



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

## EFEITO ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DO CAPIM-LIMÃO SOBRE PATÓGENOS EM REPOLHO

T.F. Machado<sup>1</sup>, R.C.A. Pereira<sup>2</sup>, M.F. Borges<sup>3</sup>, J.O. Rebouças<sup>4</sup>, M.F. de Oliveira<sup>5</sup>

1- Embrapa Agroindústria Tropical –CEP: 60511-110 – Fortaleza – CE – Brasil, Telefone: 55 (85) 3391-7313 – Fax: 55 (85) 3391-7221 – e-mail: (terezinha.feitosa@embrapa.br.

2 - Embrapa Agroindústria Tropical –CEP: 60511-110 – Fortaleza – CE – Brasil, Telefone: 55 (85) 3391-7313 – Fax: 55 (85) 3391-7221 – e-mail: rita.pereira@embrapa.br.

3- Embrapa Agroindústria Tropical –CEP: 60511-110 – Fortaleza – CE – Brasil, Telefone: 55 (85) 3391-7313 – Fax: 55 (85) 3391-7221 – e-mail:maria.fatima@embrapa.br.

4 - Departamento de Ciências dos Alimentos – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias – CEP: 60356-000 – Fortaleza – CE – Brasil, Telefone: 55 (85) 3366-9751 – Fax: 55 (85) 3366-9739 – e-mail: nainarebocas@hotmail.com

5 - Departamento de Ciências dos Alimentos – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias – CEP: 60356-000 – Fortaleza – CE – Brasil, Telefone: 55 (85) 3366-9751 – Fax: 55 (85) 3366-9739 – e-mail: matheusufc93@gmail.com

**RESUMO** – Este estudo foi realizado para determinar a eficácia do óleo essencial (OE) do capim-limão (*Cymbopogon citratus*) na inativação de patógenos em repolho. As folhas de repolho foram individualmente lavadas, expostas à luz UV e inoculadas com *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (8 log de ufc/ml). As folhas inoculadas foram lavadas por imersão em soluções do OE em três concentrações (500, 750 e 1000 ppm) em dois tempos de tratamento (10 e 15 minutos). Para enumerar os sobreviventes as amostras foram diluídas e a população viável foi determinada em ágar seletivo para cada espécie. Diferenças significativas foram encontradas entre as três concentrações das soluções e os dois tempos de tratamentos para as espécies bacterianas avaliadas ( $p>0,05$ ). A redução de *L. monocytogenes* alcançou 2,7 log ufc no tratamento com solução 1000 ppm/15 minutos, enquanto que a redução de *E. coli* nas mesmas condições não excedeu 1,0 log ufc.

**ABSTRACT** – This study was conducted to determine the effectiveness of essential oil (EO) of lemon grass (*Cymbopogon citratus*) in the inactivation of pathogens in cabbage. The leaves of cabbage were individually rinsed, exposed to UV light and inoculated with *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* (8 log cfu/ml). The inoculated leaves were washed by immersion in EO solutions in three concentrations (500, 750 and 1000 ppm) in two treatment times (10 and 15 minutes). To enumerate the survivors the samples were diluted and viable population was determined on selective agar for each species. Significant differences were found between the three concentrations of the solutions and the two times treatments among the evaluated bacterial species ( $p>0.05$ ). The reduction of *L. monocytogenes* reached 2.7 log cfu in the treatment with 1000 ppm solution/15 minutes, while the reduction of *E. coli* under the same conditions did not exceed 1.0 log cfu.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Cymbopogon citratus*

**KEYWORDS:** *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Cymbopogon citratus*



## 1. INTRODUÇÃO

O consumo de frutas e hortaliças tem sido estimulado por campanhas em vários países, pelos grandes benefícios que trazem à saúde, tanto do ponto de vista nutricional como na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. No entanto, a contaminação microbiológica das hortaliças, principalmente daquelas que são ingeridas *in natura*, constitui o fator de maior relevância na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos (Francis et al, 2012; Oliveira et al, 2011). O número de surtos de doenças de origem alimentar vinculado a esse produto tem aumentado e são causados, principalmente, por *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. (Ethelberg et al, 2010; Siroli et al, 2016; Spadafora et al, 2016).

Algumas soluções antimicrobianas têm sido usadas para a higienização de alimentos. Os ácidos orgânicos e fosfatos trissódicos são sanitizantes seguros e eficazes para a lavagem de hortaliças frescas. O cloro, em suas diversas formas, especialmente na de sais de hipoclorito, é um dos sanificantes mais usados. No entanto, a possível formação de compostos clorados cancerígenos na água, põe em questão o uso do cloro em alimentos. Com a crescente preocupação com a eficácia e segurança toxicológica de produtos químicos e conservantes sintéticos, aumentou a demanda por alternativas naturais. Nesse contexto, os óleos essenciais de plantas estão atraindo o interesse pelo seu potencial como conservantes naturais em alimentos. Possuem *status* de substâncias seguras (Generally Recognized As Safe - GRAS) e, muitos deles exibem um amplo espectro de atividade antimicrobiana, com potencial para o controle de patógenos de origem alimentar (Gutierrez et al, 2008).

