

Boletim de Pesquisa 62 e Desenvolvimento ISSN 1679-6543 Novembro, 2012

Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de Capim-Limão



ISSN 1679-6543

Novembro, 2012

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 62

Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de Capim-Limão

*Terezinha Feitosa Machado
Rita de Cássia Alves Pereira
Civita Teixeira de Sousa
Valéria Chaves Vasconcelos Batista
Iana Maria Cristino Pereira*

Embrapa
Brasília, DF
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Unidade responsável pelo conteúdo e edição

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109
Home page: www.cnpat.embrapa.br
E-mail: vendas@cnpat.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Marlon Vagner Valentim Martins*
Secretário-Executivo: *Marcos Antonio Nakayama*
Membros: *José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues
Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cassia Costa
Cid, Rubens Sonsol Gondim, Fábio Rodrigues de Miranda*

Revisão de texto: *Marcos Antonio Nakayama*
Normalização bibliográfica: *Edineide Maria Machado Maia*
Edição eletrônica: *Marcos Antonio Nakayama*
Foto da capa: *Rita de Cássia Alves Pereira*

1ª edição (2012): versão eletrônica

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agroindústria Tropical**

Atividade antimicrobiana do óleo essencial de capim-
-limão / Terezinha Feitosa Machado... [et al.] – Fortaleza :
Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

15 p.; 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento /
Embrapa Agroindústria Tropical; ISSN 1679-6543, 62).

1. *Cymbopogon citratus*. 2. Ação antibacteriana. 3. Patógenos.
4. Deteriorantes. I. Machado, Terezinha Feitosa. II. Pereira, Rita
de Cássia Alves. III. Sousa, Civita Teixeira de. IV. Batista, Va-
léria Chaves V. Pereira, Iana Maria Cristino VI. Série.

CDD 661.806

© Embrapa 2012

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	10
Conclusão	12
Referências	13

Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de Capim-Limão

Terezinha Feitosa Machado¹

Rita de Cássia Alves Pereira²

Civita Teixeira de Sousa³

Valéria Chaves Vasconcelos Batista⁴

Iana Maria Cristino Pereira⁵

Resumo

Neste trabalho, foi avaliado o potencial antimicrobiano do óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus* - (DC) Stapf). Para estabelecer esse potencial, foram utilizadas seis espécies bacterianas relacionadas à deterioração e doenças transmitidas por alimentos (DTA), *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*. Os métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo foram empregados para determinar a atividade antimicrobiana e concentração inibitória mínima (CIM) para cada espécie. Os resultados mostraram que o óleo essencial avaliado inibiu o crescimento de todas as espécies bacterianas, Gram-positivas e Gram-negativas, sendo as primeiras as mais sensíveis ao óleo. O diâmetro do halo de inibição variou de 33 mm

¹ Engenheira de alimentos, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, terezinha.feitosa@embrapa.br

² Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Fitotecnia/Plantas Medicinais, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, rita.pereira@embrapa.br

³ Engenheira de alimentos, mestranda em Engenharia Química pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, civitatsou@ig.com.br

⁴ Graduanda em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, valeriacvb@ig.com.br

⁵ Graduanda em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, ianacris_07@hotmail.com

a 10 mm e a CIM variou de 0,34 mg/mL a 11 mg/mL. Os resultados demonstram que o óleo essencial do capim-limão apresenta potencial como agente antimicrobiano natural.

Termos para indexação: *Cymbopogon citratus*; ação antibacteriana; patógenos e deteriorantes.

Antimicrobial Activity of Essential Oil of Lemongrass

Abstract

In this work, it was evaluated the antimicrobial potential of essential oil of lemongrass (Cymbopogon citratus (DC) Stapf). In order to establish this potential, it was used six bacterial species related to spoilage and foodborne disease, Listeria monocytogenes, L. innocua, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Salmonella choleraesuis. The methods of agar diffusion and broth microdilution were employed to determine the antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration (MIC) for each species. The results showed that the essential oil evaluated inhibited the growth of all bacterial species, Gram positive and Gram negative, the former being more sensitive to oil. The diameter of inhibition zone ranged from 33 mm to 10 mm and the MIC varied from 0.34 mg/mL to 11 mg/mL. The results showed that the evaluated essential oil presents high potential as natural preservative.

Index terms: Cymbopogon citratus, antibacterial action; pathogens and spoilage.

