

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS MORRINHOS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
MESTRADO PROFISSIONAL EM OLERICULTURA

USO DE EXTRATOS VEGETAIS PARA HIGIENIZAÇÃO DE  
ALFACE

Autor: Leonil Pereira da Silva  
Orientadora: Profa. Dra. Miriam Fumiko Fujinawa  
Coorientador: Prof. Dr. Mário Lettieri Teixeira

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS MORRINHOS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
MESTRADO PROFISSIONAL EM OLERICULTURA

## USO DE EXTRATOS VEGETAIS PARA HIGIENIZAÇÃO DE ALFACE

Autor: Leonil Pereira da Silva  
Orientadora: Profa. Dra. Miriam Fumiko Fujinawa  
Coorientador: Prof. Dr. Mário Lettieri Teixeira

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM OLERICULTURA, ao Programa de Pós-Graduação em Olericultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Morrinhos - Área de Concentração Olericultura.

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

S586u Silva, Leonil Pereira da  
Uso de extratos vegetais para higienização de  
alface / Leonil Pereira da Silva; orientadora Miriam  
Fumiko Fujinawa; co-orientador Mário Lettieri  
Teixeira. -- Morrinhos, 2018.  
38 p.

Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação  
Mestrado Profissional em Olericultura) -- Instituto  
Federal Goiano, Campus Morrinhos, 2018.

1. Extrato aquoso. 2. Malva sylvestris. 3.  
Sanitizante. 4. Syzygium aromaticum. I. Fujinawa,  
Miriam Fumiko, orient. II. Teixeira, Mário Lettieri,  
co-orient. III. Título.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OLERICULTURA

USO DE EXTRATOS VEGETAIS PARA HIGIENIZAÇÃO DE  
ALFACE

Autor: Leonil Pereira da Silva  
Orientadora: Miriam Fumiko Fujinawa

TITULAÇÃO: Mestre em Olericultura-Área de Concentração Manejo  
Fitossanitário em Olerícolas.

APROVADO em 07 de novembro de 2018.



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Miriam Fumiko Fujinawa  
Presidente da Banca  
IF Goiano – Campus Morrinhos



Prof. Dr. Mário Lettieri Teixeira  
Avaliador Externo  
Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vania Silva Carvalho  
Avaliadora Externa  
IF Goiano – Campus Morrinhos



Dr<sup>ª</sup>. Jaqueline Kiyomi Yamada  
Avaliadora Externa

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter oferecido esta vida maravilhosa.

Aos meus pais Otacilio Pereira da Silva e Leonilda Pereira da Silva, *in memoriam*; à minha esposa Mirlene Faricóski Pereira da Silva, às minhas filhas Sheilandra Faricóski e Mariana Faricóski, pela compreensão, paciência e incentivos quando minha vontade diminuía e as dificuldades aumentavam.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Morrinhos, pela oportunidade de ter ingressado e concluído o curso de pós-graduação em Olericultura.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Olericultura, pelos ensinamentos, disponibilidade e atenção.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – Campus Concórdia, por ter oferecido as estruturas de laboratório e salas de aula para a realização da já citada pós-graduação, oportunizando esta capacitação coletiva aos servidores deste campus.

À Profa. Dra. Miriam Fumiko Fujinawa, pela orientação, confiança, paciência e informações repassadas neste período de pós-graduação e durante as pesquisas realizadas.

Ao Prof. Dr. Mário Lettieri Teixeira, pelas inúmeras explicações sobre as técnicas utilizadas no laboratório, informações, orientações e participação na banca de defesa do mestrado.

À Profa. Dra. Vânia Silva Carvalho, pela colaboração, disponibilidade e avaliação da defesa.

À Profa. Dra. Clarice Aparecida Megguer, pelas sugestões propostas na apresentação deste projeto.

Aos colegas de mestrado, pela força e auxílio nas matérias e nas viagens intermináveis de Concórdia-SC a Morrinhos-GO e por não deixarem ninguém desanimar ou desistir durante a caminhada. Vocês serão lembrados para sempre!

Aos colegas de trabalho, pela paciência e espírito de equipe em manter o setor funcionando com poucos servidores na escala.

A vocês, o meu muito obrigado!

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Leonil Pereira da Silva, filho de Otacílio Pereira da Silva e Leonilda Pereira da Silva, nascido em 14 de janeiro de 1969, em Porto União-SC, onde residiu até 1979, quando se mudou para Concórdia-SC, onde terminou o ensino médio no Colégio Estadual Vidal Ramos Júnior em 1991. Prestou concurso em 1994 na Escola Agrotécnica Federal de Concórdia, foi aprovado e começou a trabalhar no dia 24 de janeiro de 1995, no cargo de vigilante. Em 1999, fez o curso de Técnico em Alimentos nesta instituição, tendo concluído em 2001. Em julho de 2012, iniciou a graduação em Gestão Pública no Centro Universitário Internacional-Uninter, tendo concluído em 25 de janeiro de 2014. Em agosto de 2016, ingressou no mestrado profissional em Olericultura oferecido pelo Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos.

## RESUMO

SILVA, LEONIL PEREIRA DA. Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos, novembro de 2018. **Uso de extratos vegetais para higienização de alface.** Orientadora: Profa. Dra. Miriam Fumiko Fujinawa. Coorientador: Prof. Dr. Mário Lettieri Teixeira.

A cada dia, mais e mais as pessoas, por opção de vida, por recomendação médica ou de nutricionista estão consumindo mais saladas cruas, entre as quais, a alface se destaca por ser a folhosa mais conhecida e a mais consumida no Brasil. No entanto, a preocupação com a contaminação das saladas cruas tem crescido. O temor com a segurança alimentar da população faz com que novas técnicas de sanitização para eliminar ou reduzir a contaminação por microrganismos nas saladas sejam desenvolvidas proporcionalmente ao seu consumo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana das plantas medicinais camomila (*Matricaria chamomilla*), malva (*Malva sylvestris* L.), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck), em comparação com tratamentos tradicionais com água natural e água sanitária (hipoclorito de sódio – NaClO). Os extratos aquosos dessas plantas medicinais foram obtidos pela maceração de 5 g do material vegetal, adicionando 500 mL de água destilada, mantidas por três dias, agitadas durante este período duas vezes por dia. Ao final deste período, o extrato foi filtrado e congelado para a realização dos ensaios microbiológicos e físico-químicos. A concentração do extrato foi estipulada empiricamente a 1%. O ensaio foi feito em triplicata entre as soluções usadas. Os extratos aquosos de cravo-da-índia, camomila, malva e limão cravo foram diluídos, sucessivamente, na proporção de 1:1 em solução tampão, tendo sido obtidas as diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512. As alfaces foram lavadas e preparadas seguindo o conhecimento popular para padronização inicial dos experimentos. Após isso, as hortaliças foram inoculadas com as bactérias *Escherichia*



*coli*, *Salmonella aureus* e *Salmonella spp.* na concentração de  $10^7$  UFC/mL, deixadas em repouso por 1 hora e, posteriormente, submetidas aos tratamentos. Com base nos resultados obtidos, foram observadas atividade antimicrobiana do extrato aquoso de cravo-da-índia até a diluição 1/4, tendo sido estipulado de acordo com a metodologia utilizada 400 UA/mL para as cepas testadas de *E. coli*, 100 UA/mL para *Salmonella spp* e 400 UA/mL para *S. aureus*. Além disso, quando o extrato de cravo-da-índia foi testado em folhas de alface, houve redução do número de UFC/mL nas 3 cepas testadas em relação ao controle negativo. Os extratos de malva, limão cravo e camomila não apresentaram resultados significativos quanto à redução dos contaminantes.

Palavras-chave: extrato aquoso, *Malva sylvestris*, sanitizante, *Syzygium aromaticum*

## ABSTRACT

SILVA, LEONIL PEREIRA DA. Instituto Federal Goiano (Goiano Federal Institute) Morrinhos Campus, November, 2018. **Use of vegetable extracts for sanitization of lettuce**. Advisor: Prof. Dr. Fujinawa, Miriam Fumiko. Co-advisor: Prof. Dr. Teixeira, Mário Lettieri.