Em estudo anterior avaliou-se, *in vitro*, a atividade antimicrobiana do OE do capim-limão (Machado et al, 2012). O objetivo deste trabalho foi estender o citado estudo pela avaliação da eficácia do referido OE em repolho inoculado com *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium em função da concentração do óleo e do tempo de contato.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado o OE de folhas de capim-limão obtido por hidro destilação em um aparelho do tipo Clevenger. As cepas bacterianas usadas foram *Salmonella* entérica sorovar Typhimurium ATCC 51812, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Escherichia coli* ATCC 11775 preparadas pelo subcultivo de 100 µL de culturas estoque em 9 mL de BHI e incubada a 35 °C/24 h. Após incubação as culturas foram diluídas em solução de NaCl 85% até alcançar turbidez similar ao tubo 0,5 da escala McFarland. As folhas das amostras de repolho foram lavadas, individualmente, em água corrente e expostas à luz UV por 20 minutos (10 minutos para cada lado). Na sequência, foram cortadas em pedaços (20 mm x 20 mm) com facas esterilizadas e inoculadas com culturas puras dos patógenos. Diferentes porções de 25 g de folhas inoculadas foram acondicionadas em placas de Petri estéreis e armazenadas a 4 °C/24 horas antes dos tratamentos. Após incubação, 25 g de repolho foram tratados com diferentes procedimentos de lavagem por 10 e 15 minutos em 100 mL da solução do OE nas concentrações 500, 750 e 1000 ppm e água destilada estéril. Para a quantificação de *Salmonella* Typhimurium, *L. monocytogenes* e *E. coli* as amostras foram diluídas em série em água peptonada (0,1%) e a população viável foi determinada por plaqueamento em ágar Hectoen, ágar Palcam e ágar eozina azul de metileno (EMB). As placas foram incubadas a 37 °C/24 h. Os resultados foram expressos em log ufc/g do produto. Os experimentos foram conduzidos com duas repetições, em triplicata e os resultados analisados pela análise de variância pelo software SAS (1999). As médias foram comparadas pela diferença mínima significativa, usando o teste de Tuckey no nível de 5%.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo não foram detectadas *Salmonella* Typhimurium, *L. monocytogenes* e *E. coli* em nenhuma das amostras não inoculadas. As contagens de *Salmonella* Typhimurium, *L. monocytogenes* e *E. coli* nas amostras de repolho depois da inoculação e armazenamento a 4 °C/24 horas foram 4,1 log ufc/g, 4,6 log ufc/g e 4,0 log ufc/g, respectivamente. As amostras inoculadas e sem tratamento com o óleo essencial foram usadas como controle na avaliação do efeito do óleo sobre esses patógenos nas amostras. Os resultados mostraram que o uso do OE em diferentes concentrações, promoveu mudança significativa ( $p < 0,05$ ) na redução das contagens bacterianas. Para *L. monocytogenes* observou-se que após o tratamento da amostra com 500 ppm do OE a contagem média bacteriana foi reduzida em 1 log ufc/g, enquanto que o tratamento com 1000 ppm do óleo promoveu uma redução de 2,7 log ufc/g (Tabela 1). Os resultados mostraram que o uso do OE diminuiu a contagem média de *S. Typhimurium* e que os tratamentos com 750 e 1000 ppm do OE promoveram redução de pelo menos 2 log ufc/g. Para *E. coli* a contagem média na amostra controle foi de 4,0 log ufc/g. Após os tratamentos com o OE essa contagem diminuiu entre 0,7 e 1 log ufc/g, indicando que entre as espécies bacterianas avaliadas, essa foi a mais resistente ao OE de capim-limão.

Tabela 1 – Contagem de *Salmonella* Typhimurium, *L. monocytogenes* e *E. coli* em repolho tratados com óleo essencial do capim-limão.

Microrganismo (log ufc/g)	Tempo (min)	Concentração do óleo (ppm)		
		500	750	1000
<i>Salmonella</i> Typhimurium*	10	2,4	2,3	1,8
	15	2,1	1,8	1,5
	M	2,3	2,1	1,7
<i>L. monocytogenes</i> **	10	3,7	2,4	2,0
	15	3,5	2,3	1,9
	M	3,6	2,4	1,9
<i>E. coli</i> ***	10	2,9	2,8	3,3
	15	3,2	3,2	3,3
	M	3,1	3,0	3,3

