

# DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Cymbopogon flexuosus* contra *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*

K. A. DALLA COSTA<sup>1</sup>, M. FERENZ<sup>2</sup>, S. M. da SILVEIRA<sup>2</sup>, R. MOURA<sup>2</sup>, A. F. MILLEZI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

<sup>2</sup> Instituto Federal Catarinense

E-mail para contato: karinedallacosta@hotmail.com

**RESUMO** – O objetivo deste estudo foi determinar a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial (OE) obtido das folhas de *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão da Índia Oriental). A atividade antimicrobiana foi desenvolvida contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 a fim de iniciar estudos para o desenvolvimento de um detergente-sanificante. A eficiência do OE foi detectada pelo método da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em três repetições. A atividade antioxidante do OE foi avaliada pelo consumo do radical livre DPPH comparado com os antioxidantes sintéticos BHT e ácido gálico. Foram testadas oito concentrações do OE, partindo de 3,9 à 1000 $\mu$ L mL<sup>-1</sup>. Os resultados apontaram ação contra *L. monocytogenes*, com valores de CMI e CMB de 3,9 $\mu$ L mL<sup>-1</sup> apresentando atividade antimicrobiana satisfatória, devido esta ser a menor concentração testada. Nenhuma das concentrações testadas foi eficiente para inibir *P. aeruginosa*. Avaliando o combate a radicais livres verificou-se excelente eficiência em todas as concentrações do OE analisadas, demonstrando grande potencial antioxidante. Esses resultados refletem eficiente atividade antioxidante e antimicrobiana do OE de *Cymbopogon flexuosus* contra *L. monocytogenes* indicando o possível uso na formulação de alimentos e/ou solução detergente-sanificante.

**Palavras-chave:** antimicrobiano natural, antioxidante natural, bactérias patogênicas, capim-limão.

DOI: 10.5965/24473650312017003

## 1. INTRODUÇÃO

Microrganismos presentes nos alimentos podem causar alterações químicas prejudiciais, além de representarem risco à saúde da população (FRANCO, LANDGRAF, 2006). Embora existam inúmeros antimicrobianos sendo desenvolvidos no mercado nos últimos anos, observa-se em

contrapartida a crescente resistência microbiana a estas substâncias (SILVA, 2010).

As alterações nos alimentos também podem estar relacionadas com a rancidez oxidativa, principal responsável por alterações indesejáveis de cor, sabor, aroma e consistência do alimento. A oxidação lipídica envolve complexas reações químicas, levando à formação de radicais livres que em excesso podem causar um efeito tóxico ao organismo. Uma substância antioxidante pode minimizar este processo (RIBEIRO, SERAVALLI, 2007).

Em função de alguns antioxidantes e antimicrobianos sintéticos serem alvos de questionamentos quanto à inocuidade, demonstrando a possibilidade de desencadear alguma complicação à saúde do consumidor (WURTZEN, 1990) existem buscas crescentes por compostos antioxidantes e antimicrobianos naturais, principalmente os provenientes de espécie vegetais (Sousa *et al.*, 2007).

Desta maneira, plantas ricas em óleos essenciais podem ser utilizadas nos alimentos a fim de conferir sabor, aroma e pungência, destacando-se ainda propriedades antioxidantes, antimicrobianas e nutricionais. Além dos efeitos diretos, a utilização dessas plantas pode levar a efeitos secundários mais complexos, como a prevenção da deterioração dos alimentos (PETER, 2004).

O objetivo deste estudo foi determinar a atividade antimicrobiana e antioxidante do OE obtido das folhas de *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão da Índia Oriental).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no laboratório de Microbiologia de Alimentos e Bromatologia localizado no Instituto Federal Catarinense campus Concórdia, SC.

A atividade antimicrobiana foi desenvolvida contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 a fim de iniciar estudos para o desenvolvimento de um detergente-sanificante. A eficiência do OE foi detectada pelo método da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) descrito por NCCLS/CLSI (2003), com adaptações. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em três repetições, os resultados foram expressos em  $\mu\text{L mL}^{-1}$ .

Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do óleo puro e então diluídos sucessivamente nas concentrações de 50  $\text{mg mL}^{-1}$  a 0,39  $\text{mg mL}^{-1}$ , em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 0,5% de tween 80.

Posteriormente adicionou-se 90  $\mu\text{L}$  do meio de cultura BHI e por fim 10  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana ajustada a uma concentração de aproximadamente  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

Em cada linha, foram mantidos controles de esterilidade e controles de crescimento. As placas foram incubadas a 36 °C por 18h - 24h sendo que o crescimento microbiano foi detectado visualmente pela adição de 20  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% (m/v), com incubação adicional de 1 hora, à mesma temperatura.

A concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos foi determinada a partir das placas utilizadas para a determinação da CMI, através de metodologia descrita por Silveira (2012). De cada poço onde não ocorreu crescimento microbiano, foram transferidos 10 $\mu\text{L}$  para placas de Ágar Triptona de Soja (TSA). As placas foram incubadas a 36°C por 24h e o crescimento de colônias foi verificado. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em  $\text{mg mL}^{-1}$ .

Tanto a CMI quanto a CMB foi definida como a menor concentração do OE capim limão que impediu totalmente o crescimento microbiano nas placas.

A atividade antioxidante do OE foi avaliada pelo consumo do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-

picrilhidrazil), utilizando os antioxidantes sintéticos BHT e ácido gálico como controle positivo, metodologia esta adaptada de Brand-Williams *et al.* (1995).

Foram testadas oito concentrações do OE, partindo de 3,9 à 1000 $\mu\text{L mL}^{-1}$ . Posteriormente da realização da diluição do OE, iniciou-se o teste da potencialidade antioxidante de cada concentração: foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de cada concentração do OE e 180  $\mu\text{L}$  de DPPH, totalizando 200  $\mu\text{L}$  em cada poço da placa de 96 poços. A mistura foi incubada a 25 °C por 30 minutos em ausência de luz. O decréscimo da absorbância de cada solução foi medido a 490 nm. A capacidade de sequestro de radical DPPH foi calculada de acordo com a equação: Capacidade de sequestro de radical DPPH (%) =  $[(A_0 - A_1)/A_0]100$ , onde  $A_0$  é a absorbância do controle e  $A_1$  é a absorbância na presença do óleo. A análise foi realizada em triplicata e o valor apresentado como a média ( $\pm$  desvio padrão).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados apontaram ação contra *L. monocytogenes*, com valores de CMI e CMB de 3,9  $\mu\text{L mL}^{-1}$  apresentando atividade antimicrobiana satisfatória (Figura 1), devido esta ser a menor concentração testada. Nenhuma das concentrações testadas foi eficiente para inibir *P. aeruginosa*, então foi realizada a contagem das células da maior concentração (500 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) em comparação com o controle positivo, no qual se obteve redução de células viáveis de 1,6 CFU Log 10  $\text{mL}^{-1}$ .

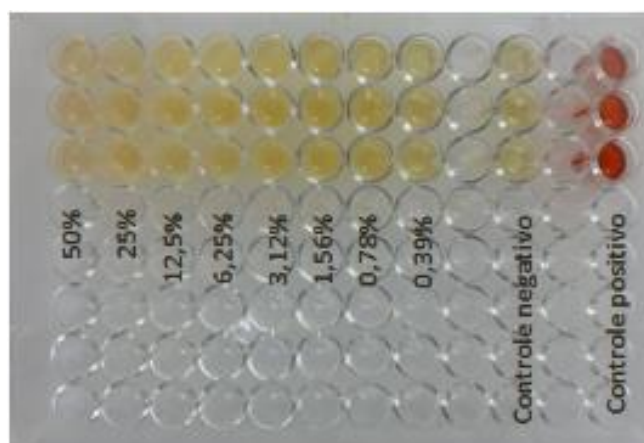


Figura 1 – Resultados Concentração mínima inibitória de *L. monocytogenes*.

Essa ação antimicrobiana eficiente para *L. monocytogenes* pode ser devido a hidrofobicidade do OE, pois são facilmente difundidos pela parede celular dos microrganismos e causam danos à membrana, principalmente no que diz respeito à fluidez e permeabilidade (MILLEZI *et al.*, 2012). Portanto, os óleos essenciais, inclusive o de capim limão, têm maior atividade frente a bactérias Gram-positivas. As Gram-negativas são mais resistentes devido à maior complexidade da sua membrana plasmática, que atua como uma barreira à difusão dos componentes hidrofóbicos dos óleos essenciais (NAIK *et al.*, 2010).

Para avaliar a atividade antioxidante por meio da captura de radicais livres já formados foi utilizado o método de habilidade de sequestro do radical DPPH•. Na Figura 2 pode-se observar o comportamento da atividade antioxidante em relação as nove concentrações testadas do óleo

essencial.

