

ESTUDO PRELIMINAR DO EFEITO DO CONGELAMENTO DA MATRIZ NO RENDIMENTO DA OBTENÇÃO E NAS CAPACIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM LIMÃO

E.S. Oliveira¹, T.G. Subeldia¹, R.A.B. Nunes¹, D.S.V. Maia¹, D. Maus¹, M.V. Silva¹

1 – Curso Superior de Tecnologia em Agroindústria – Instituto Federal Farroupilha, Campus Alegrete – CEP: 97555-000 – Alegrete – RS – Brasil, Telefone: 55 (55) 3421-9600 – e-mail: (marcos.vieira@iffarroupilha.edu.br)

RESUMO – Matrizes vegetais fontes de óleos essenciais (OE) devem ser colhidas nas primeiras horas do dia, e seguir para o processo de extração, demandando boa logística. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do congelamento do capim limão sobre o rendimento volumétrico de OE, e algumas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Os OE do capim limão fresco (OEF) e congelado (OEC) foram analisados quanto às capacidades antimicrobiana contra bactérias *S. aureus* e *S. typhimurium*, e antioxidante pela redução de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]). Os rendimentos volumétricos de OEF e OEC foram de 2,40 mL/kg e 2,54 mL/kg (em base seca). Ambos OE foram mais efetivos contra *S. typhimurium*, e apresentaram capacidade antioxidante semelhantes ($p > 0,05$). O conjunto de resultados sugere que o congelamento pode ser utilizado para armazenar o capim limão, sem prejuízo em relação às respostas avaliadas.

ABSTRACT – Vegetable matrices that are sources of essential oils (EO) must be harvested in the early hours of the day, and proceed to the extraction process, requiring good logistics. The objective of the work was to evaluate the effect of freezing lemongrass on the volumetric yield of EO, and some antimicrobial and antioxidant properties. The EO of fresh lemon grass (EO1) and frozen (EO2) were analyzed for antimicrobial capabilities against *S. aureus* and *S. typhimurium* bacteria, and antioxidant by reducing 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals (DPPH[•]). The volumetric yields of EO1 and EO2 were 2.40 mL/kg and 2.54 mL/kg (on dry basis). Both EO were more effective against *S. typhimurium*, and had similar antioxidant capacity ($p > 0.05$). The set of results suggests that freezing can be used to store lemongrass, without prejudice to the evaluated responses.

PALAVRAS-CHAVE: matriz vegetal; extração; compostos bioativos.

KEYWORDS: Vegetable matrix; extraction; bioactive compounds.

1. INTRODUÇÃO

Óleos essenciais (OE) se definem como líquidos oleosos voláteis de aroma forte, compostos de substâncias orgânicas imiscíveis em água, extraídos por diferentes processos, sendo o mais empregado a destilação com arraste de vapor de água (Caraveiro et al., 1981). O processo empregado para extração do óleo pode interferir em suas características químicas, pois o calor e a pressão utilizados podem hidrolisar ou oxidar moléculas do princípio ativo, transformando-as em produtos de menor eficácia, ou mesmo tóxicos (Brum, 2010). O extrato bruto pode ser aplicado em vários segmentos como antivirais, antifúngicos, antibacterianos e em setores de cosmético e perfumaria (Simões e Spitzer, 2004).

O capim limão, capim santo, capim cidreira, capim cidrão, é encontrado em todo o mundo, principalmente nos países tropicais e subtropicais. Trata-se da espécie *Cymbopogon citratus*, pertence à família

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

Gramineae-Poaceae, de característica herbácea, perene e espontânea, com folhas aromáticas e longas, agudas, ásperas e de nervura central saliente (Simões e Spitzer, 2004; Santos et al., 2009).