Every day, more and more people, by lifestyle choice or by medical or nutritionist recommendation, are consuming more raw salads, among which, lettuce stands out as the best known and most consumed leafy vegetable in Brazil. However, concern regarding human health prejudice by raw salads has increased. The population concerning about food safety results in new sanitation techniques development to eliminate or reduce contamination by microorganisms in salads is proportionally to their consumption. This paper aimed to evaluate the antimicrobial activity in the medicinal plants, chamomile (*Matricaria chamomilla*), mauve (*Malva sylvestris* L.), clove (*Syzygium aromaticum*), and lemon clove (*Citrus limonia* Osbeck), compared to traditional treatments with natural water and bleach solution (sodium hypochlorite - NaClO). Aqueous extracts of these medicinal plants were obtained by macerating 5 g of the plant material, adding 500 mL of distilled water, keeping it for three days, and it was shaken twice a day in this period. At the end of this period, the extract was filtered and frozen to make microbiological and physicochemical tests. The extract concentration was empirically stipulated at 1%. The assay was carried out in triplicate among the solutions used. Aqueous extracts of clove, chamomile, mauve, and clove lemon were diluted successively in the ratio of 1:1 in buffer solution, and then obtained the dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512). Lettuces were washed and prepared following popular knowledge for initial standardization of the experiments. After that, the vegetables were inoculated with the bacteria *Escherichia coli*, *Salmonella aureus*, and *Salmonella* sp. at the concentration of  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>, left to rest for one

hour and then submitted to the treatments. Considering the results, an antimicrobial activity of clove aqueous extract was found up to dilution 1/4, according to the methodology used, 400 AU mL<sup>-1</sup> for the tested strains of *E. coli*, 100 AU mL<sup>-1</sup> for *Salmonella* sp. and 400 AU mL<sup>-1</sup> for *S. aureus*. In addition, when clove extract was tested on lettuce leaves, there was a decrease in the number of CFU mL<sup>-1</sup> in the three strains tested in relation to the negative control. The extracts of mauve, clove lemon, and camomile did not show significant results regarding the contaminants reduction.

Keywords: aqueous extract, *Malva sylvestris*, sanitizing, *Syzygium aromaticum*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Tabela 1. Contagem do número de colônias (UFC/mL) em amostras de alface submetidas ao extrato de cravo-da-índia a 1 % .....	19
Tabela 2. pH das amostras de alface determinadas segundo metodologia da AOAC (2005) .....	19
Tabela 3. Dados do teste de colorimetria em folhas de alface submetidas ao tratamento com água potável, hipoclorito de sódio e extrato de cravo-da-índia ....	19
Figura 1. Determinação da atividade antimicrobiana de extrato de cravo-da-índia, de acordo com a metodologia proposta .....	18
Figura 2. Relação dose-resposta para o extrato de cravo-da-índia .....	21
Figura 3. Teste de HET-CAM com extrato de cravo-da-índia a 1% (A) e NaOH a 0,1 M (B) .....	21
Gráfico. Comportamento do teor de Luminosidade (L*) das amostras de alface testadas .....	20

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Alface ( <i>Lactuca sativa</i> ).....	3
2.2 O risco da contaminação de alimentos consumidos frescos .....	4
2.3. O uso de plantas medicinais .....	6
2.4 Referências.....	8
3 CAPÍTULO .....	10
3.1 Introdução .....	13
3.2 Material e métodos .....	15
<b>3.2.1 Produção dos extratos aquosos .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos aquosos .....</b>	<b>15</b>
3.2.2.1 Determinação das unidades arbitrarias por mililitro .....	15
3.2.2.2 Aplicação dos extratos aquosos em Alface.....	15
<b>3.2.3 Determinação do pH .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.4 Determinação de ácido ascórbico (vitamina C).....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.5 Determinação da Umidade.....</b>	<b>16</b>
3.2.5.1 Perda por dessecação (umidade) – Secagem direta em estufa a 105°C.....	16
<b>3.2.6 Vida de Prateleira (<i>shelf life</i>) .....</b>	<b>17</b>
3.2.6.1 Colorimetria.....	17
<b>3.2.7 Teste Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.8 Análise estatística .....</b>	<b>18</b>

3.3	Resultados e discussão .....	18
3.4	Conclusão.....	22
3.5	Referências.....	22

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A população brasileira tem adotado, na última década, hábitos alimentares mais saudáveis, um deles, o consumo de salada crua. Entre as hortaliças mais consumidas, destacam-se a alface e a rúcula, na forma *in natura*, ou seja, em pratos sem nenhum tipo de cozimento (EMBRAPA/SEBRAE, 2010). O cultivo destas hortaliças pode ocorrer de duas formas: no solo ou hidropônico. Em ambos os casos, seja na irrigação das plantas ou na composição da solução nutritiva, a água é fundamental para o desenvolvimento da planta, devendo ser de boa qualidade para prevenir alguma contaminação microbiológica (Lotto, 2008).

O consumo de alimentos crus traz consigo a preocupação com a contaminação por agentes patogênicos. Doenças ocasionadas por microrganismos como a *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* são responsáveis por aproximadamente metade dos diagnósticos assinalados como contágio de gastroenterite decorrentes da ingestão de vegetais consumidos desta forma (Oliveira, P. et al., 2010). Normalmente, são registrados surtos de *E. coli* após a ingestão de carne bovina. No entanto, estudos têm demonstrado que *E. coli* se desenvolve e sobrevive em vegetais como alface, cenouras picadas e vários alimentos crus (Germano, P. e Germano, M., 2008). Atualmente, o tratamento mais conhecido e utilizado no Brasil é a higienização das saladas cruas com solução de hipoclorito de sódio, recomendação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Muitas plantas medicinais têm sido utilizadas ao longo dos anos como agentes antimicrobianos, e o que teve início pelo conhecimento empírico e hoje é comprovado por diversas pesquisas. O aproveitamento destas plantas, além de condimento quando adicionadas aos alimentos, pode prevenir o crescimento de bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras, inclusive diminuindo a viabilidade de estágios larvais de parasitos (Naghbi et al., 2005).

Espécies vegetais como camomila (*Matricaria chamomilla*), malva (*Malva sylvestris* L.), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) têm sido utilizadas ao longo dos anos, seja como condimentos ou por suas propriedades medicinais. O uso destas plantas tem sido tradicionalmente implementado no tratamento de feridas, infecções na gengiva e na garganta e distúrbios gastrointestinais com base no conhecimento empírico, embora os compostos responsáveis pelas propriedades medicinais não tenham sido totalmente identificados e definida sua aplicação terapêutica (Arora, 2014). No presente trabalho, tem-se por objetivo avaliar extratos vegetais obtidos por meio de tecidos destas espécies na eliminação de agentes patogênicos em folhas de alface.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Alface (*Lactuca sativa*)

A alface, espécie da família Asteraceae, é considerada um dos mais importantes integrantes do grupo das hortaliças. É quase exclusivamente usada como um ingrediente em saladas, mas também pode ser utilizada na culinária na forma cozida (Lebeda et al., 2007). A alface é produzida comercialmente em muitos países em todo o mundo, amplamente cultivada como um vegetal em hortas caseiras (Rubatzky e Yamaguchi 1997). É especialmente importante como uma cultura comercial na Ásia, América do Norte e Central e Europa. China, EUA, Espanha, Itália, Índia e Japão que estão entre os maiores produtores do mundo. Para a produção desta hortaliça, têm sido utilizados diversos métodos, permitindo a criação de novas cultivares bem adaptadas às necessidades específicas dos produtores e consumidores (Mou, 2008).

O gênero *Lactuca L.* pertence à família Asteraceae (Compositae), a maior família das dicotiledôneas. A tribo Lactuceae da subfamília Cichorioideae, anteriormente conhecida como Cichorieae, é talvez a tribo mais conhecida e mais facilmente reconhecida da família (Funk et al. 2005). Apesar disso, a delimitação precisa do gênero *Lactuca* é problemática. Com base na literatura disponível, o gênero *Lactuca* compreende aproximadamente 100 espécies (Lebeda et al., 2007). Em revisão feita por eles, o gênero *Lactuca* se restringiu àquelas espécies contendo 7-25 floretes amarelos e 1-10 costelas longitudinais em cada lado do aquênio, com um agudo e filiforme bico em seu ápice.

