

---

Copyright 2018, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2018, em São Paulo, no mês de maio de 2018.

As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

### **Avaliação do potencial biocida e da ecotoxicidade de proantocianidinas extraídas da fibra da casca de coco (*Cocos nucifera*)**

Douglas Guedes<sup>a</sup>, Gabriel Martins<sup>b</sup>, Daniela S. Alviano<sup>c</sup>, Marcia T. S. Lutterbach<sup>d</sup>, Leila Y. Resnik<sup>e</sup>, Eliana F. C. Sérvulo<sup>f</sup>

#### **Abstract**

---

Coconut is a widely produced and consumed fruit in Brazil, with annual production of 3 million tons. However, less than 20% of the fruit corresponds to water and pulp, so more than 80% of the fruit is discarded, generating a huge environmental damage by the amount of solid waste generated. This residue could be applied in the production of geotextiles, carpets, gardening, handicrafts and charcoal. On the other hand, its chemical composition has been exploited in order to extend the possible applications of this residue, including the application of proanthocyanidins, which are polymeric phenolic compounds also known as condensed tannins. Therefore, the main objective of this work was to evaluate the effect of coconut fiber extract on lettuce seed germination (*Lactuca sativa*) and its biocidal potential on the bacteria involved in biocorrosion (sulfate reducing bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella sp.*). The biocide effect was evaluated by the determination of the minimum inhibitory concentration through the microdilution, for the strains of *P. aeruginosa* and *Shewanella sp.*, and macrodilution for the consortium of sulfate reducing bacteria (SRB). Proanthocyanidins were tested in a concentration range of 0.1 g/L to 1 g/L. No significant interference was observed in germination of lettuce seeds, however, root lengthening was increased in the presence of proanthocyanidins. The minimum inhibitory concentration was higher than the maximum concentration tested (1 g/L) for the consortium of BRS, *P. aeruginosa* and *Shewanella sp.* Although proanthocyanidins show no biocidal effect at the maximum concentration tested, there are reports in the literature that their interaction with metal surfaces form toxic complexes to microorganisms, improving their biocidal activity and interfering with the formation of biofilm. Thus, tests are still necessary to comprehend the interaction of proanthocyanidins with metal surfaces and their interference in the formation of biofilm and mature biofilm.

**Keywords:** Tannin, Waste management, Seed germination, Biocorrosion.

---

<sup>a</sup> Doutor, Microbiologista – Universidade Federal do Rio de Janeiro

<sup>b</sup> Doutor, Farmacêutico – Universidade Federal do Rio de Janeiro

<sup>c</sup> Doutora, Microbiologista – Universidade Federal do Rio de Janeiro

<sup>d</sup> Doutora, Bióloga – Instituto Nacional de Tecnologia

<sup>e</sup> Doutora, Engenheira Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro

<sup>f</sup> Doutora, Engenheira Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

## Resumo

---

O coco é um fruto amplamente produzido e consumido no Brasil, com produção anual de 3 milhões de toneladas. Entretanto, menos de 20% do fruto corresponde a água e polpa, logo mais de 80% do fruto é descartado, gerando um grande impacto ambiental pelo montante de resíduo sólido gerado. Se aproveitado, esse resíduo pode ser aplicado na produção de materiais geotêxteis, carpetes, jardinagem, artesanatos e carvão vegetal. Por outro lado, a sua composição química vem sendo explorada de modo a ampliar as possíveis aplicações desse resíduo, inclusive pela aplicação de proantocianidinas, que são compostos fenólicos poliméricos também conhecidos como taninos condensados. Por isso, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato da fibra de coco sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) e seu potencial biocida sobre as bactérias de interesse na biocorrosão (bactérias redutoras de sulfato, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella sp.*). Para tanto, a ecotoxicidade foi avaliada através dos testes de germinação de sementes e alongamento das raízes, enquanto que o efeito biocida foi avaliado pela determinação da concentração mínima inibitória através da microdiluição, para as cepas de *P. aeruginosa* e *Shewanella sp.*, e macrodiluição para o consórcio de bactérias redutoras de sulfato (BRS). As proantocianidinas foram testadas numa faixa de concentração entre 0,1 g/L e 1 g/L. Nessa faixa não foi observada interferência significativa na germinação de sementes de alface, entretanto o alongamento das raízes foi aumentado na presença das proantocianidinas. A concentração mínima inibitória foi superior à máxima concentração testada (1 g/L) para o consórcio de BRS, *P. aeruginosa* e *Shewanella sp.* Muito embora as proantocianidinas não tenham apresentado efeito biocida na máxima concentração testada, há relatos na literatura que sua interação com superfícies metálicas formam complexos tóxicos aos microrganismos melhorando sua atividade biocida e também interferindo na formação de biofilmes. Assim, testes ainda são necessários para conhecer a interação das proantocianidinas com as superfícies metálicas e a sua interferência na formação de biofilmes e em biofilmes maduros.