O OE obtido do capim limão é composto por uma mistura de aldeídos isoméricos monoterpênicos acíclicos, *trans*-citral e *cis*-citral, que são os componentes ativos. Ele pode ser utilizado para fins agrônômicos, agindo comprovadamente como larvicida e inseticida contra 22 espécies. Suas propriedades antimicrobianas já foram relatadas contra patógenos, e na medicina ele pode ser utilizado em benefício de vários tratamentos, tais como diuréticos, antibacterianos e antifúngicos da garganta, anti-inflamatórios, de hipertensão, de distúrbios gastrointestinais e nervosos, sedativos, antipiréticos, analgésicos, contra febre e redução da dor associada ao reumatismo, gripes e resfriados (Cimanga et al., 2002; Santos et al., 2009).

Dada a natureza volátil dos compostos que formam os óleos essenciais, o horário de colheita das fontes vegetais pode interferir negativamente no rendimento sua extração, havendo a recomendação que a obtenção das matrizes seja feita durante as primeiras horas do dia, para então serem destinadas ao processamento o quanto antes possível (Nascimento et al., 2006).

Sendo assim, o projeto teve por objetivo avaliar o efeito do congelamento do capim limão após a colheita, sobre o rendimento da extração dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste de vapor, bem como suas capacidades antimicrobianas e antioxidantes, comparando os resultados com os óleos essenciais obtidos com o capim limão fresco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos Óleos Essenciais

O processo de extração dos OE foi conduzido no setor de olericultura do Instituto Farroupilha Campus Alegrete, localizado no distrito de Passo Novo, centro-oeste do Rio Grande do Sul. Para a obtenção dos OE foi feita a colheita do capim no início da manhã, em uma propriedade rural próxima à instituição. Logo após, o material colhido foi selecionado, pesado, e parte dele foi levada ao extrator de OE (Limana Poliserviços, Jaguari, RS, Brasil), e outra foi armazenada em saco plástico escuro e congelada a -20°C , para avaliação do efeito do congelamento sobre o rendimento do OE. Para realizar a extração dispôs-se 2,5 kg de capim limão (fresco ou congelado) no cesto perfurado interno do extrator, ajustou-se o nível de água do equipamento, fechou-se a câmara de extração acoplando a conexão com o condensador, funcionando com circulação de água à temperatura ambiente, e então se acionou o aquecimento direto da câmara de extração com chama produzida com gás GLP. A extração foi conduzida por três horas após o início do gotejamento de condensados contendo OE, com temperatura constante, monitorada no termômetro do leito de água da câmara de extração. Os condensados foram recolhidos em funil de separação, sendo a fase oleosa (com uma pequena fração de fase aquosa) posteriormente acondicionada em tubos Falcon, que foram armazenados à -20°C . Após o congelamento, foi possível separar a fase oleosa, que correspondeu ao extrato bruto de OE, e medir seu volume em proveta graduada de 10 mL.

Foram determinados os teores de massa seca do capim limão após colheita, pela técnica de secagem em estufa a 105°C , até peso constante, em triplicata, a fim de verificar o rendimento volumétrico de OE por massa seca de matriz. O rendimento da extração foi calculado relacionando o volume de OE obtido com a massa total e seca de capim fresco e congelado, expressando os resultados em mililitros por quilo de matriz (mL/kg) e por porcentagem.

2.2 Capacidade Antioxidante

As capacidades antioxidantes dos OEF e OEC foram avaliadas pelo método de redução do radical do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]), segundo Brand-Williams (1995). A solução de DPPH[•] foi preparada a 60 $\mu\text{mol/L}$, em etanol PA, e armazenada ao abrigo da luz. A análise foi conduzida com a mistura de 100 μL de OE (diluídos por 200 vezes em etanol PA, 260 $\mu\text{L/L}$) e 3900 μL de solução de DPPH[•], homogêneos em vórtex por 30 s, e mantidos a temperatura ambiente por 30 min, protegidos da luz, para então se realizar a leitura de absorbância em espectrofotômetro, a 518 nm. O aparelho foi calibrado com etanol PA, e o controle negativo foi

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



preparado com etanol PA e solução de DPPH[•]. A quantificação foi obtida pelo uso de uma curva de calibração com soluções etanólicas de (\pm)-6-HydroxI-2,5,7,8-tetrametilchromano-2-ácido carboxílico (Trolox), um antioxidante sintético de referência, com seis pontos, e concentrações variando entre 0,50 mmol/L a 1,00 mmol/L. Os resultados foram expressos em milimol equivalente de trolox por litro de OE (mmol ET/L). As análises foram conduzidas em triplicata, e os valores médios dos resultados para OEF e OEC foram comparados entre si por teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

2.3 Capacidade Antimicrobiana

As capacidades antimicrobianas dos OEF e OEC foram avaliadas contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*, dos grupos Gram positivo e Gram negativo, respectivamente, sendo elas importantes representantes de microrganismos de interesse em alimentos, envolvidas em intoxicações e infecções alimentares, nessa ordem.

A técnica utilizada para os testes antimicrobianos foi a de macrodiluição seriada (NCCL, 2003). Cepas purificadas das duas bactérias foram ativadas em tubo de ensaio com 4 mL de caldo nutriente, a 35°C/18h, e então um inóculo carregado foi transferido com alça de inoculação para 4 mL de solução salina 0,9 %, estéril, e homogeneizado em vórtex por 30 s. Uma alíquota de 400 μ L desta suspensão de células foi transferida para 3600 μ L da mesma solução diluente, e homogeneizada igualmente. Esta segunda suspensão foi utilizada para os testes antimicrobianos, estabelecendo uma contagem bacteriana na ordem de 8 log unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Este valor foi posteriormente confirmado por plaqueamento em superfície das suspensões em placas de Petri com ágar padrão para contagem, incubados a 35°C/48h.

Foram preparadas séries de 11 tubos de ensaio com redução gradual da concentração de OEF e OEC, na presença de caldo nutriente e do inóculo de bactérias, a fim de avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) dos agentes antimicrobianos.

O primeiro tubo das séries foi preparado com 1500 μ L de caldo nutriente, 100 μ L de Tween 20 e 200 μ L de OE, e homogeneizado em vórtex por 30 s. A concentração de OE no primeiro tubo foi de 9 μ L/mL (8,28 μ g/mL). O volume de 900 μ L da solução do primeiro tubo foi transferido assepticamente para o segundo tubo, que continha 900 μ L de caldo nutriente, procedendo-se a homogeneização padrão. O procedimento foi repetido até o preparo do tubo de número onze, cuja concentração de OE foi de 0,01 μ L/L (0,008 μ g/mL), sendo deste descartado o volume de 900 μ L após a homogeneização. Foram preparadas três séries de tubos para o teste com OEF e com OEC, para as duas bactérias testadas.

Com os tubos de ensaio preparados, foram inoculados 100 μ L de suspensão bacteriana em cada tubo, e feita homogeneização em vórtex por 30 s. A incubação foi conduzida em estufa bacteriológica a 35°C/24h. Após o período de incubação, os cultivos bacterianos foram avaliados visualmente, e verificada a menor concentração de OE que inibiu a formação de turbidez, representando a sua CIM. Os cultivos dos tubos que não apresentaram turbidez foram plaqueados em superfície (100 μ L) em ágar padrão para contagem e incubados a 35°C/48h, para verificar a concentração bactericida mínima (CBM), ou seja, a concentração de OE capaz de impedir totalmente a reprodução bacteriana.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os OE obtidos do capim limão fresco ou congelado apresentaram aspectos semelhantes, oleosos, com coloração âmbar e odor intenso característico, evidenciando a presença dos compostos voláteis esperados no material. O teor médio de massa seca do capim limão foi de $38,58 \pm 2,35$ %, e os rendimentos de extração de OE são apresentados na Tabela 1.