A alface é uma erva glabra anual com uma raiz fina e uma haste ereta de 30 a 100 cm de altura, ramificada na parte superior. As folhas são dispostas em espiral, formando uma roseta densa, fechando-se ou não na forma de uma cabeça. Sua forma é

oblonga a elíptica transversal, orbicular a triangular, indivisível a divisível. A margem da folha pode ser inteira ou denteada, podendo ser, muitas vezes, encaracolada. As folhas das hastes são elípticas oblongas, com base cordada. A inflorescência (capítulos, cabeça) é composta de 7-15 florezinhas amarelas. Os nutrientes que ela apresenta em maior destaque são as vitaminas A, B1, B2 e C, Ferro e Fósforo, além de fibra alimentar. É uma planta diploide com um número cromossômico básico  $n=9$  (Grulich, 2004).

É de conhecimento da população a necessidade de consumir frutas e verduras para a melhoria das condições de saúde, no Brasil. Esse consumo está abaixo do recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que defende o consumo diário de, pelo menos, 400 g de frutas, legumes e verduras. O consumo atual no Brasil é de apenas 132 g por pessoa por dia; desta forma, a população brasileira deve praticamente triplicar este número para atender o que recomenda a OMS (IBGE, 2009).

## 2.2 O risco da contaminação de alimentos consumidos frescos

O produto fresco é minimamente processado (isto é, muitas vezes apenas lavado, cortado e embalado) e consumido normalmente *in natura*. Nos últimos anos, o consumo de frutas e hortaliças frescas aumentou 4,5% ao ano em todo o mundo (Di Carli et al., 2016), com produtos embalados ou minimamente processados. Atualmente no Brasil, a alface embalada tem um volume de mercado minimamente processado de 50%. Concomitantemente, um número crescente de surtos de doenças humanas poderia estar associado ao consumo de produtos frescos contaminados, como frutas e vegetais (Leff e Fierer, 2013). Neste contexto, a combinação de folhas verdes ingeridas cruas e *Salmonella* spp. foi a principal combinação de alimentos/agentes patogênicos para doenças transmitidas por alimentos na Europa entre 2007 e 2011 (Leff e Fierer, 2013).

A segurança microbiana de produtos minimamente processados, mantendo a alta qualidade do produto, é obrigatória e representa um grande desafio para a indústria de alimentos. A adesão de bactérias patogênicas a superfícies de produtos frescos, como, por exemplo, folhas de alface, a penetração dessas bactérias no tecido, bem como a presença de bactérias multirresistentes dificultam a redução de microrganismos durante os processos de lavagem e tratamentos de desinfecção. Uma importante fonte de inóculo para contaminação destes produtos é a água. Estudos anteriores identificaram

riscos associados à irrigação de alimentos em função da retenção da água de irrigação em superfícies de plantas comestíveis (Barker et al., 2013). Assim, estes alimentos podem vir do campo já contaminados. Em consequência, bactérias potencialmente patogênicas inesperadas podem permanecer indetectáveis e resultar em surtos de origem alimentar.

Os microrganismos patogênicos mais relevantes em produtos frescos são cepas de *Escherichia coli* verotoxigênicas, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e Norovirus. Assim, a amostragem microbiológica rotineiramente aplicada ao longo da cadeia de processamento de alimentos é principalmente focada em microrganismos indicadores selecionados, embora a composição da diversidade microbiana em produtos frescos não seja conhecida em detalhe (Caldera e Franzetti, 2013).

*Escherichia coli*, presente nos intestinos de animais (inclusive homem), é considerada um indicador de qualidade higiênico-sanitária. A inativação deste microrganismo se dá a partir de 60°C (74°C no centro geométrico do alimento). O pH de crescimento é aproximadamente de 4,4 a 9,0. Espécies do gênero *Salmonella* são bactérias anaeróbias facultativas, com desenvolvimento em temperaturas de 5 a 49°C e pH 4,0 a 9,0 (Jay, 2005 e Silva, N. et al., 2017). O aquecimento dos alimentos acima de 60°C é suficiente para inativar *Salmonella* spp. Apesar de resistir ao congelamento, o número de células viáveis de *Salmonella* spp. diminui. A dose infectiva é de cerca de  $10^8$  a  $10^9$  UFC g<sup>-1</sup>. Aves, gado, suíno e outros animais domésticos e selvagens são reservatórios naturais, podendo a contaminação dos alimentos ocorrer pelo contato com esterco animal. *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes de intoxicações alimentares. A síndrome é decorrente da ingestão da toxina estafilocócica. A quantidade de enterotoxina necessária para a doença é em torno de 1 µg até 100 ng ou  $10^5$  células. As enterotoxinas são resistentes à pepsina e tripsina e estáveis ao calor (100°C por 30 min), sendo produzidas acima de 10°C e em pH de 5,2 a 9,0 (Jay, 2005 e Silva, N. et al., 2017).

A avaliação da diversidade microbiana em produtos frescos é focada principalmente nos produtos minimamente processados (Di Carli et al., 2016). Caldera e Franzetti (2013) relatam a importância de estudos em relação ao impacto das etapas de processamento nas comunidades microbianas de produtos minimamente processados. Sabe-se que a contaminação de vegetais pode ocorrer em diferentes etapas de processamento, como, por exemplo, durante a produção primária, processamento,

distribuição e preparação. O conhecimento detalhado da estrutura da comunidade e o desenvolvimento da carga microbiana ao longo da cadeia de processamento apoiarão a implementação de estratégias de descontaminação, aumentando, assim, a segurança do produto.

A procura por alimentação saudável tem ocasionado preocupação maior com a contaminação de alimentos consumidos *in natura* em forma de salada, contaminação causada por fatores que vão desde a produção até a manipulação no momento do seu preparo, o que pode ocasionar diversas doenças a quem consome. Entre as principais doenças veiculadas por alimentos (DVA), podem-se destacar aquelas veiculadas por *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, que são responsáveis por 81,4% das DTAs no Brasil (SISVAN/SVS, 2017).

### 2.3. O uso de plantas medicinais

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são a melhor fonte para a obtenção de uma variedade de moléculas biologicamente ativas, e cerca de 80% da população mundial usa a medicina tradicional na busca de alívio para alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. As plantas têm sido, desde a antiguidade, um recurso ao alcance do ser humano, sendo encontradas características fitoterápicas observadas de geração em geração ao longo da história do desenvolvimento das nações (França et al., 2008).

Diversos produtos de origem vegetal mostram ser potencialmente interessantes no que se refere à sua atividade antimicrobiana, entre eles, podemos dar o exemplo da malva (*Malva sylvestris*). Esta planta apresenta propriedades diuréticas e expectorantes, podendo também ser utilizada no tratamento de inflamações das mucosas (Lorenzi e Matos, 2002). É uma planta natural da Europa e Ásia, mas que já se encontra espalhada pelas Américas, Europa, Sudoeste asiático, região mediterrânea e Macaronésia. Suas propriedades medicinais são conhecidas desde a antiguidade. Os extratos das folhas e flores apresentam potencial antimicrobiano e anti-inflamatório, extremamente ricas em mucilagem, mais especialmente na raiz, o que lhe oferece a maior parte dos seus méritos curativos (Bizzo et al., 2009). Contém ainda óleos essenciais, alguns taninos, flavonoides e glicosídeos.

Outro exemplo é o cravo-da-índia. Esta especiaria proveniente da Indonésia é facilmente encontrada em supermercados e comércios de produtos naturais, sendo usada

na gastronomia com frequência por trazer sabor e aroma às receitas. No entanto, sua função medicinal também já é aplicada há muito tempo. O cravo-da-índia é rico em nutrientes e óleos essenciais que colaboram não apenas com o corpo como também com a mente. O eugenol, constituinte principal do óleo de cravo (72 a 90%), é o principal componente responsável pelas suas potenciais aplicações e odor, além de ser um importante anestésico local e antisséptico. Além deste composto, há ainda presença de acetil eugenol, beta-cariofileno e vanilina, ácido cratególico, taninos como a bicornina, ácido galotânico, salicilato de metila (analgésico), os flavonoides eugenina, canferol, ramnetina e eugenitina, triterpenoides como ácido oleanólico, estigmasterol e campesterol, e sesquiterpenos diversos. Os benefícios do cravo-da-índia se devem às suas propriedades antissépticas, cicatrizantes, antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes, analgésicas e anti-inflamatórias. É recomendado ainda para manter a saúde bucal, aliviando dores de dente e nas gengivas (Bizzo et al., 2009; Godoy et al., 2009). Estudos de Devi et al. (2010) demonstraram a ação antibacteriana contra a *Salmonella typhi*. O eugenol também apresentou ação antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (Yadav et al., 2015). Wang et al. (2018) demonstraram a ação do eugenol contra cepas de *Escherichia coli* resistentes à colistina.