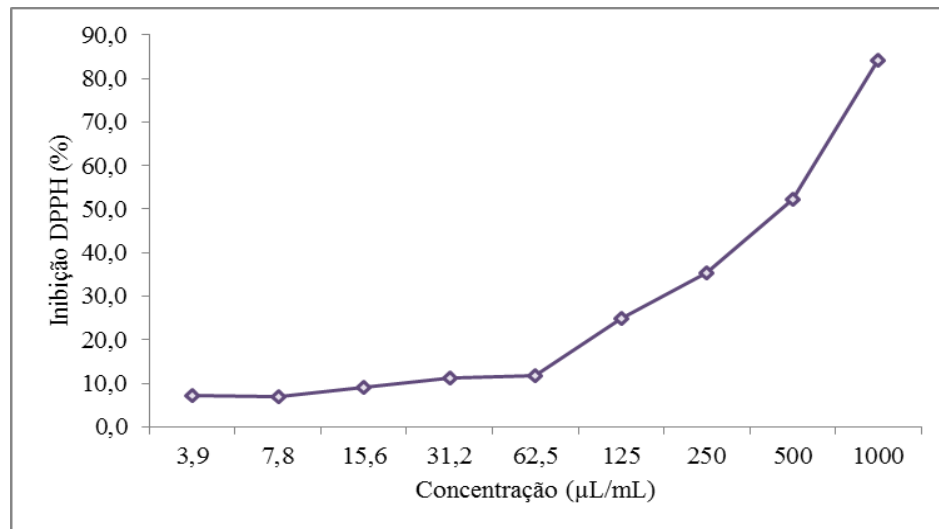


Figura 2 – Porcentagem de atividade antioxidante do óleo essencial estudado.

Nas Figuras 3 e 4 está demonstrando o comportamento da concentração dos antioxidantes sintéticos BHT e Ácido gálico, respectivamente em cada diluição do OE. Observa-se que em todas as concentrações a habilidade de reduzir o DPPH das substâncias sintéticas foi muito superior quando comparado ao óleo capim-limão do estudo. Além disso, verificou-se uma elevação da concentração dos antioxidantes sintéticos nas concentrações menores do OE quando comparada aos antioxidantes padrões, este desempenho deve ser estudado futuramente.

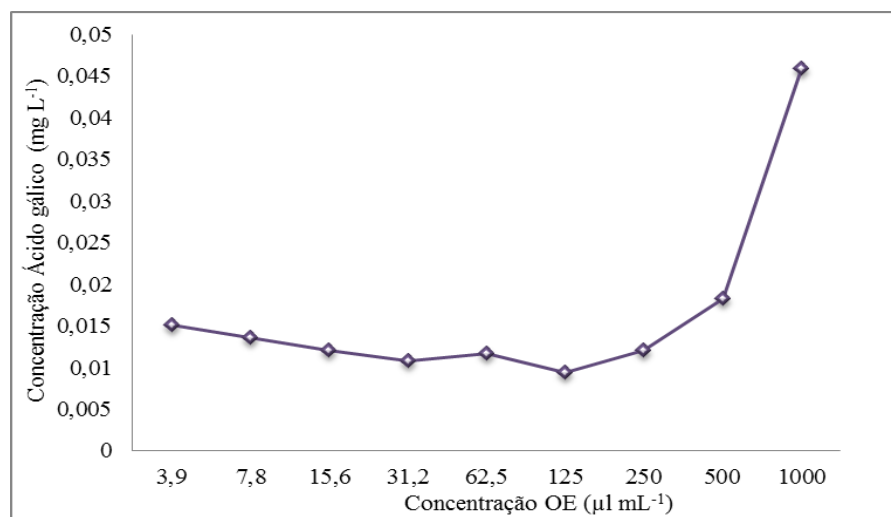


Figura 3 – Concentração do ácido gálico em cada diluição do óleo Capim limão.

