



Área: Ciência de Alimentos

EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA, CAPIM-LIMÃO E GUAMIRIM E AÇÃO FRENTE A *Listeria monocytogenes*

Bárbara Biduski, Lára Franco dos Santos, Letícia Pierdoná, Luciana Ruschel dos Santos, Vera Maria Rodrigues, Kátia Bitencourt Sartor*

Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS

*E-mail: 166367@upf.br

RESUMO – A *Listeria monocytogenes* é encontrada na natureza e no trato intestinal dos animais, logo, é comum a contaminação da carcaça e cortes de carne durante o abate e o processamento. Este microrganismo é considerado um patógeno emergente, podendo ocasionar listeriose em humanos através da ingestão de alimentos contaminados com o mesmo. A listeriose é uma zoonose de grande importância em Saúde Pública, visto que pode ocasionar aborto, septicemias e meningites. Sua importância em alimentos está relacionada com a sua capacidade de resistir a temperaturas de refrigeração, alta ocorrência em alimentos e diversos surtos de listeriose envolvendo ingestão de alimentos manipulados inadequadamente ou mal cozidos. Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação dos óleos de canela, capim-limão e guamirim de inibir frente a bactéria *Listeria*. CO₂ em estado supercrítico foi utilizado para a extração dos óleos. As pressões utilizadas nas extrações dos óleos de guamirim, capim-limão e canela foram 250 bar, 90 bar e 300 bar, respectivamente. Para todas as matérias primas utilizou-se 50°C como condição experimental. Atingiu-se 1,18% de rendimento na extração do guamirim, 1,07% do óleo de canela e 0,37% no capim-limão. Através de análise no FTIR podemos observar os grupos funcionais de eugenol, naringina e citral, para os óleos de canela, guamirim e capim-limão, respectivamente. A capacidade antimicrobiana dos óleos não pode ser comprovada devido à contaminação cruzada na hora de realizar os testes. Entretanto percebeu-se grande potencial de estudo nestes óleos e nos seus compostos.

Palavras-chave: Antimicrobiano; Supercrítico; FTIR.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína de acordo com Associação Brasileira de Proteína Animal e possui as cadeias produtivas mais avançadas do mundo, e rígido controle de processos para produzir uma carne com padrões de qualidade elevados (ABPA, 2018). Existem diferentes programas focados na preservação da qualidade e da sanidade, como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPPCC), Boas Práticas de Fabricação (BPFs) e Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO).

Para uma avaliação microbiológica consistente, que apoie e fundamente o APPCC, frequentemente realizam-se avaliações de crescimento de microrganismos indicadores de qualidade, tais como, a contagem de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* e coliformes totais. Faz-se necessária também, a detecção de microrganismos patogênicos como a *Listeria monocytogenes* (CESAR *et al.*, 2011) e a *Salmonella monocytogenes* (TEIXEIRA, 2006), que são bactérias comumente encontradas como contaminantes em carne suína.

A *L. monocytogenes* tem se mostrado resistente a processos comuns de desinfecção como aplicação de etanol, peróxido de hidrogênio e cloreto de sódio. Além disso, enfrenta-se nos últimos anos o agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas (LIMA *et al.*, 2019). Diante disso e da dificuldade do controle da proliferação bacteriana em instalações da indústria alimentícia, tem-se buscado alternativas de controle, o uso de óleos essenciais tem sido apontado como promissor para inibir a proliferação desses microrganismos patogênicos (SOUZA, TEBALDI, PICCOLI, 2015).

Os diferentes componentes químicos apresentados pelos óleos essenciais controlam a oxidação de alimentos e agem de maneira eficaz contra bactérias que apresentam grande resistência, tais como *Salmonella Cholerasuis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. (MIRANDA *et al.*, 2016). Assim, este trabalho teve como objetivo a obtenção de óleos essenciais de fontes vegetais através da extração super crítica e avaliar o uso destes frente microrganismos patogênicos

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AQUISIÇÕES E PREPARO DAS AMOSTRAS



Para a realização dos procedimentos experimentais foram utilizadas folhas de Capim-limão (*Cymbopogon citratus*), casca da Canela (*Cinnamomum verum*) e folhas de Guamirim (*Myrcia oblongat*).

As folhas de Capim-limão foram colidas no município de Sarandi- RS, a casca de Canela foi adquirida em uma loja de produtos naturais (Sabor Natural) localizada no município de Sarandi-RS e as folhas de Guamirim foram colidas no município de Erechim-RS.