Controles: (\*4,1 log ufc/g; \*\* 4,6 log ufc/g; \*\*\*4,0 log ufc/g), M: média

Diferentes estudos mostram que bactérias patogênicas transmitidas por alimentos sobrevivem em diferentes hortaliças por longos períodos em diferentes temperaturas. Chang e Fang (2007) relataram que *Salmonella* Typhimurium inoculada em alface manteve-se viável a 22 °C durante 7 dias. *Enterobacter sakazakii* inoculado em alface e tomate foi recuperado por Kim et al (2006) depois de 28 dias com redução de apenas 1 log ufc na maioria das amostras. Neste estudo, *Salmonella* Typhimurium, *L. monocytogenes* e *E. coli* inoculados em repolho foram recuperados após incubação a 7 °C/24 horas. Os resultados mostram que as amostras de repolho tratadas com o OE de capim-limão apresentaram reduções nas contagens bacterianas. Observou-se que os tempos de contato (10 e 15 minutos) do OE de capim-limão com as espécies bacterianas avaliadas foram igualmente eficazes e que o aumento da atividade antimicrobiana do óleo foi demonstrado com o aumento de sua concentração. A maior redução bacteriana foi evidenciada na contagem de *L. monocytogenes* na amostra tratada com 1000 ppm do OE. Resultado semelhante foi obtido para *Salmonella*



Typhimurium, confirmando o resultado de Moore-Neibel et al (2011) que relataram redução de até 4 log ufc/g para *S. Newport* em folhas de alface tratadas com o OE de capim-limão. Belletti et al (2008) também apresentaram resultados semelhantes com reduções de 2 log de *S. Enteritidis* em saladas de frutas que foram exposta ao óleo essencial de limão após 9 dias. É relevante observar que o citral e o geraniol são os principais componentes bioativos do OE do capim-limão e que a ação antimicrobiana desses compostos tem sido demonstrada frente a diferentes espécies patogênicas transmitidas por alimentos (Onawunmi et al, 1984; Friedman et al, 2004). Os resultados desse estudo confirmam o efeito da concentração dos constituintes do óleo sua ação antimicrobiana.

#### 4. CONCLUSÃO

Estes resultados indicam que o OE do capim-limão tem potencial para ser utilizado no tratamento antimicrobiano contra *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium e *E. coli*. Embora nenhum dos tratamentos tenha eliminado completamente os patógenos sobre o repolho, os resultados sugerem que esse OE pode ser usado como uma alternativa natural para controlar o crescimento bacteriano na hortaliça estudada e, em combinação com outra tecnologia de obstáculo, pode melhorar a segurança microbiológica do produto.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belletti, N., Lanciotti, R., Patrignani, F., & Gardini, F. (2008). Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit-based salads. *Journal of Food Science*, 73, 331-338.
- Chang, J.M., & Fang, T.J. (2007). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 24, 745-751.
- Ethelberg, S., Lisby, M., Böttiger, B., Schultz, A.C., Villif, A., Jensen, T., Olsen, K.E., Scheutz, F., Kjelso, C., & Müller, L. (2010). Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. *Euro Surveillance*, 15 (6), 19484.
- Francis, G.A., Gallone, A., Nychas, G.J., Sofos, J.N., Colelli, G., Amodio, M.L., & Spano, G. (2012). Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 52, 595-610.
- Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E., & Mandrell, R.E. (2004). Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6042-6048.
- Gutierrez, J., Rodriguez, G., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). Efficacy of plant essential oils against food-borne pathogens and spoilage bacteria associated with ready to eat vegetables: Antimicrobial and sensory screening. *Journal of Food Protection*, 71(9), 1846-1854.
- Kim, H., Ryu, J.H., & Beuchat, L.R. (2006). Survival of *Enterobacter sakazakii* on fresh produce as affected by temperature, and effectiveness of sanitizers for its elimination. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 134-143.
- Oliveira, M.A, Sousa, V.M., Bergaminie, A.M.M., & Martinis, E.C.P. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22(8), 1400-1403.
- Machado, T.F., Pereira, R.C.A., Sousa, C.T., Batista, V.C.V., & Pereira, I.M.C. (2012). Atividade antimicrobiana do óleo essencial do capim-limão. *Boletim de Pesquisa*, ISSN 1679-6543, 62.
- Moore-Neibel, K., Gerber, C., Patel, J., Friedman, M., & Ravishankar, S. (2011). Antimicrobial activity of lemongrass oil against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 485-492.



Onawunmi, G.O., Yisak, W.A.B., & Ogunlana, E.O. (1984). Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Journal of Ethnopharmacology*, 12, 279-286.

SAS. Proprietary software. Release 8.2 (TS2MO). Cary, NC, USA: SAS Ins. Inc, 1999.

Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D. I., Vannini, L., Salvetti, E., Torriani, S., Gardini, F., & Lanciotti, R. (2016). Use of a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples. *Food Microbiology*, 54, 11-19.

Spadafora N. D., Paramithiotis, S., Drosinos, E.H., Cammarisano, L., Rogers, H.J., Müller, & Carsten T. (2016) Detection of *Listeria monocytogenes* in cut melon fruit using analysis of volatile organic compounds. *Food Microbiology*, 54, 52-59.