

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

CARIN GERHARDT

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CÍTRICOS PROVENIENTES DE
SISTEMAS DE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BASE AGROECOLÓGICA**

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

CARIN GERHARDT

Engenheira de Alimentos – UFRGS/2010

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CÍTRICOS PROVENIENTES DE
SISTEMAS DE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BASE AGROECOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Maria Wiest

Co-orientadora: Prof. Dr. Magnólia
Aparecida Silva da Silva

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Gerhardt, Carin

Avaliação da atividade antibacteriana de cítricos provenientes de sistemas de produção orgânica de base agroecológica / Carin Gerhardt. -- 2013.
114 f.

Orientador: José Maria Wiest.

Coorientadora: Magnólia Aparecida Silva da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Atividade antibacteriana. 2. Citros. 3. Agroecológicos. 4. Extratos etanólicos. 5. Óleos essenciais. I. Wiest, José Maria, orient. II. da Silva, Magnólia Aparecida Silva, coorient. III. Título.

Carin Gerhardt
Engenheira de Alimentos

Dissertação

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CÍTRICOS PROVENIENTES DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BASE AGROECOLÓGICA

submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:

Homologada em:

Pela Banca Examinadora:

Por:

JOSÉ MARIA WIEST

Orientador – Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de
Alimentos/UFRGS

MARCO ANTÔNIO ZÁCHIA AYUB

Coordenador do PPGCTA

INGRID BERGMAN I. DE BARROS

Banca – Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia /UFRGS

VITOR MANFROI

Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos/UFRGS

CACIANO P. Z. NOREÑA

Banca – Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFRGS

FABIANA THOMÉ DA CRUZ

Banca – Pós-Doutoranda CAPES do
Programa de Pós-Graduação em
Desenvolvimento Rural/UFRGS

Dedico este trabalho a todos aqueles que puderem se beneficiar, de alguma forma, de sua análise e de seus resultados, e ao meu pé de bergamota, que gerou tantos frutos ao longo da minha infância em Montenegro/RS e foi fonte de inspiração.

“The most beautiful and most profound experience is the sensation of the mystical. It is the sower of all true science. He to whom this emotion is a stranger, who can no longer wonder and stand rapt in awe, is as good as dead. To know that what is impenetrable to us really exists, manifesting itself as the highest wisdom and the most radiant beauty which our dull faculties can comprehend only in their primitive forms - this knowledge, this feeling is at the center of true religiousness.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação só foi possível através da ajuda direta ou indireta de inúmeras pessoas, que contribuíram tanto com o seu conhecimento e suas habilidades, quanto com seu apoio afetivo. Eu sou realmente muito grata a todas elas, não apenas pela imensa ajuda, mas por me mostrarem algo muito humano: a vontade de ajudar os outros.

Agradeço primeiramente a Deus, por ser a maior fonte de inspiração da minha vida, por me mostrar a verdade e a beleza de tudo o que existe, por me dar a certeza, a confiança e a paz de saber que tudo está onde devia estar. Agradeço, também, por ter tido a oportunidade de conviver com as pessoas que listo abaixo, que auxiliaram na minha caminhada e evolução profissional e pessoal.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. José Maria Wiest, pelo apoio, carinho, pela confiança, e por compartilhar comigo seus conhecimentos, seu amor ao ensino e a sua visão única da vida e da natureza, a qual também adquiri ao longo dos mais de cinco anos que convivi no laboratório de Higiene de Alimentos, do ICTA. Todos esses anos foram e estão sendo determinantes nas minhas escolhas. Junto a ele, quero agradecer especialmente aos bolsistas, mestrandos e doutorandos, que tornaram tantas vezes o meu dia mais alegre e leve, e que dividiram tantas coisas comigo: sua ajuda, sua atenção, sua conversa, o seu apoio. Entre eles: Giovani Girolometto, Jossielen P. Nascimento, Mirela Schein, Gabriela Peterle, Aline C. Vieira, Simone Weschenfelder, Raquel T. Czamanski, Jussara E. S. Figueiredo, e Antonio José Elísio. Agradeço à Prof. Dr. Magnólia A. S. da Silva, minha coorientadora, pela interminável disposição em me orientar e auxiliar e pela amizade.

Àqueles que emprestaram ou doaram materiais, agradeço especialmente à Cooperativa dos Citricultores Ecológicos do Vale do Caí, Ecocitrus, pela doação dos óleos essenciais; ao produtor Sr. Gerson Boettcher, de Pareci Novo, RS, pela doação de frutas; ao laboratório de Bromatologia, em especial ao técnico Roberval B. de Souza pela amizade e ajuda; ao técnico Edegar Pimentel, por cuidar diariamente nos nossos equipamentos e permitir, muitas vezes, a realização dos

experimentos; e ao Márcio Rohan, bibliotecário do ICTA, pelo apoio, ajuda e amizade ao longo desses tantos anos dentro do Instituto.

Agradeço ao Prof. Caciano P. Z. Noreña pelo auxílio nas análises estatísticas, conselhos e pela amizade; ao Prof. César A. M. Avancini pelo auxílio nas questões farmacológicas, e também, pela amizade; aos Prof. Adriano Brandelli, Prof. Alessandro de O. Rios e Prof. Plínio F. Hertz, que auxiliaram através de informações, esclarecimentos, ou doação de materiais; aos professores do ICTA de uma forma geral, que contribuíram à minha formação profissional desde o início do curso de Engenharia de Alimentos até a finalização do mestrado.

Agradeço ao Núcleo de Apoio Estatístico da UFRGS (NAE), em particular à Prof. Jandyra M. G. Fachel e ao bolsista Facundo Zaffaroni, o qual me auxiliou inclusive durante as suas férias e finais de semana.