As amostras de Capim-limão e de Guamirim foram secas em secador com circulação de ar a 50°C. Após foram moídas, em moinho de facas e padronizadas nas granulometrias de 24 a 200 Mesh, usando peneiras Tyler. A casca da Canela passou apenas pelo processo de trituração e padronização de granulometria, pois já se encontrava seca.

2.2 CONDIÇÃO EXPERIMENTAL

Tendo como base a literatura, (CARLSON *et al.*, 2001; TALANSIER *et al.*, 2008) estipularam-se as variáveis para o processo de extração como apresentado na Tabela 1. Fixou-se parâmetros de vazão de CO₂ de 1 L/min., tempo estático de 30 min., temperatura de extração igual a 50°C e período de extração de 1 hora para cada uma das matérias primas.

Tabela 1- Variáveis pressão e massa em vazão de CO₂ constante de 1 L/min.

Matéria Prima	Peso Matéria prima inicial (g)	Pressão (Bar)
Guamirim	75	250
Capim-limão	85	90
Canela	64	300

Fonte: Autor, 2021.

O rendimento dos óleos extraídos foi calculado em relação à quantidade de soluto extraível presente na matriz sólida referente a uma dada temperatura e pressão de extração. Relacionou-se a massa total do extrato e a massa de alimentação de matéria prima em base seca (g), conforme Equação 1, expressa em porcentagem (%).

$$X_o = \frac{\text{massa}_{\text{extrato}}}{\text{massa}_{\text{matéria prima}}} \times 100 \quad (1)$$

Sendo X_o igual a rendimento de óleo obtido.

A massa de extrato obtida nos frascos foi medida em balanças analíticas e armazenadas congeladas até a utilização.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS EXTRAÍDOS

Os óleos essenciais foram caracterizados utilizando a Espectroscopia de Infravermelhos (IR) com transformadas de Fourier. Para a obtenção dos espectros foi empregado 4mg de cada amostra, o comprimento de onda foi de 650 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹ e o modelo do equipamento utilizado foi Agilent Cary 630 FTIR.

2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada através da técnica de difusão em disco (CLSI, 2015). Foram utilizados isolados de *Listeria monocytogenes* cedidos pelo laboratório de Microbiologia do CEPA (Centro de Pesquisa em Alimentação) da Universidade de Passo Fundo. Os microrganismos encontravam-se armazenados em freezer a -20°C. Todos os isolados foram reativados utilizando um meio de enriquecimento não seletivo.

As cepas de *Listeria* foram suspensas em BHI obtendo a concentração de 10⁸ UFC.g⁻¹ (0,5 McFarland). Ao alcançar esta concentração, o inóculo foi semeado com uma alça de Drigalski estéril na superfície de placas com Agar Mueller-Hinton.

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) transferiu-se alíquotas de 1 mL dos óleos para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada, obtendo-se a primeira diluição (10⁻¹). A partir da diluição inicial, efetuou-se as demais diluições em água peptonada, obtendo-se as diluições 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ mL. (CLSI, 2015).

Uma alíquota de 10 µL de óleo puro e de cada diluição foi adicionada nos discos, deixando em repouso durante 1 hora para a absorção. Posteriormente, os discos foram colocados sobre as placas já inoculadas e estas, incubadas a 37 °C. Após 48 horas foi avaliada a existência de halos de inibição.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento dos óleos extraídos está apresentado na Tabela 2. Podemos observar que os óleos essenciais de guamirim, seguido do de canela apresentaram os melhores rendimentos, vários parâmetros afetam potencialmente o



processo de extração como a temperatura, pressão, vazão, tempo de extração e tamanho de partícula (BASERI; HAGHIGHI-ASL; LOTFOLLAHI, 2010).

Tabela 2 – Rendimento dos Óleos extraídos

Matéria Prima	Pressão (Bar)	Massa matéria prima (g)	Massa Extrato (g)	Rendimento (%)
Canela	250	64	0,6894	1,07
Capim-limão	90	85	0,3165	0,37
Guamirim	300	75	0,885	1,18

Fonte: Autor, 2021.

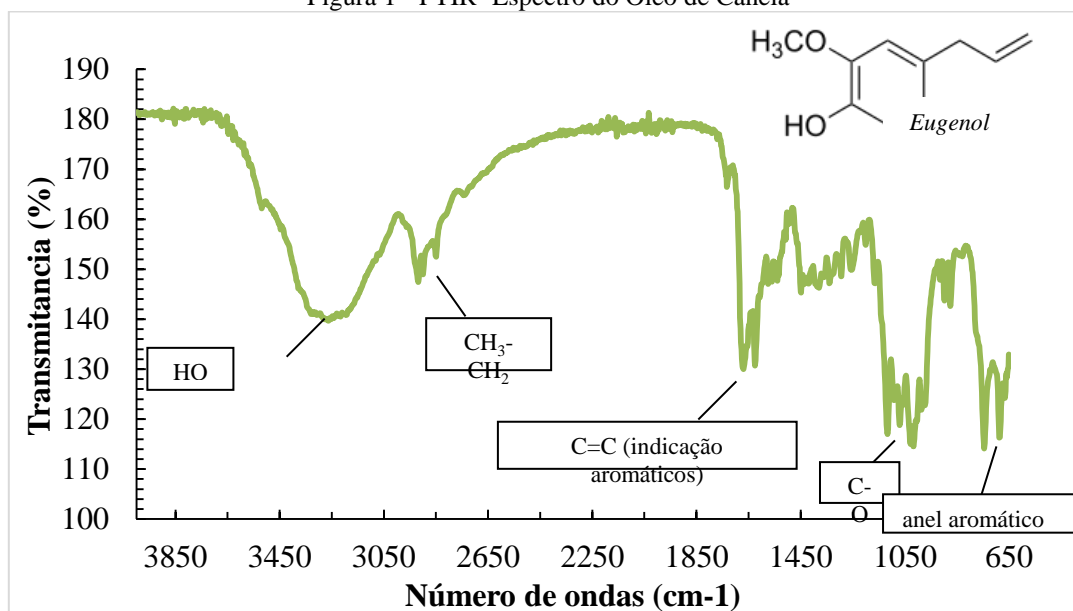
O rendimento do óleo essencial de capim-limão foi o menor, todas as variáveis estudadas podem interferir no rendimento do processo. Além disso, por se tratar de plantas, a quantidade de óleo encontrada em cada uma varia de acordo com o local onde foram plantadas e em que condições se desenvolveram.

Outro parâmetro importante para avaliação dos óleos essenciais, é identificação de quais compostos foram extraídos, o espectro infravermelho é capaz de fornecer a informação estrutural das moléculas presentes nos óleos. As absorções de cada tipo de ligação são, em geral, encontradas apenas em pequenas regiões do infravermelho vibracional. Uma pequena faixa de absorção pode ser definida para cada tipo de ligação. Uma absorção na faixa $3000 \pm 150 \text{ cm}^{-1}$ quase sempre se deve à presença da ligação C-H na molécula; uma absorção na faixa $1715 \pm 150 \text{ cm}^{-1}$ normalmente deve à presença da ligação C=O (grupo carbonila).

Observando os gráficos gerados a partir da análise dos óleos essenciais de canela, guamirim e capim-limão é possível verificar alguns comprimentos de onda referentes a grupos funcionais que indicam a presença de diferentes compostos.

O espectro exibido na Figura 1 apresenta as ligações químicas presentes no óleo de canela. As principais absorções foram em 3296 cm^{-1} característica de deformação axial de OH; 2931 cm^{-1} como deformação axial assimétrica de $-\text{CH}_2$; 2875 cm^{-1} como deformação axial de $-\text{CH}_2$; 1675 cm^{-1} , caracterizando deformação axial de C=C, sendo confirmada pela banda em 898 cm^{-1} , que indica a deformação angular fora do plano de =CH, característico de deformação axial de C=C de anel. O espectro obtido mostrou-se muito semelhante ao do padrão de eugenol obtido por Pouchert (1981), portanto é possível afirmar que este era o composto majoritário no óleo de canela obtido.