**Palavras-chave:** Tanino, Aproveitamento de resíduo, Germinação de sementes, Biocorrosão.

---

## Introdução

---

O coco é um fruto amplamente cultivado e consumido em países tropicais, inclusive no Brasil, onde em média 3.000 toneladas são produzidas anualmente (1). Contudo, no máximo 20% dessa fruta é utilizada no consumo humano, seja *in natura* ou processado pela indústria de alimentos. O restante do fruto torna-se um grande problema ambiental já que normalmente ele é disposto de forma incorreta na natureza. Muito embora esse resíduo sólido possa ser convertido inteiramente em matéria prima para materiais geotêxteis, adubo, carpetes, artesanatos ou energia térmica, na forma de carvão, a taxa de reciclagem desse material no Brasil não chega a 30% (2).

Além da aplicação direta, a fibra do coco pode ter a sua composição explorada. Esse material tem concentrações razoáveis de proantocianidinas, que são compostos fenólicos poliméricos também conhecidos como taninos condensados. A composição das proantocianidinas pode variar de acordo com a espécie vegetal, no caso na fibra do coco sua caracterização apresentou polímeros de catequinas e epicatequinas (3). Mesmo não sendo a espécie vegetal de maior conteúdo de proantocianidinas, o montante disponível de fibra de coco o torna uma opção interessante para a extração desses compostos (4).

As proantocianidinas extraídas de diversas espécies vegetais já foram descritas pela sua atividade antimicrobiana (5), antioxidante (6) e anticorrosiva (7). Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi estudar o potencial biocida das proantocianidinas extraídas da fibra do coco para microrganismos envolvidos na biocorrosão (consórcio de BRS, *P. aeruginosa* e *Shewanella sp.*), bem como a sua ecotoxicidade através do teste de germinação de sementes e alongamento das raízes.

## Metodologia

A realização desse estudo utilizou fibras de cascas de cocos (*Cocos nucifera*) coletados em Sergipe, Brasil. Essa amostra foi autenticada pelo Dr. Benedito Calheiros Dias (Centro de Pesquisas do Cacau, Bahia, Brasil) e foi depositada com o código CPC 2190. O extrato aquoso de proantocianidinas foi obtido por infusão em água destilada, seguida de liofilização. A partir do material liofilizado, foi preparado uma solução estoque para ser usado em todos os experimentos, esterilizada por filtração em membrana, como por de 0,22 µm, e armazenada a -20°C (±2°C) até o momento de uso.

O consórcio de BRS e as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Shewanella sp.* foram isolados de uma amostra de água de um sistema de resfriamento de caldeira de uma refinaria com histórico de biocorrosão. Essas espécies microbianas foram depositadas no banco de cepas do Instituto Nacional de Tecnologia (INT – Rio de Janeiro, Brasil).

A concentração mínima inibitória das proantocianidinas extraídas da fibra do coco foi determinada por microdiluição para as cepas de *P. aeruginosa* e *Shewanella sp.*, e macrodiluição para o consórcio de BRS, conforme descrito pelo “Clinical Laboratory Standards Institute (8).

A ecotoxicidade foi determinada usando sementes de alface (*Lactuca sativa*) por meio dos testes de germinação de sementes e alongamento de raízes (9). O percentual de germinação de sementes e do alongamento das raízes foram determinados através das Equações 1 e 2, respectivamente.

$$\%GS = \left( \frac{GT}{GC} \right) \times 100$$

**Equação 1** – Percentual de germinação de sementes. %GS – Percentual de Germinação de Sementes; GT – Número de Sementes Germinadas no Teste; GC - Número de Sementes Germinadas no Controle.

$$\%CR = \left( \frac{CRT}{CRC} \right) \times 100$$

**Equação 2** – Percentual de crescimento das raízes. %CRT – Percentual de Crescimento das Raízes; CRT – Crescimento das Raízes nos Testes (média); CRC - Crescimento das Raízes no Controle (média).