Introdução

As doenças alimentares de origem microbiológica constituem um problema crescente em saúde pública e uma causa importante na redução da produtividade econômica, tanto em países desenvolvidos como em vias de desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). Os vários fatores que, inter-relacionados, contribuem para agravar o risco de ocorrência dessas doenças incluem as inovações na agropecuária, mudanças nos hábitos alimentares, evolução tecnológica e demais alterações no plano ambiental, econômico e social (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

Os microrganismos apresentam uma enorme facilidade de evoluir por mutação e recombinação genética, conduzindo ao aparecimento de espécies ou linhagens com maior virulência e com grande capacidade de sobrevivência perante antimicrobianos e fatores ambientais adversos (BRANDL, 2006; O'BRIEN, 2002). O aumento da resistência bacteriana aos antibióticos induz ao aparecimento de estirpes mais virulentas, com capacidade de atravessar barreiras naturais de defesa do organismo e de se tornarem patogênicas, mesmo quando presentes em baixo número (SANTOS; CUNHA, 2007). Por isso, há um interesse considerável na identificação de novas classes de antimicrobianos, que possam ser úteis para a conservação de alimentos.

Os óleos essenciais de planta têm sido muito utilizados como agentes flavorizantes em alimentos, bebidas, produtos de confeitaria, entre outros. Sua versátil composição e o grande espectro antimicrobiano, associados à sua baixa toxicidade, os tornam possíveis agentes naturais para a conservação de alimentos (OUSSALAH et al., 2006). Diversas referências sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais estão disponíveis na literatura (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2007; SCHELZ et al., 2006). Essa atividade é atribuída à presença de compostos fenólicos e terpenos, que na sua forma pura têm mostrado atividade antibacteriana e antifúngica (BOZIN et al., 2006). Análises químicas desses óleos têm mostrado que os principais

compostos ativos são principalmente carvacrol, timol, citral, eugenol, 1, 8-cineol, limoneno, pineno, linalol e seus precursores (DEMETZOS; PERDETZOGLOU, 2001). No entanto, muitas vezes há grandes diferenças na atividade antibacteriana relatada sobre o óleo da mesma planta. As razões para essa variabilidade podem ser devidas às fontes geográficas, épocas de colheita, genótipo, clima e método de extração, fatores que influenciam a composição química e as proporções relativas de cada constituinte no óleo essencial da planta (BURT, 2004; HOLLEY; PATEL, 2005).

A espécie *Cymbopogon citratus*, pertencente à família Poaceae, é originária da Índia e largamente distribuída por vários países tropicais, entre eles o Brasil, onde assume diferentes sinonímias como capim-limão, capim-santo, erva-cidreira, entre outras. A medicina popular utiliza o chá ou abafado, preparado a partir de suas folhas, como calmante, analgésico, antipirético, antirreumático, diurético e em distúrbios digestivos (FERREIRA; FONTELES, 1989). Estudos sugerem que a atividade antibacteriana de *C. citratus* reside principalmente nos componentes α - e β -citral presentes no óleo (ONAWUNMI et al., 1984).

Considerando o uso popular de *C. citratus*, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do óleo essencial dessa espécie contra agentes patogênicos de origem alimentar e bactérias associadas à deterioração de alimentos.

Material e métodos

Material vegetal

Amostras de folhas de *C. citratus* foram obtidas de plantas provenientes do Campo Experimental da Embrapa Agroindústria Tropical, localizado no Município de Paraipaba, Ceará. Uma subamostra da espécie foi depositada no Herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, com o número de Tombo 73.792.

Extração do óleo essencial

O material vegetal foi submetido à hidrodestilação por 4 horas, utilizando um aparelho do tipo Clevenger. O óleo essencial separado por centrifugação foi submetido à secagem com Na_2SO_4 , transferido para frascos de vidro âmbar com tampa rosqueada e armazenado sob refrigeração até o momento das análises (CRAVEIRO et al., 1976).

Microorganismos

As espécies bacterianas usadas neste estudo foram *Escherichia coli* ATCC 10536, *Listeria innocua* ATCC 19115, *Listeria monocytogenes* ATCC 33090, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Todas as espécies foram mantidas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (caldo BHI, Merck) contendo 20% de glicerol. As culturas de trabalho foram preparadas pelo subcultivo de 100 μL de cada cultura estoque em 9 mL de caldo BHI e incubadas a $35\text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas. Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma turbidez comparável à do tubo 0,5 da escala de McFarland (Biomérieux Inc.), o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, foi utilizado o método de difusão em ágar conforme norma M2-A8 do Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI/NCCLS (ANVISA, 2003a.). Suspensões microbianas foram semeadas na superfície de ágar Mueller-Hinton (Becton Dickinson). Com um perfurador estéril, foram feitos poços de 5 mm de diâmetro interno, aos quais foram adicionados 25 μL do óleo essencial de *C. citratus* em concentrações binárias, preparadas em Tween 80 1%. As placas inoculadas foram mantidas em temperatura ambiente durante 30 minutos, para permitir a difusão do óleo e, posteriormente, incubadas em $35\text{ }^\circ\text{C}/24\text{ h}$. A atividade