Rendimentos de OE de capim limão, disponíveis na literatura, variaram de 2,5 a 3,8 mL/kg de matéria seca (Nascimento et al., 2006), mas realizando a extração em pequena escala, com equipamento analítico, sem executá-la em maior escala, com equipamento de processamento industrial, como o conduzido neste trabalho, mesmo este sendo de pequeno porte.

Tabela 1 – Rendimentos de extração de óleo essencial de capim limão fresco (OEF) e congelado (OEC), conduzida em equipamento industrial de pequeno porte.

Capim limão	OEF		OEC	
	(mL/kg)	%	(mL/kg)	%
Massa total	0,93	0,09	0,98	0,10
Massa seca	2,40	0,24	2,54	0,25

Considerando os valores absolutos de rendimento de OE do capim fresco e congelado, verificou-se que para o segundo a extração foi 5,80 % maior. Este resultado é importante diante da logística envolvida no processamento do OE, desde a colheita da matriz até a extração. Estudos mostraram que o horário da colheita do capim limão é significativo para o rendimento e a composição do OE (Nascimento et al., 2006). Havendo a possibilidade de armazenar a matriz por congelamento sem prejuízo de rendimento de OE, desvincula-se a necessidade de realizar a extração logo após a colheita.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados das capacidades antioxidante e antimicrobiana dos OE.

Tabela 2. Capacidades antioxidantes e antimicrobianas dos óleos essenciais de capim limão fresco (OEF) e congelado (OEC).

Teste	OEF	OEC
DPPH ^a (mmol ET/L)	14,93 ^A ± 0,92	15,60 ^A ± 0,80
CIM ^b (µg/mL)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,06	0,06
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,28	0,28
CBM ^c (µg/mL)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,06	0,06
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,28	0,28

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). ^a 2,2-difenil-1-picril-hidrazila; ^b Concentração inibitória mínima; ^c Concentração bactericida mínima.

A absorvância do controle negativo (etanol e solução de DPPH[•]), na análise da capacidade pelo método do DPPH[•], foi de 0,577 unidades de absorvância (UA), e as medidas médias obtidas com OEF e OEC foram de 0,502 e 0,500, respectivamente, resultando num percentual de inibição do radical do DPPH de 9,93 % e 10,23 %, na mesma ordem, com os OE na concentração de 260 µL/L, equivalente a 239 µg/L, considerando a densidade relativa média dos OE de 0,9200 mg/mL, valor próximo ao encontrado por Santos et al. (2014), que foi de 0,9257 mg/mL. Relativizando as concentrações, OEF e OEC apresentaram capacidade antioxidante superior ao reportado por Guimarães et al. (2011), que relataram uma inibição de 2,48 %, com OE a 100 µg/L.

Entretanto, a dificuldade de comparação de valores de capacidade antioxidante estabelece-se a partir dos diferentes parâmetros analíticos adotados. A concentração de DPPH[•] de 60 µmol/L, empregada neste estudo, equivale a 28 µg/mL, e a utilizada pelos autores supramencionados foi de 40 µg/mL. Tais discrepâncias são frequentes entre pesquisas desta área.

Não foi constatada diferença significativa entre as capacidades antioxidantes de OEF e OEC ($p > 0,05$), demonstrando que o congelamento não influenciou negativamente nesta propriedade. Não foram encontrados relatos na literatura sobre avaliação de OE de matrizes congeladas.

As CIM e CBM do OEF e do OEC foram iguais para a mesma bactéria, assim como o constatado por Machado et al. (2015). Estes autores também afirmaram que as atividades antimicrobianas de OE de capim limão fresco e seco foram semelhantes, mas não indicaram o tratamento de secagem das folhas. A semelhança entre os tratamentos neste parâmetro também foi observado nesta pesquisa, comparando OEF e OEC.