A camomila (*Matricaria chamomilla*) é uma planta anual, que tem em sua composição química óleos essenciais que contêm camazuleno, bisabolol, colina, flavonoides, cumarina e sais minerais. É uma erva muito primitiva adotada pela medicina tradicional europeia, hoje inserida nas farmácias de grande parte dos países, utilizada de maneira aceitável do ponto de vista da medicina científica como também da popular na forma de chás quentes, como tônico (restaura energia) amargo, digestivo, sedativo, contribui na liberação de gases, combate cólicas e incentiva o apetite, pode ser utilizada também de maneira externa pela colocação de compressas do chá ainda quente sobre a barriga, método muito empregado pelas mães para tratar cólicas em crianças (Lorenzi e Matos. 2002 e Carvalho et al., 2014).

O limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) é amplamente produzido no Brasil, e o grande interesse econômico neste fruto reside no ácido cítrico, que pode chegar até 8% do peso. É comum usar o suco desta fruta para temperar alimentos e bebidas por fornecer acidez e sabor amargo. As folhas desta planta são muito utilizadas para infusão, no combate a resfriados e coriza, como também seu suco é usado na medicina

alternativa para tratamento de problemas gastrointestinais e contra infecções bacterianas (Muller et al., 1996).

## 2.4 Referências

- Arora, R.K. 2014. *Diversity in Underutilized Plant Species*. National Agriculture Science Centre (NASC). New Delhi. India. 234p.
- Barker, S.F., O'toole, J, Sinclair, M.I. and Leder, K., Malawaraarachchi, M., Hamilton, A.J. 2013. A probabilistic model of norovirus disease burden associated with greywater irrigation of home-produced lettuce in Melbourne, Australia. *Water Research*, 47:1421-1432.
- Bizzo, H.R., Hovell, A.M.C. and Rezende, C.M. 2009. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, 32(3):588-594
- Brasil. EMBRAPA/SEBRAE. (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/ Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. 2010. *Catálogo Brasileiro de Hortaliças: saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no País*. Brasília: EMBRAPA/SEBRAE. 59p.
- \_\_\_\_\_. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2009. *Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil*. Disponível em: <[https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2008\\_2009\\_analise\\_consumo/default.shtm](https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/default.shtm)>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- Caldera, L. and Franzetti, L. 2013. Effect of storage temperature on the microbial composition of ready-to-use vegetables. *Current Microbiology*, 68:133–139.
- Carvalho, A.F., Silva, D.M., Silva, T.R.C., Scarcelli, E. and Manhani, M.R. 2014. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólicos e de ciclo hexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 16(3):521-526.
- Devi, K.P., Nisha, S.A., Sakthivel, R. and Pandian, S.K. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130:107-115.
- Di Carli, M., De Rossi, P., Paganin, P., Del Fiore, A., Lecce, F., Capodicasa, C., Bianco, L., Perrotta, G., Mengoni, A., Bacci, G., Daroda, L., Dalmastri, C., Donini, M. and Bevivino, A. 2016. Bacterial community and proteome analysis of fresh-cut lettuce as affected by packaging. *FEMS Microbiology Letters*. 363:1-7.
- França, I.S.X, Souza, J., Batista, R.S., Britto, V.R.S. 2008. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Revista Brasileira de Enfermagem*, 61(2):201-208.
- Funk, V.A., Bayer, R.J., Keeley, S., Chan, R., Watson, L., Gemeinholzer, B., Schilling, E., Panero, J.L., Baldwin, B.G., Garcia-Jacas, N., Susanna, A. and Jansen, R.K. 2005. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biologische Skrifter*, 55: 343–374.
- Germano, P.M.L. and Germano, M.I.S. 2001. Agentes Bacterianos de Toxinfeccões. In: *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*, 4.ed., São Paulo: Varela, p.234-238.

- Godoy, H.T., Duarte, M.C.T., Wagner, R. and Scherer, R. 2009. Composição e atividades antioxidantes e antimicrobianas dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 11(4):442-449.
- Grulich, V. 2004. *Lactuca L.* Praha, Academia. p.487-497.
- Jay, J.M. 2005. *Microbiologia de alimentos*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 711p.
- Lebeda, A., Ryder, E.J., Grube, R., Doležalová, I. and Křístková, E. 2007. Lettuce (Asteraceae; *Lactuca* spp.). *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement*. CRC Press, Taylor and Francis Group: p.377–472.
- Leff, J.W. and Fierer, N. 2013. *Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables*. PLoS One.
- Lorenzi, H. and Matos, F.J.A. 2002. *Plantas Medicinai*s no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Editora Nova Odessa, São Paulo, 512p.
- Lotto, M.C. 2008. *Avaliação da contaminação de alface (Lactuca sativa) por coliformes termotolerantes e Escherichia coli em sistemas de cultivo orgânico e convencional*. 2008. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de São Carlos, Araras.
- Mou, B. 2008. *Handbook of Plant Breeding. Vegetables I. Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae*. New York, Springer Science. p.75–116.
- Muller, M., Irkens-Kiesecker, U. and Rubinstein, B. 1996. On the mechanism of hyperacidification in lemon: Comparison of the vacuolar H(+)-ATPase activities of fruits and epicotyls. *Journal of Biological Chemistry*, 271:1916-1924.
- Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, M.S. and Ghorbani, A. 2005. Labiatae family in folk medicine in Iran from Ethnobotany to Pharmacology. *Iran Journal Pharmaceutical Research*, 2:63-79.
- Oliveira, P.G.C., Rodrigues, S.E.S., Almeida, C.G.L., Figueireiro, F.R., Rodrigues, F.F.G., Oliveira, A.D.L. and Costa, J.G.M. 2010. Análises microbiológicas e parasitológicas de saladas verdes servidas em self-service no município de Crato – Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro*, 2(2):535-537.
- Rubatzky, V.E. and YAMAGUCHI, M. 1997. Revision of *Lactuca L.* and two new genera of the tribe Lactuceae (Compositae) on the mainland of Asia. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 26: 418-428.
- Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Gomes, R.A.R. and Okazaki, M.M. 2017. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 5. ed. Editora Blucher. São Paulo, 535p.
- SISVAN/SVS (Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional). 2017. *Ministério da Saúde. Relatório Públicos do SISVAN*. Disponível em: <<http://dabsistemas.saude.gov.br/sistemas/sisvanV2>>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- Wang, Y.M., Kong, L.C., LIU, J. and Ma, H.X. 2018. Synergistic effect of eugenol with Colistin against clinical isolated Colistin-resistant *Escherichia coli* strains. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7:17-26.
- Yadav, M.K., Chae, S.W., Im, G.J., Chung, J.W. and Song, J.J. Eugenol: A Phyto-Compound Effective against Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Clinical Strain Biofilms. *PLoS ONE*, 10:1-21, 2015.

### 3 CAPÍTULO I

#### **Uso de extratos vegetais para higienização de alface**

(Artigo a ser submetido ao Periódico Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences)

#### Resumo

A população brasileira tem adotado, na última década, hábitos alimentares mais saudáveis, sendo um deles o consumo de salada crua. Entre as hortaliças mais ingeridas, destacam-se a alface e a rúcula, in natura, ou seja, em pratos sem nenhum tipo de cozimento. O consumo de alimentos crus traz consigo a preocupação com a contaminação por agentes patogênicos. Doenças ocasionadas por microrganismos como a *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* são responsáveis por, aproximadamente, metade dos diagnósticos assinalados como contágio de gastroenterite decorrentes da ingestão de vegetais consumidos desta forma. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de extratos vegetais na desinfestação de folhas de alface com diferentes tipos de contaminantes. Foram utilizados botões florais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck), camomila (*Matricaria chamomilla*) e malva (*Malva sylvestris* L.) para obtenção dos extratos aquosos. Os extratos aquosos dessas plantas medicinais foram obtidos pela maceração de 5 g do material vegetal, adicionando 500 mL de água destilada, mantidos durante três dias em um recipiente de plástico a 10°C, agitados duas vezes por dia durante este período. Ao final deste período, o extrato foi filtrado e congelado para a realização dos ensaios microbiológicos e físico-químicos. Folhas de alface previamente processadas (lavagem em água corrente) foram contaminadas artificialmente com cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* na concentração de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Em seguida, foram deixadas em repouso por uma hora. Após este período, foram tratadas



com os extratos vegetais diluídos em água em concentrações variando de 1/2 a 1/512 (v/v). Além dos tratamentos com extratos vegetais, houve tratamentos com água potável e hipoclorito de sódio para fins de comparação. O ensaio foi conduzido seguindo delineamento inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento. Com base nos resultados obtidos, observou-se atividade antimicrobiana do extrato aquoso de cravo-da-índia até a diluição 1/4, tendo sido estipulados de acordo com a metodologia utilizada 400 UA mL<sup>-1</sup> para as cepas testadas de *E. coli*, 100 UA mL<sup>-1</sup> para *Salmonella* spp. e 400 UA mL<sup>-1</sup> para *S. aureus*. Quando o extrato de cravo-da-índia foi testado em folhas de alface, houve redução do número de colônias (UFC mL<sup>-1</sup>) nas três cepas testadas em relação ao controle negativo. A determinação da atividade de água resultou em uma perda de aproximadamente 95% nas amostras *in natura*. Em relação à determinação de ácido ascórbico, foi encontrado um valor médio de 8,61 mg 100 g<sup>-1</sup> (p<0,05), com pH médio de 6,33. Os resultados encontrados nesta pesquisa remetem ao potencial antibacteriano do extrato de cravo-da-índia, apresentando a grande vantagem de ser natural, de fácil obtenção e produção.