antimicrobiana foi avaliada pela medida do diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano em torno dos poços. Halos com diâmetros iguais ou superiores a 7 mm foram considerados indicativos de sensibilidade bacteriana ao óleo. Soluções estéreis de Tween 80 (VETEC) 1% e de amicacina (Sigma–Aldrich) 1,2 mg/mL foram usadas como controles negativo e positivo do experimento, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM do óleo essencial para as cepas bacterianas foi determinada pelo método da microdiluição em caldo de cultura (ANVISA, 2003b). Suspensões bacterianas com densidade celular ajustada para 10^8 UFC/mL, como descrito anteriormente, foram diluídas em caldo BHI estéril, para aproximadamente 10^6 UFC/mL. Aos poços-teste, de placas de microdiluição com 96 poços, foram adicionados 80 μ L das suspensões microbianas, 100 μ L de caldo BHI (Merck) e 20 μ L de diluições binárias do óleo essencial de *C. citratus*. Nos poços-controle, foram adicionados 80 μ L das suspensões microbianas, 100 μ L de caldo BHI e 20 μ L de solução estéril de amicacina 1,2 mg/mL ou de Tween 80 1%. Após incubação a 35 °C por 24 horas, a menor concentração dos óleos na qual não foi evidenciado crescimento microbiano foi determinada como CIM.

Resultados e discussão

A atividade antimicrobiana do óleo de *C. citratus* foi avaliada em termos de halos de inibição do crescimento microbiano, gerados por difusão dos componentes do óleo essencial em placas de ágar, contra espécies bacterianas Gram-positivas (*S. aureus*, *L. monocytogenes* e *L. innocua*) e Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*). Todas as espécies bacterianas testadas foram susceptíveis à ação do óleo com diferenças significativas (Tabela 1). Os halos das espécies Gram-positivas foram maiores do que os halos das Gram-negativas. *S. aureus* foi a espécie mais sensível, apresentando o maior halo de

inibição ($33 \pm 2,8$ mm/mL), enquanto *S. choleraesuis* foi a menos sensível com halo de inibição de 10 mm/mL de diâmetro.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. citratus*.

Microrganismo	Halo de inibição (mm/mL) ⁽¹⁾	CIM ⁽²⁾ (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	$33 \pm 2,8^a$	0,34
<i>Listeria monocytogenes</i>	$23 \pm 0,0^b$	0,68
<i>Listeria innocua</i>	$23 \pm 0,0^b$	1,37
<i>Escherichia coli</i>	$17 \pm 0,0^c$	5,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$14 \pm 1,4^d$	11,0
<i>Salmonella choleraesuis</i>	$10 \pm 0,0^e$	2,75

⁽¹⁾ Os valores são média \pm desvio padrão de dois experimentos. Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

⁽²⁾ CIM: concentração inibitória mínima.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. citratus* foi também avaliada pelos valores da CIM, determinada pela diluição em caldo de cultura. Os valores das CIMs estão apresentados na Tabela 1. As menores CIMs foram registradas para as bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *L. monocytogenes* e *L. innocua*), confirmando a maior eficácia do óleo para esse grupo. A maior CIM (11 mg/mL) foi registrada para *P. A. eruginosa*, configurando a espécie mais resistente à presença do óleo.

Na maioria das pesquisas para avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas, são utilizadas séries de diluição em ágar ou em caldo e, em alguns casos, ambos os ensaios para fins de comparação, pois o desempenho antimicrobiano nos dois sistemas pode variar. A hidrofobicidade dos componentes dos óleos essenciais é conhecida por limitar o valor dos testes de difusão para estimar com precisão a potência antimicrobiana. Por isso, várias substâncias como etanol, metanol, tween 80, hexano entre outras são utilizadas para dissolver ou estabilizar os óleos nos meios de cultura à base de água (HOLLEY E PATEL, 2005). Gutierrez et al. (2009) compararam as CIMs