A atividade antimicrobiana do OE de capim limão varia entre as espécies bacterianas (Fisher e Phillips, 2008), e ela é mais intensa frente às bactérias Gram-positivas, devido à fluidez e à permeabilidade ao OE de suas membranas celulares (Naik et al., 2010; Milezzi et al., 2012).

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

A capacidade antimicrobiana dos OE contra *S. aureus* (bactéria Gram positiva) foi maior que a para *S. typhimurium* (Gram negativa). Esse fato também foi observado por Machado et al. (2012), que observaram maior sensibilidade de bactérias Gram-positivas frente ao OE de capim limão, se comparado a de bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*. Apesar de também terem constatado CIM e CBM semelhantes, Assis et al. (2017) descreveram que a capacidade antimicrobiana foi a mesma para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, mas utilizando OE microencapsulado por coacervação.

4. CONCLUSÕES

O rendimento volumétrico do óleo essencial de capim limão congelado, obtido por destilação por arraste de vapor, não foi afetado pelo congelamento da matriz, se comparado ao processo conduzido com a matéria-prima fresca. Também não foram encontradas evidências de que o armazenamento congelado do capim limão afeta as capacidades antioxidantes e antimicrobianas, frente a *S. aureus* e *S. typhimurium*, do seu óleo essencial. Neste contexto, sugere-se que o armazenamento do capim limão em temperatura de congelamento seja uma alternativa tecnicamente viável, para manter o rendimento da extração do óleo essencial e as propriedades bioativas estudadas neste trabalho.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão da bolsa de iniciação científica ao aluno R. A. B. Nunes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Assis, Y. P. A. S.; Almeida, A. C.; Nogueira, W. C. L.; Souza, C. N.; Gonçalves, S. F.; Silva, F. E. G.; Santos, V. K. F. R. & Martins, E. R. (2017). Antibacterial activity and stability of microencapsulated lemon grass essential oil in feeds for broiler chickens. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 18(4), 587-593.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 28, 25-30.
- Fisher, K. & Phillips, C. A. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in foods: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19, 156-164.
- Francisco, V., Figueirinha, A., Neves, B. M., García-Rodríguez, C., Lopes, M. C., Cruz, M. T. & Batista, M. T. (2011). *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 818-827.
- Guimarães, L. G. L., Cardoso, M. G., Sousa, P. E., Andrade, J. & Vieira, S. S. (2011). Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. *Revista Ciência Agronômica*, 42(2), 464-472.
- Machado, T. F., Pereira, R. C. A., Sousa, C. T., Batista, V. C. V. & Pereira, I. M. C. (2012). Atividade antimicrobiana do óleo essencial de capim-limão. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical*, 62, 1-16.
- Machado, T. F., Pereira, R. C. A., Sousa, C. T. & Batista, V. C. V. (2015). Atividade antimicrobiana do óleo essencial do capim limão (*Cymbopogon citratus*) e sua interação com os componentes dos alimentos. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 33(1), 30-38.
- Millezi, F. M., Pereira, M. O., Batista, N. N., Camargos, N., Auad, I., Cardoso, M. D. G. & Piccoli, R. H. (2012). Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. *Journal of Food Safety*, 32, 351-359.
- Naik, M. I., Fomda, B. A., Jaykumar, E. & Bhat, J. A. (2010). Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 1(1), 535-538.
- Nascimento, I. B., Innecco, R., Matos, S. H., Borges, N. S. S. & Marco, C. A. (2006). Influência do horário de corte na produção de óleo essencial de capim-santo (*Andropogon* sp). *Revista Caatinga*, 19(2), 127-127.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2003). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; Norma Aprovada, 6 ed. Documento M7-A6. NCCLS, Wayne, Pennsylvania.

Santos, M. S., Sousa, K. A. P., Menezes, L. C.; Vale, R. C. & Vasconcelos, A. F. F. (2014). Extração e caracterização físico-química do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*). In 54º Congresso Brasileiro de Química - Química e Sociedade: Motores da Sustentabilidade (Associação Brasileira de Química), Natal.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br