Figura 1 - FTIR- Espectro do Óleo de Canela

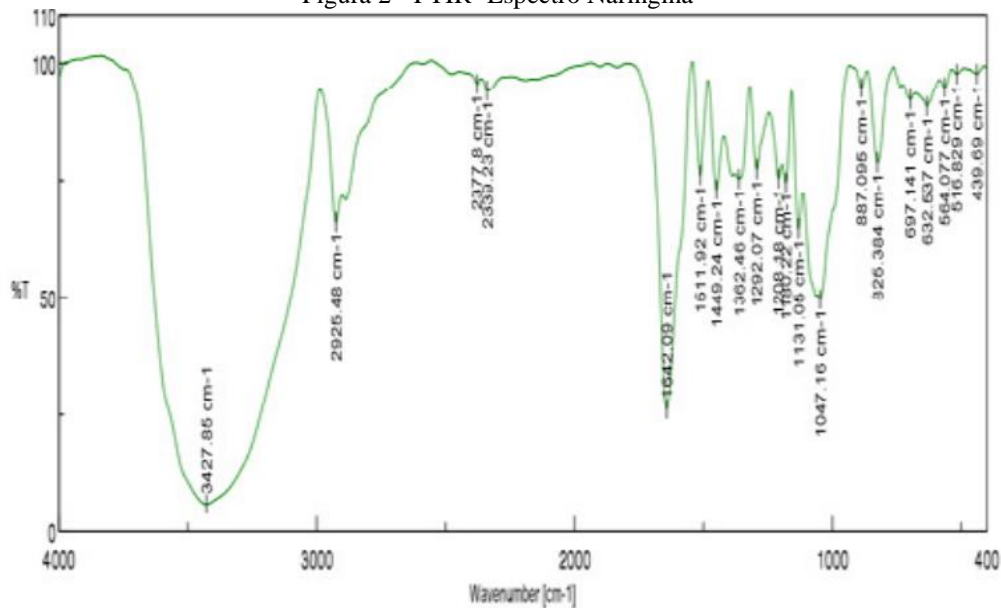


Fonte: Autor, 2021

A extração do óleo essencial de guamirim é recente e não há muitos estudos que avaliem os seus compostos. Mas Agostin *et.al.* (2017), identificaram que os principais compostos presentes no guamirim são a vitexina e naringina. Malathy e Iyer (2018) realizaram a Espectroscopia de Infravermelhos com transformadas de Fourier do composto naringina (Figura 2) e comparando com o espectro obtido do óleo extraído neste trabalho (Figura 3), verifica-se semelhanças nos picos, confirmando assim a presença majoritária deste composto.

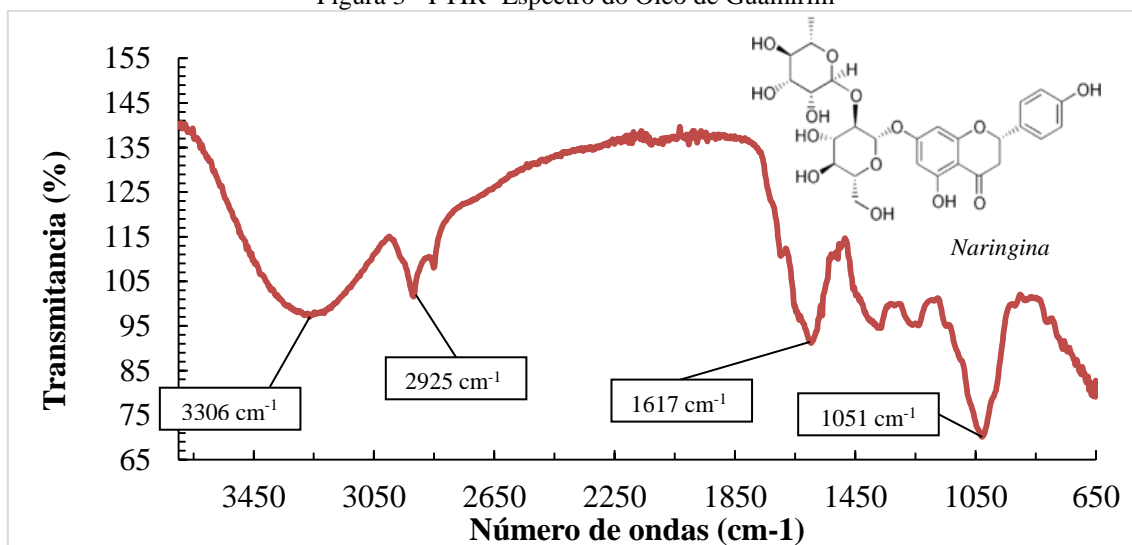


Figura 2 - FTIR- Espectro Naringina



Fonte: MALATHY; IYER (2018)

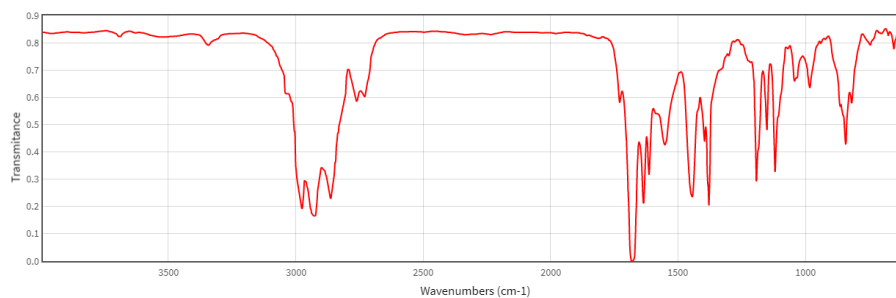
Figura 3 - FTIR- Espectro do Óleo de Guamirim



Fonte: Autor, 2021

Pinto et al. (2014) observa que o principal composto do capim-limão é o citral, podemos observar isso através dos espectros apresentados nas Figuras 4 e 5, comparando os picos entre o espectro do citral e do óleo extraído.

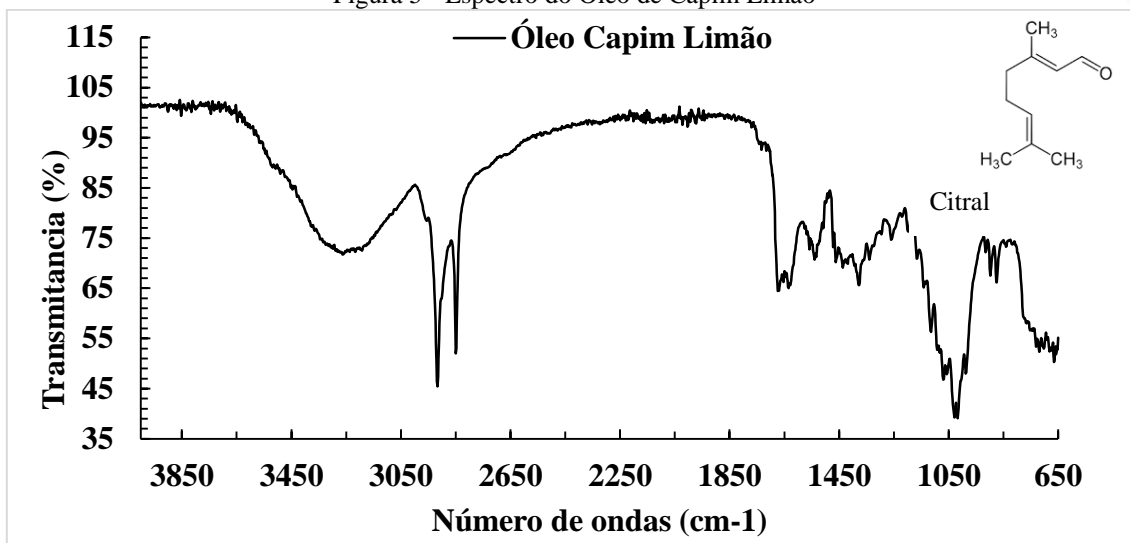
Figura 4 - Espectro do composto Citral



Fonte: COBLENTZ, 2018



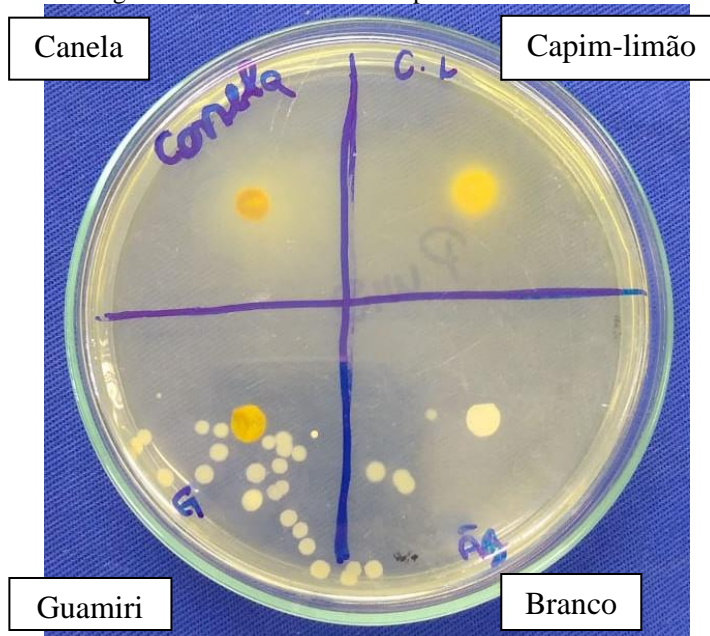
Figura 5 - Espectro do Óleo de Capim Limão



Fonte: Autor, 2021

Avaliou-se a atividade antibacteriana dos óleos essenciais da canela, capim-limão e guamirim frente a *Listeria*, por meio da técnica de difusão em disco, observando-se expressiva inibição e/ou ausência de crescimento microbiano nos discos com óleo puro para os óleos de canela e capim-limão (Figura 9). Posteriormente, avaliou-se a preditividade de uma técnica oficial de isolamento desta bactéria, utilizando uma solução experimental em caldo BHI (Brain Heart Infusion), contaminada com $1,5 \times 10^7$ UFC/mL dos microrganismos em estudo. Verificou-se a ausência de isolamento desta bactéria em alíquotas de 25 mL, após períodos de 24, 48 e 72 h de incubação a 36°C, comprometendo a Validade Preditiva dos Resultados Negativos (VPR-) do teste, apresentando contaminação cruzada durante o procedimento. Sugere-se, que investigações sejam pertinentes à complexidade crescente do sistema de alimentação e nutrição.

Figura 6 - Placa com os óleos puros e com o branco



Fonte: Autor, 2021

4 CONCLUSÃO

Através das extrações realizadas, percebe-se que melhores condições de extração podem ser estudadas para tentar atingir maiores quantidades de óleos com a mesma quantidade de massa. Pra melhor caracterizar os óleos e conseguir identificar os compostos específicos que atuam no combate aos microrganismos é preciso realizar uma



análise cromatográfica. Entretanto com a análise de FT-IR já é possível identificar os compostos majoritários presentes nos óleos e supor qual será a sua atividade antimicrobiana. Como componente majoritário da canela, encontrou-se o composto eugenol. Identificou-se que o composto principal do capim-limão foi o citral e o do guamirim foi a naringina.

Para trabalhos futuros sugere-se a criação de modelos matemáticos para otimizar a extração dos óleos, caracterizar os óleos através de análises cromatográficas, e efetuar a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos novamente, pois percebeu-se grande potencial destes para inibir o crescimento de diferentes microrganismos.

5 REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, F. et al. Otimização de um método por CLAE-UV para análise de compostos fenólicos em *Myrcia oblongata* DC., *Passiflora caerulea* L. e *Equisetum giganteum* L. **L. Scientia Chromatographica**, v. 9, p. 180-193, 2017.
- Associação Brasileira de Proteína Animal (Org.). **Suinocultura**: Resumo do Setor de Suínos. 2018. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/resumo>>. Acesso em: 06 set. 2018.
- BASERI, H.; HAGHIGHI-ASL, A.; LOTFOLLAHI, M. N. Effects of operating parameters on the cinnamaldehyde content of extracted essential oil using various methods. **Chemical Engineering & Technology**. v. 33, n.2, p.267-274, 2010.
- CARLSON, Luiz Henrique Castelan et al. Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. **Journal Of Supercritical Fluids**. Florianópolis, p. 33-39. mar. 2001.
- CESAR, A. P. R. et al. **Listeria spp. e Listeria monocytogenes na produção de salsichas tipo hot dog**. **Ciência Animal Brasileira**, Goiás, v. 12, n. 2, nov. 2011.
- CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved Standard Eleventh Edition. 32. (2015).
- COBLENTZ SOCIETY COLLECTION (C) 2018 copyright by the U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America. All rights reserved.
- LIMA, C. V. R. et al. Ação antibacteriana do óleo essencial das folhas de aroeira frente a patógenos multirresistentes. **Diversitas Journal**, v. 4, n. 1, p. 242-252, 2019.
- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. **Revista Ciência Agronômica**, [s.l.], v. 47, n. 1, 2016.
- POUCHERT, C. J. **The Aldrich library of infrared spectra**. Milwaukee: Aldrich Chemical, 1981.
- MALATHY, S.; IYER, P. R. Naringin Loaded Chitosan Nanoparticle for Bone Regeneration: A Preliminary in vitro Study. **Journal Of Nanomedicine & Nanotechnology**, [s.l.], v. 09, n. 04, 2018. OMICS Publishing Group.
- SOUZA, E. R. N.; TEBALDI, V. M. R.; PICCOLI, R. H. **Adaptação e adaptação cruzada de Listeria monocytogenes aos compostos eugenol e carvacrol**. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Lavras, v. 17, n. 4, out/dez. 2015. Trimestral.
- TALANSIER, E. et al. Supercritical fluid extraction of vetiver roots: A study of SFE kinetics. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 2, p. 200-208, 2008.
- TEIXEIRA, S. R. **Deteção de Salmonella spp. em amostra de fezes, linfonodos e carcaças de suínos no momento do abate**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.