## Resultados e discussão

As proantocianidinas extraídas da fibra do coco já foram descritas pela sua atividade antimicrobiana (4). Contudo, a atividade biocida varia de acordo com a espécie microbiana e a concentração de proantocianidinas, variando entre 1 g/L e 2,5 g/L (10-13). A concentração mínima inibitória (CMI) das proantocianidinas extraídas da fibra do coco para *P. aeruginosa*, *Shewanella sp.* e consórcio de BRS é apresentada na Tabela 1. Como pode ser observado, a

CMI foi superior à máxima concentração testada, nesse estudo não foi avaliada concentrações maiores que 1 g/L, pois a sua aplicação em larga escala se torna inviável.

**Tabela 1 – Concentração mínima inibitória (CMI) de proantocianidinas extraídas da fibra de coco para microrganismos envolvidos na biocorrosão**

Microrganismo/Grupo microbiano	CMI (g/L)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1
<i>Shewanella sp.</i>	>1
Consórcio de Bactérias Redutoras de Sulfato	>1

Além do efeito antimicrobiano em espécies isoladas, as proantocianidinas já foram descritas pela atividade em biofilmes (10-11). Quando esse biofilme é formado em superfícies metálicas, a complexação dos íons metálicos com as proantocianidinas formam compostos tóxicos que aumentam o potencial biocida. Ademais, quando a superfície metálica é exposta previamente ao composto natural, há a formação de um filme protetor na superfície metálica que interfere na formação do biofilme (13-14).

Antes da utilização de novos produtos em processos industriais é necessária a sua avaliação quanto à sua toxicidade ao meio ambiente, de modo a evitar danos ou interferências negativas ao meio ambiente. A ecotoxicidade pode ser verificada pela aplicação de diferentes organismos-teste, como sementes de vegetais (*Lactuca sativa* L., *Allium* sp. and *Eruca sativa*), peixes, crustáceos, cnidários e minhocas (9).

O uso de sementes de vegetais para avaliar a ecotoxicidade são uma alternativa de baixo custo e grande sensibilidade para indicar a presença de substâncias tóxicas (15). Foram consideradas como sementes germinadas aquelas que apresentavam raízes com pelo menos 20 mm. Os resultados da germinação de sementes e do alongamento das raízes são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2 – Percentual de germinação de sementes e percentual de alongamento de raízes em contato com diferentes concentrações de proantocianidinas extraídas da fibra de coco**

Concentração (g/L)	Sementes germinadas	Percentual de germinação de sementes	Tamanho das raízes (mm)	Percentual de alongamento de raízes
0	14 (±3)	-	25,2 (±4)	-
0,125	13 (±2)	93%	38,1 (±7)	151%
0,25	13 (±3)	93%	36 (±7)	143%
0,5	14 (±2)	100%	35 (±11)	139%
1	14 (±2)	100%	34 (±9)	135%

\*O desvio-padrão é apresentado entre parênteses para os dados referentes às sementes germinadas e ao alongamento das raízes.

Neste estudo não foi observado nenhum efeito significativo na germinação de sementes, uma vez que o percentual de germinação de sementes foi superior a 90% em todas as concentrações testadas. Por outro lado, em relação ao alongamento das raízes, o contato das proantocianidinas com as sementes de alface promoveu um aumento de tamanho de mais de 30%, sugerindo que não só esses compostos não apresentam efeito tóxico como são capazes de estimular o desenvolvimento das sementes.

Os resultados sugerem que mesmo que as proantocianidinas apresentem atividade biocida, não há efeito negativo sobre sementes de alface em concentrações até 1 g/L.

## Conclusões

Atualmente, o conceito de sustentabilidade tem sido muito mais difundido, induzindo ao uso consciente dos recursos naturais, aproveitamento máximo dos produtos e redução da geração de resíduos. Assim, a bioprospecção de resíduos sólidos podem ser uma possibilidade para contribuir com o desenvolvimento sustentável. Nesse estudo, foram avaliadas diferentes concentrações de proantocianidinas extraídas da fibra do coco em relação ao seu potencial biocida e a toxicidade ao meio ambiente. Até a concentração máxima testada (1 g/L) não foi observada nenhuma interferência negativa na germinação de sementes e até estimularam o seu crescimento. Em contrapartida, a concentração mínima inibitória foi superior a 1 g/L para os microrganismos testados (*P. aeruginosa*, *Shewanella sp.* e consórcio de BRS). Entretanto, ainda é necessário verificar a interferência das proantocianidinas extraídas da fibra do coco em biofilmes em formação e já maduros. E, ainda, verificar se as proantocianidinas extraídas da fibra do coco tem atividade anticorrosiva e se a complexação com íons metálicos aumentam o potencial biocida e a interferência no biofilme.