Palavras-chave: Extrato aquoso, *Malva sylvestris*, sanitizante, *Syzygium aromaticum*

### 3 CHAPTER I

#### **Use of vegetable extracts for sanitization of lettuce.**

(Paper to be submitted to the Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences)

#### **Abstract**

The Brazilian population has adopted, in the last decade, healthier eating habits, one of them the raw salad consumption. Among the most consumed vegetables, lettuce and arugula stand out *in natura*, that is, in dishes without any type of cooking. The raw food consumption brings together the concern about contamination by pathogens. Diseases caused by microorganisms such as *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* are responsible for approximately half of the diagnoses reported as gastroenteritis contagion due to the vegetables consumed in this way. This paper aimed to evaluate the effect of plant extracts on the lettuce leaves disinfection using different types of contaminants. Clove floral buds (*Syzygium aromaticum* L.), clove lemon (*Citrus limonia* Osbeck), chamomile (*Matricaria chamomilla*), and mallow (*Malva sylvestris* L.) were used to obtain the aqueous extracts. The aqueous extracts of these medicinal plants were obtained by macerating 5 g of the plant, adding 500 mL of distilled water, kept for three days in a plastic container at 10°C, stirred twice a day during this period. At the end of this period, the extract was filtered and frozen for microbiological and physicochemical tests. Pre-processed lettuce leaves (washing under running water) were artificially contaminated with strains of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* at 10<sup>7</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. They were then left to rest for one hour. After this period, they were treated with the diluted plant extracts in water in concentrations ranging from 1/2 to 1/512 (v/v). In addition to treatments with plant extracts, treatments with potable water and sodium hypochlorite were carried out for comparison purposes. The assay was carried out in a completely randomized design with three replicates for each treatment. Considering the results, an antimicrobial activity of clove aqueous extract was found up to the dilution 1/4, stipulated according to the methodology used, 400 AU mL<sup>-1</sup> for the tested strains of *E. coli*, 100 UA mL<sup>-1</sup> for *Salmonella* sp., and 400 UA mL<sup>-1</sup> for *S. aureus*. When the clove extract was tested on lettuce leaves, a decrease in the number of colonies (CFU mL<sup>-1</sup>) in the three strains tested was found in relation to the

negative control. The determination of the water activity resulted in a loss of approximately 95% in samples *in natura*. In relation to ascorbic acid determination, an average value of 8.61 mg 100 g<sup>-1</sup> (p<0.05) was found, with a mean pH of 6.33. Results found in this research refer to the antibacterial potential of clove extract, showing the great advantage of being natural, and easy to obtain and produce.

Keywords: Aqueous extract, *Malva sylvestris*, sanitizing, *Syzygium aromaticum*

### 3.1 Introdução

A população brasileira tem adotado, na última década, hábitos alimentares mais saudáveis, um deles, o consumo de salada contendo alimentos *in natura*. Nos últimos anos, o consumo de frutas e hortaliças frescas aumentou 4,5% ao ano em todo o mundo (Di Carli et al., 2016), com produtos embalados ou minimamente processados. Entre as hortaliças mais ingeridas sem nenhum tipo de cozimento, destacam-se a alface e a rúcula (EMBRAPA/SEBRAE, 2010). A alface embalada é responsável por quase 50% do mercado brasileiro de hortaliças minimamente processadas (Di Carli et al., 2016).

Com o aumento do consumo de produtos frescos, como frutas e vegetais, há também um concomitante crescimento no número de surtos de doenças humanas associadas a alimentos contaminados (Leff e Fierer, 2013). A adesão de bactérias patogênicas a superfícies de produtos frescos, como, por exemplo, folhas de alface, a penetração dessas bactérias no tecido bem como a presença de bactérias multirresistentes dificultam a redução de microrganismos durante os processos de lavagem e tratamentos de desinfecção. Uma importante fonte de inóculo para sua contaminação é a água. Estudos anteriores identificaram riscos associados à irrigação de alimentos em função da retenção da água de irrigação em superfícies de plantas comestíveis (Barker et al., 2013). Assim, estes alimentos podem vir do campo já contaminados.

Bactérias potencialmente patogênicas inesperadas podem permanecer indetectáveis e resultar em surtos de origem alimentar. Os microrganismos patogênicos mais relevantes em produtos frescos são cepas de *Escherichia coli* verotoxigênicas, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* e Norovirus (Caldera e Franzetti, 2013). Na Europa, entre os anos de 2007 e 2011, a combinação de folhas verdes

comidas cruas e *Salmonella* spp. foi a principal combinação de alimentos/agentes patogênicos para doenças transmitidas por alimentos (Leff e Fierer, 2013).

Via de regra, os órgãos sanitários têm recomendado o tratamento destes produtos com solução à base de hipoclorito de sódio antes do consumo. Entretanto, em geral, produtos à base de cloro são voláteis e podem provocar problemas respiratórios, o que exige cautela em sua utilização. Muitas plantas medicinais são descritas por apresentarem propriedades antimicrobianas, inibindo o crescimento de bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras e, inclusive, diminuindo a viabilidade de estágios larvais de parasitos (Naghbi et al., 2005).

Diversos produtos de origem vegetal mostram ser potencialmente interessantes. Entre estes produtos, aqueles provenientes da malva (*Malva sylvestris*). Esta planta apresenta propriedades diuréticas e expectorantes, podendo também ser utilizada no tratamento de inflamações das mucosas. Os extratos de suas folhas e flores apresenta potencial antimicrobiano e anti-inflamatório (Lorenzi e Matos, 2002). Outro exemplo é o cravo-da-índia, especiaria proveniente da Indonésia, facilmente encontrada em supermercados e comércios de produtos naturais. O cravo-da-índia é farto em nutrientes e óleos essenciais, tendo como importante componente o eugenol, substância que tem entre suas características propriedades antissépticas, com ação antifúngica e antibacteriana (Bizzo et al., 2009 e Godoy et al., 2009). A camomila (*Matricaria chamomilla*) é uma planta anual, que tem em sua composição química óleos essenciais que contêm camazuleno, bisabolol, colina, flavonoides, cumarina e sais minerais (Lorenzi e Martins, 2002). Já as folhas do limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck), amplamente produzido no Brasil, são utilizadas na medicina alternativa para tratamento de problemas gastrointestinais e contra infecções bacterianas (Muller et al., 1996).

A literatura relata estudos em relação à atividade antimicrobiana do eugenol contra cepas de *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* (resistentes à meticilina) e cepas de *Escherichia coli* (resistentes à colistina) (Devi et al., 2010; Yadav et al., 2015 e Wang et al., 2018). Desta forma, o uso de extratos aquosos de cravo-da-índia prescinde de maiores pesquisas, pois eles podem substituir os agentes sanitizantes à base de cloro. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar extratos aquosos de cravo-da-índia, malva, camomila e limão cravo na eliminação de agentes patogênicos de folhas de alface.

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1 Produção dos extratos aquosos

Para o preparo dos extratos, foram utilizados 5 g de amostras de cravo-da-índia, malva, camomila e casca/suco de limão cravo. As amostras foram maceradas em 500 mL de água natural de poço artesiano, e a mistura deixada em repouso por três dias em um recipiente de plástico à temperatura de 10°C, sendo agitada duas vezes por dia. Ao final deste período, os extratos foram filtrados e congelados para a realização dos ensaios microbiológicos e físico-químicos. A concentração do extrato foi estipulada empiricamente a 1%. O teste foi feito em triplicata.

### 3.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos aquosos

#### 3.2.2.1 Determinação das unidades arbitrárias por mililitro

O método de diluição seriada foi utilizado para a determinação das unidades arbitrárias por mililitro (UA mL<sup>-1</sup>). Com o auxílio de uma placa de microtitulação, o extrato aquoso de cravo-da-índia a ser testado foi diluído sucessivamente na proporção de 1:1 em solução tampão e obtidas as diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512. Após isso, alíquotas de 20 µL destas diluições foram aplicadas e testadas em placas com determinado meio de cultura específico a cada gênero de bactéria, onde previamente já haviam sido semeadas as cepas indicadoras *S. aureus* ATCC 6538, *Salmonella* spp. e *E. coli* ATCC 10536. O inóculo destes microrganismos foi feito a partir de uma solução fisiológica estéril contendo 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (correspondente a 0,5 na escala McFarland). Estas culturas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O experimento foi feito em duplicata.

#### 3.2.2.2 Aplicação dos extratos aquosos em Alface

Com base do resultado do item anterior, procedeu-se ao teste de desinfestação de folhas de alface. Para tal, as alfaces foram adquiridas no comércio local, em feira, embaladas em sacolas de plástico comum nos dias da realização dos testes. Elas foram lavadas e preparadas de acordo com a prática comum (folhas picadas com a mão). Após

isso, as folhas foram contaminadas com inóculo das bactérias indicadoras na concentração de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> e deixadas em repouso por uma hora. Transcorrido este tempo, foram adicionados os respectivos extratos aquosos em concentração final de 1:1 v/v e aguardou-se uma hora. Após este período, uma alíquota de 100 µL foi retirada de cada amostra e semeada com auxílio de uma alça de Drigalski no respectivo meio de cultura para determinação do crescimento microbiológico. O controle positivo utilizado foi hipoclorito de sódio (aproximadamente 10 mL para cada litro de água) e como controle negativo foi usada água da torneira. As placas foram mantidas a 37°C por 48 horas. Findado o prazo, as placas foram avaliadas quanto ao crescimento bacteriano e determinou-se a contagem de colônias (UFC mL<sup>-1</sup>). O experimento foi feito em triplicata.

### **3.2.3 Determinação do pH**

A determinação do pH das amostras de alfaces foi feita em pHmetro com eletrodo de vidro e prata, conforme descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) Internacional (2005).

### **3.2.4 Determinação de ácido ascórbico (vitamina C)**

A determinação de ácido ascórbico foi feita de acordo com a metodologia de Strohecker e Henning (1967). A vitamina C foi extraída das amostras de alface (5g) por meio de uma solução de ácido oxálico a 1%. Após a extração, a concentração de ácido ascórbico foi quantificada por meio da reação com 2,4 – dinitrofenilhidrazina, como padrão foi utilizada uma solução de ácido ascórbico a 1%. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico/100 g de matéria fresca.

### **3.2.5 Determinação da Umidade**

#### *3.2.5.1 Perda por dessecação (umidade) – Secagem direta em estufa a 105°C*

Uma amostra de 10 g de alface crespa foi pesada e colocada em cadinho de porcelana, previamente tarado. Foi aquecida durante três horas e, em seguida, resfriada

até a temperatura ambiente e anotado o peso, tendo o procedimento sido repetido por três vezes até peso constante (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

Cálculo:

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade ou substâncias voláteis a } 105\% \text{ m m}^{-1} \quad (1)$$

em que: N=n° de gramas de umidade (perda de massa em g) e P=n° de gramas da amostra

### **3.2.6 Vida de Prateleira (*shelf life*)**

#### *3.2.6.1 Colorimetria*

As desigualdades de cor podem se manifestar através das distâncias geométricas regulares das estruturas L\*, a\*, b\*, obtidas diretamente no colorímetro. O eixo L\* mostra a luminosidade. A coordenada a\* indica a variação do verde-vermelho e a coordenada b\*, do azul-amarelo. O  $\Delta E$  é indicado para mostrar o total de diferença de cor, sendo calculado pela equação  $\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$  (Rampilli e Andreimi, 1992 e Gonzalez et al., 2001). Os testes com o colorímetro foram feitos em triplicata e obtidas as médias de cada amostra.

### **3.2.7 Teste Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)**

Ovos fertilizados de galinhas espécie Lohmann (Lohmann selected Leghorn, LSL) foram usados no teste de HET-CAM. Os ovos foram incubados em condições ótimas (temperatura entre 37 e 38°C e umidade entre 55 e 60% por 10 dias). No décimo dia, os ovos foram abertos pela cavidade aérea cuidadosamente com auxílio de uma microrretífica. Após isso, foi adicionado 0,3 mL do extrato aquoso vegetal na concentração de 1%, respectivamente, como controle negativo - solução salina 0,9%, e como controle positivo - solução de NaOH 0,1 M. A observação do efeito irritante foi nos tempos de 30, 120 e 300 segundos após a aplicação de cada substância. O resultado do Índice de Irritação (II) foi dado, em que o valor entre 0 e 4,9 significa não irritante e acima de 5,0 até 21, irritante (ICCVAM, 2010) [Equação (2)]:

$$M = \left( \left( \frac{(300 \cdot \text{Tempo de Hemorragia})}{300} \right) \times 5 \right) + \left( \left( \frac{(300 \cdot \text{Tempo de Lise})}{300} \right) \times 7 \right) + \left( \left( \frac{(300 \cdot \text{Tempo de Coagulação})}{300} \right) \times 9 \right) \quad (2)$$

### 3.2.8 Análise estatística

Para as análises estatísticas, foram utilizados os testes de ANOVA com auxílio do *software* Graphpad Instat.

### 3.3 Resultados e discussão

Os resultados encontrados para a atividade antimicrobiana do extrato aquoso de cravo-da-índia ocorreram até a diluição 1/4, tendo sido estipulados, de acordo com a metodologia utilizada, 400 UA mL<sup>-1</sup> para as cepas testadas de *E. coli*, 100 UA mL<sup>-1</sup> para *Salmonella* spp e 400 UA mL<sup>-1</sup> para *S. aureus* (Figura 1).

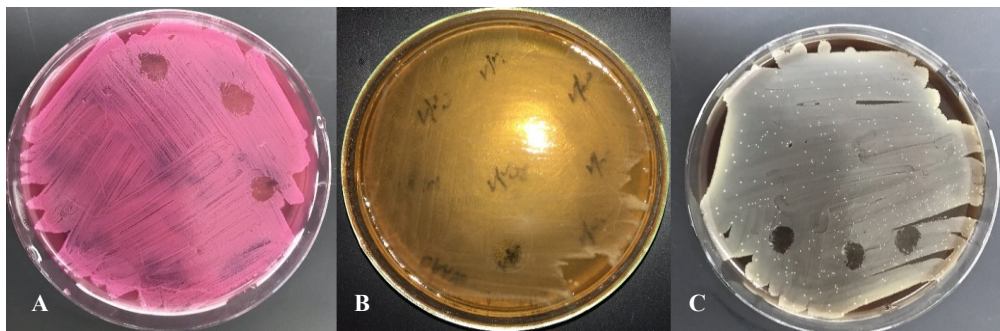


Figura 1. Determinação da atividade antimicrobiana de extrato de cravo-da-índia, de acordo com a metodologia proposta A-400 UA mL<sup>-1</sup> (*Escherichia coli* (ATCC 10536)). B-100 UA mL<sup>-1</sup> (*Salmonella* spp.). C-400 UA mL<sup>-1</sup> (*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)).

Para os extratos de malva, limão cravo e camomila, não se observou atividade antimicrobiana. Os extratos aquosos apresentam uma menor atividade antimicrobiana em relação aos extratos com solventes orgânicos em razão da solubilização de princípios ativos, conforme resultados obtidos por Carvalho et al. (2014). Desta forma, apenas o extrato de cravo-da-índia foi testado em folhas de alface. Neste experimento, houve redução do número de colônias (UFC mL<sup>-1</sup>) nas três cepas testadas em relação ao controle negativo, em função dos tratamentos com o extrato aquoso de cravo-da-índia (Tabela 1).



Tabela 1. Contagem do número de colônias (UFC mL<sup>-1</sup>) em amostras de alface submetidas ao extrato de cravo-da-índia a 1 %

Espécie	Controle Negativo (UFC/mL)	Controle Positivo* (UFC/mL)	Extrato de cravo-da-índia a 1% (UFC/mL)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	Incontáveis	0	4
<i>Salmonella</i> spp.	Incontáveis	0	60
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	Incontáveis	0	100

\* hipoclorito de sódio a 2,5%.

A medição do pH nas amostras de alface não apresentou variação significativa ( $p < 0,05$ ) quando submetidas ao extrato de cravo-da-índia, em relação ao pH das folhas de alface expostas ao controle negativo (Tabela 2). Este resultado indica que o tratamento não alterou as propriedades químicas das folhas de alface, sem danos aparentes.

Tabela 2. pH das amostras de alface determinadas segundo metodologia da AOAC (2005)

Tratamento	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 7
Água	6,25 Aa	6,09 Aa	6,43 Aa	6,16 Aa	6,78 Aa	6,28 Aa
Hipoclorito de sódio	6,41 Aa	6,27 Aab	6,46 Aab	5,93 Ab	6,37 Aab	6,28 Aab
Cravo-da-índia	6,66 Aa	6,23 Aab	6,50 Aa	5,88 Ab	6,59 Aa	6,36 Aab

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ . Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ .

A determinação de umidade resultou em perda de, aproximadamente, 95%. Em relação à determinação de ácido ascórbico, foi encontrado valor médio de 8,61 mg 100 g<sup>-1</sup> ( $p < 0,05$ ) (dados não mostrados). Os dados da colorimetria estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Dados do teste de colorimetria em folhas de alface submetidas ao tratamento com água potável, hipoclorito de sódio e extrato de cravo-da-índia

Tratamentos	Dia 0	Dia 1	Dia 3	Dia 3	Dia 4	Dia 7
I						
Água	51,64 Aa	59,20 Aa	60,45 Aa	56,59 Aa	50,17 Aa	55,18 Ba
Hipoclorito de sódio	53,18 Aa	58,07 Aa	55,85 Aa	56,95 Aa	58,54 Aa	60,85 Aa
Cravo da índia	49,01 Ab	56,16 Aab	56,02 Aab	55,87 Aab	56,68 Aa	54,82 Bab
A						
Água	-17,72 Aa	-21,94 Cbc	-23,24 Bc	-18,31 Aab	-18,89 Bab	-18,13 Aab
Hipoclorito de sódio	-17,93 Aa	-17,31 Aa	-17,56 Aa	-19,14 Aa	-16,93 Aa	-17,66 Aa
Cravo da índia	-19,30 Aa	-21,12 Ba	-20,9 ABa	-18,76Aa	-18,08 ABa	-18,94 Aa
B						
Água	33,99 Aab	41,63 Aab	46,03 Aa	37,71 Aab	29,58 Ab	34,48 Aab
Hipoclorito de sódio	34,29 Aa	33,69 Ba	32,95 Ba	36,07 Aa	34,66 Aa	35,78 Aa
Cravo da índia	33,17 Aa	38,68 ABa	40,10 Aa	34,64 Aa	33,06 Aa	36,39 Aa

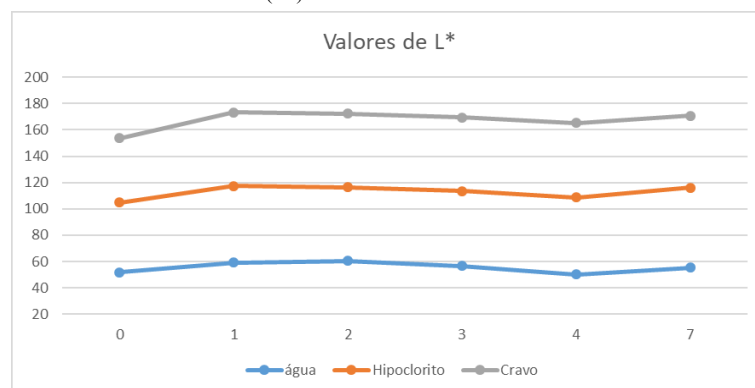
Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ . Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ .

Os valores referentes ao parâmetro de cor L somente diferiram entre os tratamentos no dia 7 com valores de 60,85 para o hipoclorito, superior aos tratamentos com água e cravo da índia, com valores médios de 55,18 e 54,82, respectivamente. Quanto aos dias, somente foram observadas diferenças para o tratamento com cravo da

índia com superioridade do dia 4 em relação ao dia zero, com valores médios de 56,68 e de 49,01, respectivamente. Os demais valores foram intermediários.

Em relação ao parâmetro a, foram observadas diferenças entre os tratamentos para os dias 1 e 4, com valores médios para o dia 1 de -21,94 (água), -17,31 (hipoclorito) e de -21,12 (cravo da índia), valores estes diferentes entre si, com superioridade do hipoclorito, seguido pelo cravo da índia e, por fim, da água. Quanto aos dias, somente foram observadas diferenças para o tratamento água, com o maior valor no dia 0 (-17,72) e o menor valor no dia 2 (-23,24), com os demais dias intermediários. Já para o parâmetro b, somente foram identificadas diferenças entre os tratamentos no dia 1, com o maior valor para água (41,63) e o menor para o tratamento com hipoclorito (33,69). Para os dias, somente foram verificadas diferenças para o tratamento com água, tendo com maior valor o dia 2 (46,03) e o menor valor (29,58) no dia 4. Os demais valores foram intermediários. Durante a vida de prateleira, foram determinados os parâmetros de cor L\*, a\* e b\* visando à determinação das mudanças de cor das amostras estudadas. De forma geral, o parâmetro de L\* (luminosidade ou teor de “branco”) respondeu de forma mais acertada pelo escurecimento e/ou descoloração de um alimento de origem vegetal, principalmente da classe das folhosas (Gráfico).

Gráfico. Comportamento do teor de Luminosidade (L\*) das amostras de alface testadas

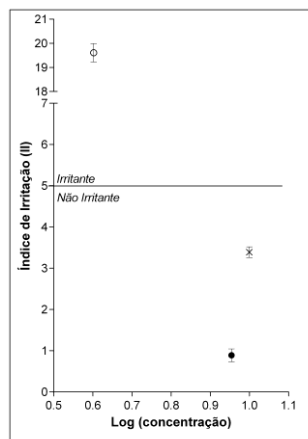


Pode-se verificar que o comportamento da coloração foi similar em todos os tratamentos. Do primeiro dia de armazenamento (dia zero) ao segundo dia de armazenamento (dia 1), houve sensível alteração de cor (tendendo ao escurecimento – aumento dos valores de L\*), que foi mantida até o quarto dia de armazenamento. Na sequência, pôde ser percebido um aumento dos valores de L quando analisado o sétimo dia de armazenamento, porém sem variações significativas ( $p < 0,05$ ). Este

comportamento de pouca alteração de cor segue fielmente os mecanismos de fisiologia pós-colheita de vegetais (Araújo, 2012).

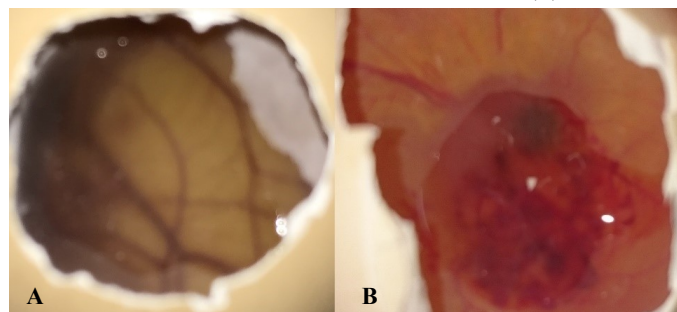
Os resultados do II do extrato de cravo-da-índia indicaram que o produto não causa irritação na membrana cório-alantoide, podendo ser usado para consumo humano (Figuras 2 e 3). Os estudos de citotoxicidade baseiam-se na relação entre a dose e a estrutura química dos compostos. Assim, estudos toxicológicos utilizando modelos como o teste de HET-CAM permitem determinar o perfil de permeação destes compostos e discriminar os vários níveis de toxicidade pelo cálculo do II. O HET-CAM é um teste muito sensível para determinar os parâmetros toxicológicos, assim, o uso de tal metodologia mostra-se aceitável, tornando-se uma alternativa a outros *in vivo* (ICCVAM, 2010; Bubalo et al., 2015 e Tsarpali et al., 2015). O uso de um extrato à base de um condimento já utilizado na alimentação humana reduz riscos de toxidez a humanos, por isso, estes extratos foram feitos em meio aquoso para que pudessem mimetizar as condições encontradas nas casas das pessoas. Os resultados obtidos no presente estudo para o cravo-da-índia corroboram esta afirmação, visto que este produto não causou irritação, ao contrário do hipoclorito de sódio.