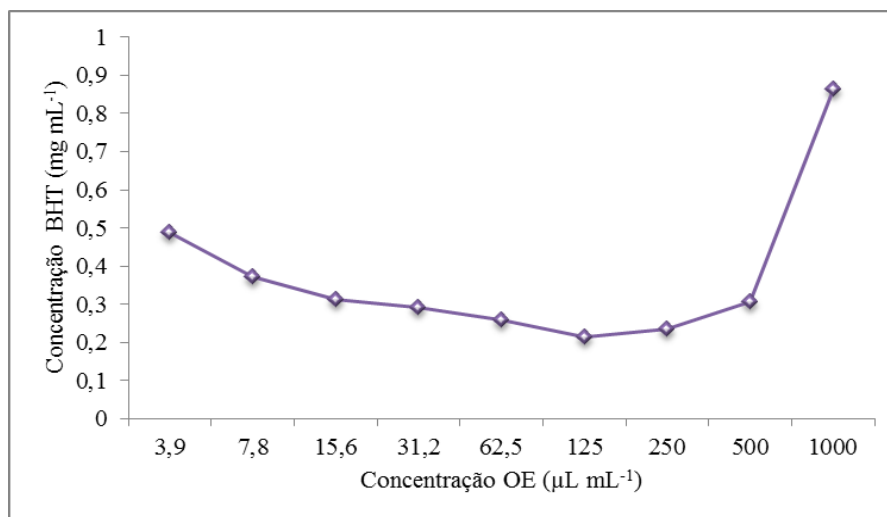


Figura 4 – Concentração do BHT em cada diluição do óleo Capim limão.

O potencial de sequestro do radical DPPH• é baseado na redução deste radical em solução metanólica pelo antioxidante doador de hidrogênio (AH) ou por um radical (R•), como na reação: DPPH•+ AH DPPH-H + A• ou DPPH•+ R• DPPH. Com o DPPH restante desta reação é calculado o IC50 (quantidade suficiente para inibir 50% do DPPH) que corresponde à atividade inversa do potencial de captura do radical, ou seja, quanto menor o IC50 melhor é o potencial antioxidante da amostra testada (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

Neste estudo, o óleo essencial testado apresentou IC50 de  $6,52 \mu\text{L mL}^{-1} \pm 0,6813$  obtendo melhor atividade antioxidante quando comparado a espécies do mesmo gênero. Selin (2011) observou em seus estudos IC50 de  $998,47 \text{ mg mL}^{-1} \pm 67,65$  para *Cymbopogon proximus Stapf*, já Scherer e seus colaboradores (2009) verificaram valores de  $7,8 \mu\text{L mL}^{-1} \pm 0,65$ ,  $743 \mu\text{L mL}^{-1} \pm 18$  e nenhuma habilidade de redução de DPPH para óleo de cravo (*Caryophyllus aromaticus L.*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e palmarosa (*Cymbopogon martinii*), respectivamente.

Percebe-se proximidade entre os valores encontrados de IC50 do óleo deste estudo e o óleo de cravo relatado por Scherer *et al.* (2009). Segundo Scherer *et al.* (2009), esta ação antioxidante é provavelmente devido ao elevado teor de eugenol presente na composição do óleo.

#### 4. CONCLUSÃO

Esse estudo refletiu potencial antioxidante e atividade antimicrobiana do OE de *Cymbopogon flexuosus*, exceto a espécie bacteriana *P. aeruginosa*, indicando o possível uso na formulação de alimentos e/ou solução detergente-sanificante. Trabalhos futuros direcionam estudos de ação antimicrobiana e antioxidante de outras substâncias e outros microrganismos de interesse em alimentos bem como a realização de testes em matrizes alimentares e detergentes-sanificantes para comprovar a eficácia.

## 5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia.

## 6. REFERÊNCIAS

- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v. 28, p. 25-30, 1995.
- FRANCO, B. D. G. M. E LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.
- MILLEZI, F. M; PEREIRA, M. O.; BATISTA, N. N.; CAMARGOS, N.; AUAD, I.; CARDOSO, M. D. G. E PICCOLI, R. H. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. *Journal of Food Safety*, v. 32, p. 351–359, 2012.
- NAIK, M.I.; FOMDA, B.A.; JAYKUMAR, E.; BHAT, J.A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 1, n.1, p. 535-538, 2010.
- NCCLS/CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 6ª edição, 2003.
- PETER, K. V. Handbook of herbs and spices. *Woodhead Publishing Limited*, v. 2, 2004.
- RIBEIRO, E.P E SERAVALLI, E.A.G. Química de alimentos. *Edgard Bllucher*, 2ª edição, 2007.
- SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T.. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.
- SELIM, S. A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extract of the Egyptian lemongrass *Cymbopogon proximus* Stapf. *Grasas Y Aceites*, v. 62 (1), p. 55-61, 2011.
- SILVA, P. Farmacologia. *Guanabara Koogan*, 8ª edição, 2010.
- SILVEIRA, S. M., *Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (L. nobilis) como agente conservador natural em embutido cárneo frescal*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2012, 215 p.

- SOUSA, C. M. DE M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M. J.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. DA; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. DE M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- WURTZEN, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. *Food Chemistry and Toxicology*, v. 28, p. 743-745, 1990.