## Referências bibliográficas

- (1) FAOSTAT. (2014). “Data of coconut production” [Online]. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/>.
- (2) SILVA, A.C. “Reaproveitamento da casca de coco verde”, **Revista Monografias Ambientais**, vol. 13, pp. 4077-4086, Dec. 2014.
- (3) ESQUENAZI, D.; WIGG, M.D.; MIRANDA, M.M.F.S.; RODRIGUES, H.M.; TOSTES, J.B.F.; ROZENTAL, S.; SILVA, A.J.R.; ALVIANO, C.S. “Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract”. **Research in Microbiology**, vol. 153, pp. 647-652, Oct. 2002.
- (4) ISRAEL, A.U.; OGALI, R.E.; AKARANTA, O.; OBOT, I.B. “Extraction and characterization of coconut (*Cocos nucifera* L.) coir dust”. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, vol. 6, pp.717-724, Nov. 2011.
- (5) VIJU, N.; SATHEESH, S.; VICENT, S.G.P. “Antibiofilm activity of coconut (*Cocos nucifera* Linn) husk fibre extract”, **Saudi Journal of Biological Sciences**, vol. 20, pp. 85-91, Nov. 2013.
- (6) SHAOA, Y.; HU, Z.; YU, Y.; MOU, R.; ZHUA, Z. “Phenolic acids, anthocyanins, proanthocyanidins, antioxidant activity, minerals and their correlations in non-pigmented, red, and black rice.”, vol. 239, **Food Chemistry**, pp. 733-741, Jan. 2018.
- (7) FATEH, A.; ALIOFHAZRAEI, M.; REZVANIAN, A.R. “Review of corrosive environments for cooper and its corrosion inhibitors”. **Arabian Journal of Chemistry**, article in press, Jun. 2017.
- (8) CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.
- (9) MORALES, G.C. **Ensayos Toxicologicos y Métodos de Evaluacion de Calidad de Aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. 1 ed. México, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua-IMTA, 2004.

- 
- (10) VIJU, N.; SATHEESH, S.; VINCENT, S.G.P. "Antibiofilm activity of coconut (Cocos nucifera Linn.) husk fiber extract". **Saudi Journal of Biological Sciences**, vol. 20, pp. 85-91, Nov. 2012.
- (11) TRENTIN, D.S.; SILVA, D.B.; AMARAL, M.W.; ZIMMER, K.Z.; SILVA, M.V.; LOPES, N.P.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. "Tannins possessing bacteriostatic effect impair Pseudomonas aeruginosa adhesion and biofilm formation". **Promoting Reproducibility by Emphasizing Reporting**, vol. 8, Jun. 2013, pp. 1-13.
- (12) PARTHIPAN, P.; NARENKUMAR, J.; ELUMALAI, P.; PREETHI, P.S.; NANTHINI, A.U.R.; AGRAWAL, A.; RAJASEKAR, A. "Neem extract as a green inhibitor for microbiologically influenced corrosion of carbon steel API 5LX in a hypersaline environments". **Journal of Molecular Liquids**, vol. 240, May 2017, pp. 121-127.
- (13) RAMÍREZ, M.G.L.; RUIZ, H.G.O.; ARZATE, F.N.; GALLEGOS, M.A.C.; ENRIQUEZ, S.G. "Evaluation of fungi toxic activity of tannins and a tannin-copper complex from the mesocarp of Cocos nucifera Linn". **Wood and Fiber Science**, vol. 44, Jan. 2012, pp.357-364.
- (14) NEGM, N.A.; FARARGY, A.F.; MOHAMMAD, I.A.; ZAKI, M.F.; KHOWDIARY, M.M. "Synthesis and inhibitory activity of schiff base surfactants derived from tannic acid and their Cobalt (II), Manganese (II) and Iron (III) complexes against bacteria and fungi". **Journal of Surfactants and Detergents**, vol. 16, Jan. 2013, pp. 767-777.
- (15) PELEGRINI, N.N.B.; PATERNIANI, J.E.S.; CARNIATO, J.G.; SILVA, N.B.; PELEGRINI, R.T. Estudo da sensibilidade de sementes de Euruca sativa (rúcula) utilizando substâncias tóxicas para agricultura. **XXXV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola (CONBEA)** João Pessoa - PB, 2006.