de diversos óleos essenciais, contra diferentes espécies microbianas, obtidas por três métodos de ensaio: diluição em caldo, diluição em ágar e difusão em ágar. Não observaram diferença significativa das CIMs dos ensaios por diluição. Todavia, elas foram significativamente mais baixas do que as determinadas pelo método de difusão. Neste trabalho, os resultados obtidos com ambas as metodologias (difusão em ágar e diluição em caldo) seguiram a mesma tendência, isto é, espécies Gram-positivas mais sensíveis que as Gram-negativas e valores diferentes foram obtidos entre os dois ensaios realizados. Observa-se (Tabela 1) que a CIM para *L. innocua* foi o dobro da CIM de *L. monocytogenes* e o quádruplo da CIM de *S. aureus*. Essa ordem de grandeza não foi observada nos diâmetros dos halos de inibição. As CIM das espécies Gram-negativas também apresentaram diferenças em relação à sensibilidade das espécies microbianas ao óleo, quando comparadas com as medidas dos halos. Esses resultados reforçam a importância da utilização de mais de um método de avaliação na determinação da atividade antimicrobiana de um produto ou de uma substância.

Os valores das CIM obtidas com o óleo de *C. citratus* neste estudo são comparáveis aos relatados para outros óleos essenciais de plantas (SANDRI et al., 2007; SARTORATTO et al., 2004), indicando que o óleo essencial dessa espécie pode ser visto como potencial agente antimicrobiano para o controle de espécies bacterianas importantes em alimentos.

Conclusão

O óleo essencial de *C. citratus* tem atividade antimicrobiana contra os agentes patogênicos de origem alimentar e bactérias associadas à deterioração de alimentos.

Referências

ANVISA. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico**: norma aprovada. 6.ed. 2003b (NCCLS. Document, M7-A6, v.23, n. 2.). Uma norma de aplicação global desenvolvida mediante o processo consensual do NCCLS. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_publicacoes_bac_cresc.pdf> . Acesso em: 26 nov.2012

ANVISA. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**: norma aprovada. 8. ed. 2003a. (NCCLS. Document, M2-A8, v. 23 n.1.) Norma de aplicação global desenvolvida através do processo consensual do NCCLS. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_disco_difusao.pdf > . Acesso em: 26 Nov. 2012 .

BAKKALI. F.; AVERBECK. S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n.2, p. 446–475, 2008.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SIMIN, N.; ANACKOV, G. Characterization of the volatile composition of essential oil of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v.54, n.5, p.1822-1828, 2006.

BRANDL, M. T. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.44, p.367-392, 2006.

BURT, S. A. **Antibacterial activity of essential oils**: potential applications in food. 2007. 136f. thesis (Ph.D.) - Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Veterinary Public Health. Utrecht University. Utrecht.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.94,n.3, p.223-253, 2004.

CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.; ALENCAR, J.W.A. simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. **Journal of Chemical Education**, Easton, v.53, n.10, p.652, 1976.

DEMETZOS, C.; PERDETZOGLU, D. K. Composition and antimicrobial studies of the oils of *Origanum calcaratum* Juss. and *O. scabrum* Boiss et Heldr from Greece. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v.13, n.6, p.460 – 462, 2001.

FERREIRA, M.S.C., FONTELES, M.C. Aspectos etnobotânicos e farmacológicos do *Cymbopogon citratus* Stapf (capim-limão). **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 4, p. 94-97, 1989.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Amesterdam, v.113, n.1, p. 1-15, 2007.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, London,, v. 26, n.2, 142–150, 2009.

HOLLEY, R.A., PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, London, v.22, n.4, p.273-292, 2005.

O'BRIEN, T. F. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: How use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.34, n.3, p.S78–84, 2002.

ONAWUNMI, G.O.; YISAK, W.A.B.; OGUNLANA, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.12, n.3, p.279-286, 1984.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, Barking, v.73, n.2, p.236-244, 2006.

SANDRI, I. G.; ZACARIA, J.; FRACARO, F.; DELAMARE, A. P. L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. **Food Chemistry** London, v.103, n.3, p. 823-828, 2007.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMEINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, 275-280, 2004.

SANTOS, I.; CUNHA, I. Patogénicos emergentes em alimentos. **Segurança e Qualidade Alimentar**, Lisboa, n.2, p.10 – 13, 2007.

SHELZ, Z.; MOLNAR, J.; HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Fitoterapia**, Milano, v.77, p. 279-285, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness**. 2007. (WHO. Fact sheet, 237). Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em: 26 nov. 2012.

Embrapa

Agroindústria Tropical

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA