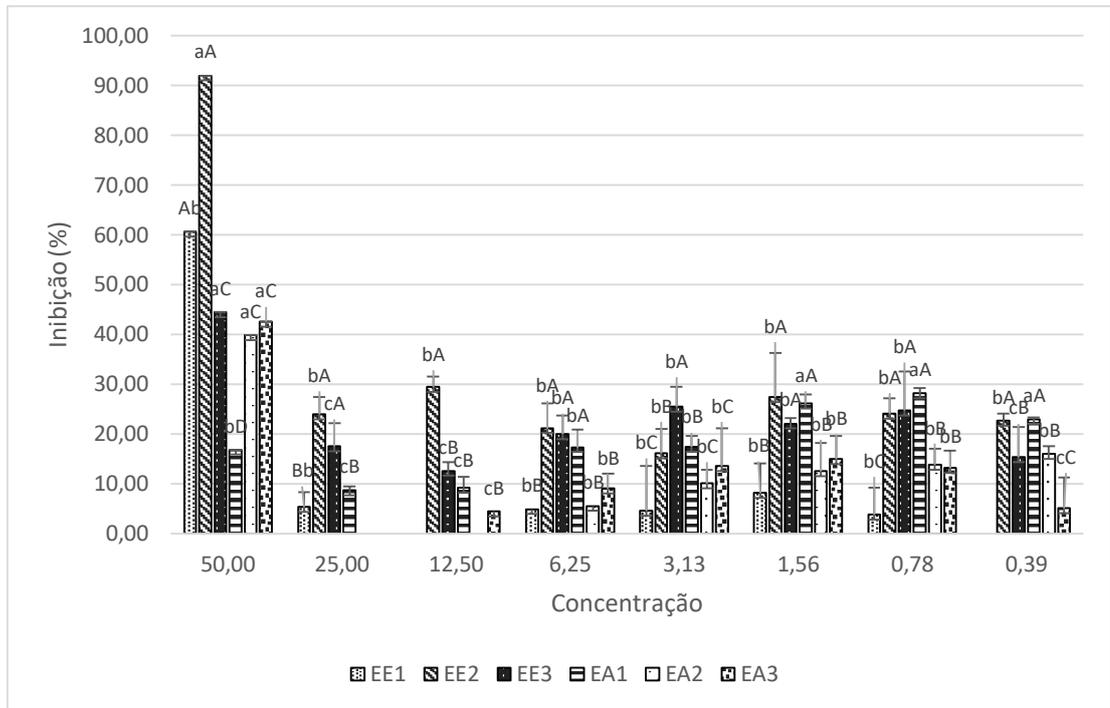


Valores apresentados foram determinados em triplicata;  $\pm$  indica desvios padrão da média. Valores médios seguidos de letras diferentes, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Scott-Knott. EE1: Extrato etanólico de folhas de oliveira da variedade Ascolano; EE2: Extrato etanólico de folhas de oliveira da variedade Grapollo; EE3: Extrato etanólico do resíduo da extração de azeite de oliva EA1: Extrato aquoso de folhas de oliveira da variedade Ascolano; EA2: Extrato aquoso de folhas de oliveira da variedade Grapollo; EA3: Extrato aquoso do resíduo da extração de azeite de oliva.

Fonte: Do autor (2019).

Destacamos a ação do extrato EE2 sobre a bactéria *Salmonella enterites*, apresentando maior inibição frente à todos os extratos, e em todas as concentrações analisadas, assumindo uma média de  $81,80 \pm 6,40$  na concentração de 50% com ação antimicrobiana significativamente superior aos demais extratos ( $p < 0,05$ ). Os extratos EE1 e EE3 também apresentaram relevante atividade antimicrobiana com médias de inibição de  $55,22 \pm 4,37$  e  $49,20 \pm 6,61$  respectivamente na concentração 50%, entretanto nas menores concentrações não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de inibição desses extratos quando comparados aos extratos EA1, EA2 e EA3 (figura 3).

**Figura 4** - Porcentagem de inibição de extratos derivados de folhas de oliveira e de resíduos da extração de azeite de oliva sobre *Staphylococcus aureus*.

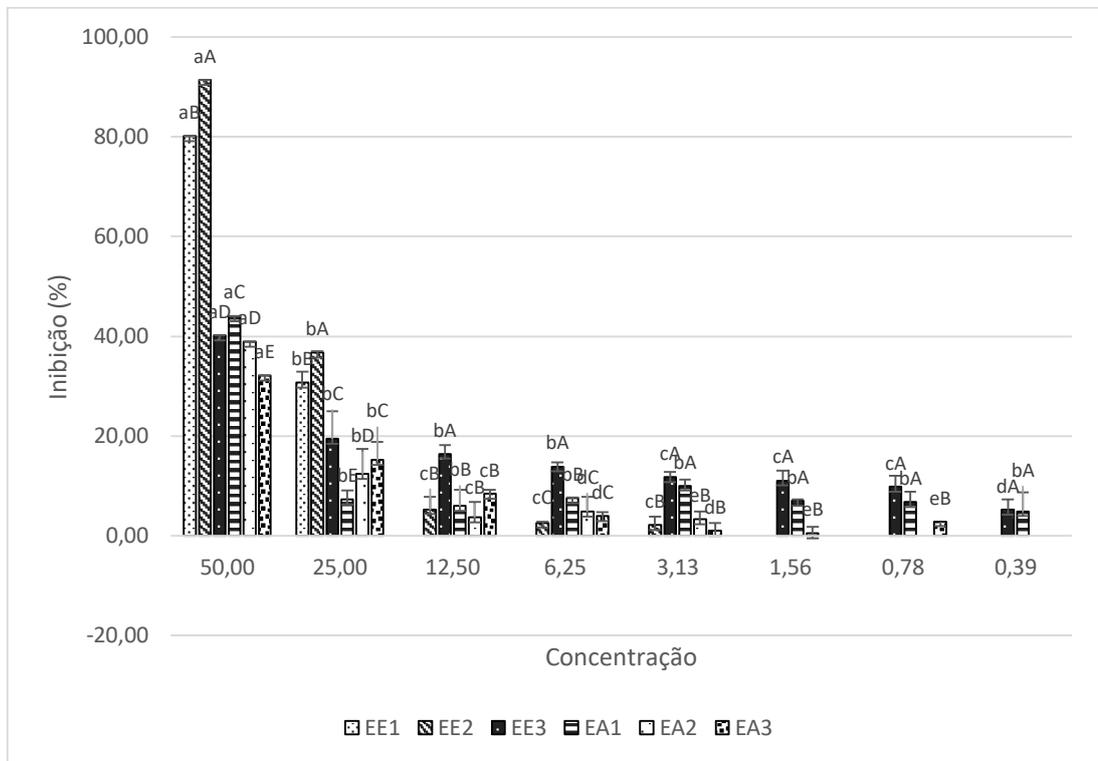


Valores apresentados foram determinados em triplicata;  $\pm$  indica desvios padrão da média. Valores médios seguidos de letras diferentes, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Scott-Knott. EE1: Extrato etanólico de folhas de oliveira da variedade Ascolano; EE2: Extrato etanólico de folhas de oliveira da variedade Grapollo; EE3: Extrato etanólico do resíduo da extração de azeite de oliva EA1: Extrato aquoso de folhas de oliveira da variedade Ascolano; EA2: Extrato aquoso de folhas de oliveira da variedade Grapollo; EA3: Extrato aquoso do resíduo da extração de azeite de oliva.

Fonte: Do autor (2019).

Pode-se observar que o extrato EE2 apresentou maior atividade antimicrobiana nas maiores concentrações, com média de  $(91,95 \pm 3,50)$  na concentração 50% que se difere estatisticamente das demais ( $p < 0,05$ ). Entretanto, o extrato EE1 comparado aos demais, apresentou os menores percentuais de inibição conforme diminuiu sua respectiva concentração, com média de  $(3,77 \pm 3,29)$  na concentração 0,78% (figura 4).

**Figura 5** - Porcentagem de inibição de extratos derivados de folhas de oliveira e de resíduos da extração de azeite de oliva sobre *Escherichia coli*.



Valores apresentados foram determinados em triplicata;  $\pm$  indica desvios padrão da média. Valores médios seguidos de letras diferentes, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Scott-Knott. EE1: Extrato etanólico de folhas de oliveira da variedade Ascolano; EE2: Extrato etanólico de folhas de oliveira da variedade Grapollo; EE3: Extrato etanólico do resíduo da extração de azeite de oliva EA1: Extrato aquoso de folhas de oliveira da variedade Ascolano; EA2: Extrato aquoso de folhas de oliveira da variedade Grapollo; EA3: Extrato aquoso do resíduo da extração de azeite de oliva.

Fonte: Do autor (2019).

O extrato EE2, foi o mais eficiente na inibição da bactéria *E.coli*, na concentração 50% abrangendo uma média de inibição de  $(91,43 \pm 0,35)$ , que se difere estatisticamente das demais ( $p < 0,05$ ). Entretanto, o extrato EE3, foi o que apresentou maior inibição nas menores concentrações. A porcentagem de inibição dos extratos EE1, EE2, EA2 e EA3 foram muito baixas conforme diminuiu-se suas respectivas concentrações, portanto a bactéria *Escherichia coli* (gram-negativa), foi a bactéria mais resistente, com menor porcentagem de inibição para a maioria dos extratos, quando comparada as demais bactérias (figura 5). De acordo com os resultados desse estudo, o extrato EE2 foi o mais eficiente na inibição do crescimento de todas as bactérias testadas, quando comparado aos outros extratos, sendo portanto, o extrato com maior potencial de atividade antimicrobiana.

Tabela 1. Concentração mínima bactericida (CMB).

EXTRATO	MICROORGANISMOS									
	<i>B. cereus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. enteritidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Aq.	Et.	Aq.	Et.	Aq.	Et.	Aq.	Et.	Aq.	Et.
Ascolano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grappolo	-	50%	-	-	-	-	-	50%	-	50%
Resíduo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Do autor (2019).

Na tabela 1, observa-se que o extrato etanólico Grapollo (EE2), apresentou CMB de 50% para os microrganismos *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo a atividade bactericida não observada para os demais microrganismos.

#### 4. DISCUSSÕES

Maior atividade antimicrobiana foi obtida na presença de maiores concentrações o extrato etanólico das folhas de duas variedades de oliveira (Arbosana e Koroneiki), sendo eles depositados em microplacas com concentração inicial de 100 µL, apresentando efeito positivo contra as bactérias *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (TERAMOTO et al., 2017) sendo semelhante aos resultados do presente estudo.

Extratos de folhas de oliveira em concentrações de 100µL e 200 µL/g de carne moída apresentaram níveis constantemente mais baixos ( $p > 0,05$ ) de oxidação lipídica reduzindo- a em média 53% e 78%, sob condições aeróbias e 76% e 84% sob condições MAP (embalagem com atmosfera modificada), não alterando a aparência, maciez, suculência, sabor, aceitabilidade e preferência do consumidor ( $p > 0,05$ ), indicando que esse produto natural pode ser incorporado em produtos cárneos, sem efeito prejudicial sobre a qualidade do produto (HAYES et al., 2010).

Segundo Pereira et al., (2007) extratos aquosos de folhas de oliveira inibiram o crescimento das bactérias *B.cereus*, *B. bactéria subtilis*, *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *K.pneumonial*. O efeito antimicrobiano pode ser devido aos compostos fenólicos identificados no extrato, sendo comprovado que o hidroxitirosol e a oleuropeína inibem ou atrasam a taxa de crescimento de vários patógenos (BISIGNANO ET AL., 1999).

Carnes de frango que receberam adição de folhas de oliveira da variedade Ascolano na concentração de 5g/kg, demonstraram efeito inibitório das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus spp* (MARANGONI et al, 2015). Efeito positivo também foi verificado por Ahmed et al., (2014) que apresentaram redução de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus cereus*, em camarões cru, com aplicação de extratos de folha de oliveira na concentração de 2% (p / v).

De acordo com Markin, Duek e Berdicevsky (2003), as folhas de oliveira apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias, sendo vantajoso seu uso pelo amplo espectro de ação antimicrobiana "in vitro" contra microrganismos patogênicos humanos. Os antimicrobianos derivados naturalmente, tem grande potencial para melhorar a segurança alimentar, beneficiando as indústrias de alimentos, pela alta disponibilidade e eficácia, além do baixo custo, o que permite a otimização de tratamentos antimicrobianos garantindo a qualidade e preservando os atributos nutricionais dos alimentos (TECHATHUVANAN et al., 2014).

Na maior parte dos casos, bactérias gram-positivas são mais sensíveis a compostos naturais de plantas do que bactérias gram-negativas (SHAN et al., 2007), o que justifica resultados do trabalho, visto que a bactéria *Escherichia coli* (gram-negativa) apresentou maior resistência aos extratos. Consta-se que isso ocorre devido a diferenças na estrutura celular dessas bactérias. Nas bactérias gram-positivas as substâncias antibacterianas podem ingressar através da parede celular e atacar a membrana citoplasmática, resultando no extravasamento do citoplasma (KALEMBA; KUNICKA, 2003). Já as bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa que lhes confere proteção a vários agentes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Extratos de resíduos de moinhos de oliva foram avaliados quanto aos compostos fenólicos e sua atividade antimicrobiana e antioxidante, resultando em atividade antibacteriana de amplo espectro contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (OBIED et al., 2007). Os principais compostos fenólicos encontrados no resíduo de processamento de azeite são hidroxitiroso, oleuropeína, tirosol, ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido vanílico, ácido elenólico, catecol e rutina. Portanto, esses compostos representam uma fonte natural de antioxidante e antimicrobiano podendo ser usado na indústria alimentar, substituindo assim, conservantes químicos que tem sido relacionados com efeitos indesejáveis à saúde humana (MEDEIROS et al., 2016). Diante disso, esses resíduos não podem ser descartados, por apresentarem um valor econômico agregado, possibilitando o reaproveitamento, no próprio processo produtivo (LOPES et al., 2008).

Os valores de CMB demonstraram a persistência de anaeróbios facultativos na presença de extratos de folhas de oliveira, entretanto inibiram *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra* (KARYGIANNI et al., 2014).

De acordo com Roila et al (2019), a bactéria *Campylobacter* desenvolve biofilmes que são resistentes à antibióticos, sendo uma questão importante para a indústria de alimentos, especialmente a indústria avícola, portanto ao investigar as propriedades antimicrobianas e anti-biofilme de compostos fenólicos de extratos de subprodutos de azeitona o mesmo apresentou CMB de 0,3 mg / mL para todas as estirpes de *Campylobacter* testadas, sendo capazes de inibir a formação de biofilmes.

As toxinfecções alimentares de origem microbiana têm sido reconhecidas como um problema de saúde pública abrangente e causa importante na diminuição da produtividade e perdas econômicas que afetam países, empresas e consumidores (NASCIMENTO, 2011), apesar dos avanços nas tecnologias de controle de patógenos, a procura por alimentos isentos de conservantes químicos, com atributos nutricionais, organolépticos e de qualidade preservados tem aumentado, crescendo assim a busca pelas indústrias alimentícias por produtos naturais com ação antimicrobiana, que apresentem potencial de aplicação em alimentos (MACHADO et al., 2011).

## 5.CONCLUSÃO

Esses resultados evidenciaram o potencial uso de extratos de folha de oliveira e de resíduos da extração de azeite de oliva como antimicrobianos naturais contra alguns microrganismos que causam doenças transmitidas por alimentos, sendo portanto, uma alternativa econômica, sustentável, viável e acessível para tratamento antimicrobiano, podendo substituir conservantes químicos, os quais contém propriedades tóxicas e carcinogênicas, sendo necessários novos estudos para que estes extratos possam ser aplicados em alimentos como conservantes naturais.

## 6.REFERÊNCIAS

ABAZA, L. et al. Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas y Aceites*, v. 62, n. 1, p. 96-104, 2011. Disponível em:<

<http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/1305/1303>>.  
Acesso em: 16 jan. 2019.

AHMED, A. M. et al. Antibacterial effect of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract in raw peeled undeveined shrimp (*Penaeus semisulcatus*). **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, Giza, v. 2, n. 1, p. 53-56, 2014. Disponível em : <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2314459914000106>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

AL-ATTAR. A. M., ABU ZEID. I.M. Effect of tea (*Camellia sinensis*) and olive (*Olea europaea* L.) leaves extracts on male mice exposed to diazinon. **BioMed Res**, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23691503>>. Acesso em 10 abr. 2019.

BISIGNANO. G et al. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 51, p. 971-974, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10504039> >. Acesso em 02 abr. 2019.

BONA .E. A. M et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aib/v81n3/1808-1657-aib-81-03-00218.pdf>>. Acesso em 10 abr. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Janeiro de 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf> > Acesso em 17 de janeiro de 2019.

CLSI, 2005. Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bactéria Isolated From Aquatic Animals; Proposed Guideline (1th ed). CLSI document M49-P, v. 25, n. 22, Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova.

EL, S. N.; KARAKAYA, S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 11, p. 632-638, 2009. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19906250>> .Acesso em: 18 jun. 2019.

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

HAYES. J. E et al .Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties. **Meat Science**, v. 8 p.613-620,2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0309174009003404?via%3Dihub>> . Acesso em:23,mai.2019.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 813-829, 2003.

KARYGIANNI, L. et al. High-level antimicrobial efficacy of representative Mediterranean natural plant extracts against oral microorganisms. **BioMed Research International**. Disponível em : <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/839019/>. Acesso em 22 mar.2019.

LING, L. T. et al. Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1154-1159, 2009. Disponível em:< <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608010716>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

LOPES, C. B. et al. Biotecnologia e bioconversão de resíduos agro- industriais: uma revisão. **IN: SEMANA DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**, Ponta Grossa, v.6, 2008.

MACHADO.F. T et al. Aplicação de Antimicrobianos Naturais na Conservação de Alimentos.Embrapa 2011.

MARANGONI, C. et al. Efeito da incorporação de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) no desenvolvimento e qualidade da carne de frangos. **Brazilian Journal of Technology**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 173-184, jul/set. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjft/v18n3/1981-6723-bjft-18-3-173.pdf> >. Acesso em: 15 jan. 2019.

MARKIN, D., DUEK L., BERDICEVSKY. I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. **Mycoses**, Israel, v. 46, p. 132-136, 2003. Disponível em :< <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1439-0507.2003.00859.x>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

MEDEIROS. R. M. L et al. Destinação e reaproveitamento de subprodutos da extração olivícola. **Scientia Agraria Paranaensis Marechal Cândido Rondon**, Parana, v. 15, n. 2, p. 100-108, abr./jun. 2016. Disponível em: < <http://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/11905> >. Acesso em:17 jan. 2019

NASCIMENTO, F. C. A. Aspectos socioeconômicos das doenças veiculadas pelos alimentos.2011.Disponível em:<[https://www.nutricaoempauta.com.br/lista\\_artigo.php?cod=127](https://www.nutricaoempauta.com.br/lista_artigo.php?cod=127)>. Acesso em:23 mai. 2019.

OBIED, H. K. et al. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 7, p. 1238-1248, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507000221?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

PEREIRA, A. P. et al. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Corbançosa) Leaves. **Molecules**, Basel, v. 12, n. 5, p. 1153-1162, 2007. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6149345/>>. Acesso em : 20 fev. 2019.

ROILA, R. et al. Antimicrobial and anti-biofilm activity of olive oil by-products against *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat. **Acta Sci. Pol. Technol. Aliment**, v. 18, n. 1, p. 43–52, 2019. Disponível em:< [https://www.food.actapol.net/pub/5\\_1\\_2019.pdf](https://www.food.actapol.net/pub/5_1_2019.pdf)>. Acesso em 06 mai. 2019.

ROMERO-GARCIA et al. 2014. Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends. **Bioresour. Technol**, v. 159, p. 421–432, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414003678>>. Acesso em 22 mar. 2019.

SHAN.B. et al. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n.1, p. 112–119, 2007. Disponível em :<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507001778?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

STEURER. F. Especiarias: aplicações e propriedades. 2008. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Química de alimentos, Universidade Federal de Pelotas RS, 2008.

TECHATHUVANAN. C. et al. Efficacy of Commercial Natural Antimicrobials Alone and in Combinations against Pathogenic and Spoilage Microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 2, p. 269-275, 2014.

TERAMOTO, J. R. S et al. Histórico da introdução da cultura da oliveira no Brasil. **Infobibos- Organização de Eventos Científicos, Cursos e Treinamentos**, 2010. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_4/HistoricoOliveira/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/HistoricoOliveira/index.htm)>. Acesso em: 20 jan, 2019.

TERAMOTO. J.R.S et al. Atividade antimicrobiana das folhas de duas variedades de oliveira e a contextualização deste coproduto da produção Paulista e mundial de azeite de oliva. **Revista Intellectus**. Vol 1, n.37, 2017. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/326926677\\_Atividade\\_antimicrobiana\\_das\\_folhas\\_de\\_duas\\_variedades\\_de\\_oliveira](https://www.researchgate.net/publication/326926677_Atividade_antimicrobiana_das_folhas_de_duas_variedades_de_oliveira). Acesso em 20.mai.2019.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R; CASE, C. L. Microbiologia. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 894 p.

WELKER. C. A. D et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências Brazilian Journal of Biosciences**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 44-48, jan./mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1322/911>>. Acesso em: 17, jan. 2019.