Figura2. Relação dose-resposta para o extrato de cravo-da-índia



Extrato de cravo-da-índia (x); controle negativo (0,9% NaCl) (●) e controle positivo (0,1 NaOH) (○). Cada ponto representa um experimento (n = 3 ovos). Concentrações foram transformadas logaritmicamente: 0,0 a 1,0.

Figura 3. Teste de HET-CAM com extrato de cravo-da-índia a 1% (A) e NaOH a 0,1 M (B)



Este estudo comprovou a eficácia do extrato aquoso de cravo-da-índia em relação à inibição do crescimento de bactérias de interesse clínico, relacionadas a casos de intoxicação alimentar. Estudos anteriores corroboram os resultados encontrados nesta pesquisa (Bhalodia e Shukla, 2011; Al-Hashimi, 2012 e Mostafa et al., 2016).

A inibição de cepas de *Salmonella* spp., *E.coli* e *S. aureus* pode ser considerada uma medida profilática de grande importância do ponto de vista da epidemiologia, tendo em vista diminuir os casos de intoxicação alimentar. O extrato de cravo-da-índia aquoso a 1% pode ser utilizado na higienização de alface para o consumo fresco, evitando problemas de intoxicação alimentar por agentes patogênicos, o que impedirá complicações na saúde das pessoas.

A utilização de extrato de cravo-da-índia como conservante de alimentos não alterou de forma significativa o pH das folhas de alface, bem como a concentração de vitamina C, nem a cor. De acordo com a literatura, os valores encontrados são semelhantes (Martins e Riella, 1993; Oliveira e Marchine, 1998 e Coria-Cayupan et al., 2009).

### 3.4 Conclusão

Os resultados encontrados nesta pesquisa remetem ao potencial antibacteriano do extrato de cravo-da-índia, apresentando a grande vantagem de ser natural, de fácil obtenção e sem efeitos nocivos à saúde. Este alimento faz parte da culinária brasileira, outro fator facilitador para seu uso com esta finalidade, substituindo o hipoclorito de sódio. Desta forma, a praticidade de utilização do cravo-da-índia pode contribuir para a diminuição de casos de intoxicação alimentar, quando usado de acordo com esta pesquisa.

### 3.5 Referências

- Al-Hashimi, A.G. 2012. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. *Afr. J. Food Sci.* 6:506-511.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. *Official methods of analysis of AOAC International*. 18.ed. Washington.
- Araújo, J.M.A. 2012. *Química de Alimentos. Teoria e Prática*. 5.ed. Universidade Federal de Viçosa, p.416-419.

- Barker, S.F., O'toole, J., Sinclair, M.I. and Leder, K., Malawaraarachchi, M. and Hamilton, A.J. 2013. A probabilistic model of norovirus disease burden associated with greywater irrigation of home-produced lettuce in Melbourne, Australia. *Wat Res*, 47:1421-1432.
- Bhalodia, N.R and Shukla, V.J. 2011. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* l.: an ethnomedicinal plant. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2:104–109.
- Bizzo, H.R., Hovell, A.M.C. and Rezende, C.M. 2009. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quím Nov*, 32(3):588-594.
- Bubalo, M.C., Radošević, K., Srček, V.G., Das, R.N., Popelier, P. and Roy, K. 2015. Cytotoxicity towards CCO cells of imidazolium ionic liquids with functionalized side chains: preliminary QSTR modeling using regression and classification based approaches. *Ecotoxicol Environ Saf*. 112: 22-28.
- Brasil. EMBRAPA/SEBRAE. (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/ Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. 2010. *Catálogo Brasileiro de Hortaliças: saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no País*. Brasília: EMBRAPA/SEBRAE. 59p.
- Caldera, L. and Franzetti, L. 2013. Effect of storage temperature on the microbial composition of ready-to-use vegetables. *Cur Microb*, 68:133-139.
- Carvalho, A.F., Silva, D.M., Silva, T.R.C., Scarcelli, E. and Manhani, M.R. 2014. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólicos e de ciclo hexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). *Rev Bras Pl Med*, 16(3):521-526.
- Coria-Cayupán, Y.S., Pinto, M.I.S. and Nazareno, M.A. 2009. Variations in bioactive substance contents and crop yields of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivated in soils with different fertilization treatments. *J Agr Food Chem*, 21(57):10122-10129.
- Devi, K.P., Nisha, S.A., Sakthivel, R. and Pandian, S.K. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J Ethnopharm*, 130:107-115.
- Di Carli, M., De Rossi, P., Paganin, P., Del Fiore, A., Lecce, F., Capodicasa, C., Bianco, L., Perrotta, G., Mengoni, A., Bacci, G., Daroda, L., Dalmastrri, C., Donini, M. and Bevivino, A. 2016. Bacterial community and proteome analysis of fresh-cut lettuce as affected by packaging. *FEMS Microb Let*. 363:1-7.
- Godoy, H.T., Duarte, M.C.T., Wagner, R. and Scherer, R. 2009. Composição e atividades antioxidantes e antimicrobianas dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarrosa. *Rev Bras Plant Medic*, 11(4):442-449.
- Gonzalez, J.C., Janin, G., Santoro, A.C.S., Costa, A.F. and Valle, A.T. 2001. *Colorimetria quantitativa: uma técnica objetiva de determinar a cor da madeira*. Bras Florest. Brasília-DF. 72:47-58.
- ICCVMA (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). 2010. *The Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method*. Research Triangle Park: National Toxicology Program.
- Instituto Adolfo Lutz. 1985. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3.ed. São Paulo: IMESP, 1:21-22.
- Leff, J.W. and Fierer, N. 2013. *Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables*. PLoS One.

- Lorenzi, H. and Matos, F.J.A. 2002. *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Editora Nova Odessa, São Paulo. 512p.
- Martins, C. and Riella, M.C. 1993. *Composição e valor nutritivo dos alimentos*. In: Riella, M.C. Suporte nutricional parenteral e enteral. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 416-431.
- Mostafa, A.A., Al-Askar, A.A., Almaary, K.S., Dawoud, T.M., Sholkamy, E.M. and Bakri, M.M. 2016. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi J. Biol. Sci.* 25:361–366.
- Muller. M., Irkens-Kiesecker, U. and Rubinstein, B. 1996. On the mechanism of hyperacidification in lemon: Comparison of the vacuolar H(+)-ATPase activities of fruits and epicotyls. *J Biol Chem*, 271:1916-1924.
- Naghbi, F., Mosaddegh, M., Motamed, M.S. and Ghorbani, A. 2005. Labiatae family in folk medicine in Iran from Ethnobotany to Pharmacology. *Iran J Pharm Res*, 2:63-79.
- Oliveira, J.E.D. and Marchine, J.S. 1998. *Ciências nutricionais*. São Paulo: Sarvier. 403p.
- Rampilli, M. and Andreini, R. 1991. Evaluation of colour components in sterilized milk. *Ital J Food Sci*, 4:285-291.
- Strohecker, R. and Henning, H.M. 1967. *Analisis de vitaminas: metodos comprobados*. Madrid: Paz Montalvo. 428p.
- Tsarpali, V., Belavgeni, A. and Dailianis, S. 2015. Investigation of toxic effects of imidazolium ionic liquids, [bmim][BF<sub>4</sub>] and [omim][BF<sub>4</sub>], on marine mussel *Mytilus galloprovincialis* with or without the presence of conventional solvents, such as acetone. *Aquat Toxicol*, 164:72-80.
- Wang, Y.M., Kong, L.C., Liu, J. and Ma, H.X. 2018. Synergistic effect of eugenol with Colistin against clinical isolated Colistin-resistant *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Resist Infect Control*, 7:17-26.
- Yadav, M.K., Chae, S.W., Im, G.J., Chung, J.W. and Song, J.J. 2015. Eugenol: A Phyto-Compound Effective against Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Clinical Strain Biofilms. *PLoS ONE*, 10:1-21.