À minha família e ao meu namorado, agradeço pela imensa compreensão, pelo apoio, pelos conselhos, pelas revisões gramaticais e, principalmente, pelo amor que me deram e dão todos os dias, tornando-os tão mais tranquilos, bonitos e especiais. Essa dissertação nunca teria sido possível sem o apoio e o incentivo de vocês, especialmente dos meus pais, pelo valor que sempre deram ao conhecimento, à formação e à educação.

Sinto uma gratidão imensa por todas essas pessoas e também por tantas outras não listadas que também contribuíram para a realização deste trabalho, das quais guardo um carinho especial.

RESUMO

Atualmente, há uma demanda crescente por agentes antimicrobianos de origem natural, principalmente nos setores de alimentos e cosméticos, acompanhando o aumento da busca por produtos mais naturais e menos prejudiciais à saúde e ao meio ambiente. Alinhada a essa tendência, a produção e processamento de alimentos provenientes de sistemas agroecológicos carece de insumos para os processos de desinfecção, utilizando muitas vezes desinfetantes convencionais, como os clorados. Inúmeros estudos prospectivos, entretanto, indicam a existência de ação antimicrobiana em diversas fontes vegetais, como as frutas cítricas, largamente cultivadas no Brasil. Sua cadeia gera toneladas de resíduos com potencial de ação antimicrobiana, como cascas e frutos verdes. Há evidências de que vegetais cultivados ecologicamente possuem maior quantidade de substâncias antimicrobianas, porém há poucos estudos nesse sentido. Em razão disso, o objetivo do estudo foi determinar a atividade antibacteriana de extratos etanólicos e óleos essenciais de cascas e frutos de citros verdes e maduros cultivados segundo princípios agroecológicos e identificar os compostos químicos responsáveis por essa atividade. Para tanto, foram obtidos frutos verdes e cascas de laranjas 'Valência', de tangerinas 'Ponkan' e 'Montenegrina', de limão 'Cravo' (ou limão 'Bergamota') e de pomelo, cultivados em sistemas agroecológicos, e foram preparados extratos etanólicos brutos a partir do material fresco e triturado. Óleos essenciais de citros foram fornecidos pela cooperativa de citricultores orgânicos do Vale do Caí/RS (Ecocitrus). A atividade antibacteriana *in vitro* foi avaliada pelo método de macrodiluição quanto à Concentração Inibitória Mínima (CIM) e à Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente a cinco diferentes linhagens bacterianas e por testes de suspensão. Para a investigação dos componentes dos extratos relacionados a esta ação, foi determinada a acidez total e a concentração de ácido ascórbico por titulações com NaOH 0,1 M e 2,6-diclorofenol indofenol, respectivamente. A determinação da composição química dos óleos foi conduzida em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas. Todos os extratos etanólicos exibiram ação antibacteriana, com destaque para os extratos de frutos inteiros verdes, principalmente de limão 'Cravo' e de tangerinas. A acidez total teve relação direta com a intensidade da atividade antimicrobiana, indicando que entre os componentes analisados, os mais ativos foram ácidos orgânicos. Detectou-se atividade sinérgica entre componentes do limão 'Cravo', já que o extrato do fruto inteiro foi mais ativo do que os de suas partes. Testes de suspensão *in vitro* com extrato de tangerina 'Montenegrina' verde demonstraram forte ação bactericida (redução de 7 a 8 log UFC/ml) em tempos usuais de contato (30 min.). Os óleos essenciais agiram especificamente sobre *Enterococcus faecalis*, com valores de CBM próximos a 0,5% (v/v). O óleo de limão também foi efetivo contra *S. aureus* (CBM de 0,75% v/v), porém a ação bactericida dos óleos foi geralmente baixa ou inexistente ($\geq 8\%$ v/v), resultando em pouca aplicabilidade em alimentos e cosméticos. Os resultados encontrados indicam grande potencial de utilização de extratos de frutos verdes, descartados no período de raleio de árvores cítricas, como agentes antibacterianos nos processos de desinfecção e na conservação.

Palavras-chave: CIM; CBM; extratos etanólicos; antimicrobianos naturais; orgânicos.

ABSTRACT

Currently, there is a growing demand for antimicrobial agents of natural origin, mainly in the food and cosmetic fields, which is reflected in the growing search for more natural and green products. The production and processing of organic foods is not associated with the processes of disinfection, which often use conventional products based on chlorine. Numerous prospective studies, however, indicate that various plant sources, such as citrus fruits, which are widely grown in Brazil, exhibit antimicrobial activity. Thus, the processing of these fruits generates a large amount of waste, such as peels and green fruits, with potential antimicrobial activity. There is evidence that ecologically grown plants contain a higher amount of antimicrobial substances than cultivated plants, but few studies have assessed this difference. Thus, the aim of the present study was to determine the antibacterial activity of ethanolic extracts and essential oils of citrus fruit peels and young fruits cultivated under agroecological principles and to identify the chemical compounds responsible for the determined activity. Therefore, organic young fruits and peels of 'Valencia' oranges, 'Ponkan' and 'Montenegrina' tangerines, 'Rangpur' limes, and grapefruits of ecological cultivars were obtained, and crude ethanol extracts were prepared from the fresh ground material. The essential oils of citrus were provided by a cooperative of organic citrus growers from the region of the 'Cai' river valley in Rio Grande do Sul, Brazil. The *in vitro* antibacterial activity was evaluated based on the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against five different bacterial strains using the macrodilution method and through suspension tests. To investigate the chemical components of the extracts responsible for the observed antimicrobial action, the total acidity and the ascorbic acid concentration were determined by titration with 0.1 M NaOH and 2,6-dichlorophenol indophenol, respectively. The determination of the chemical composition of the oils was conducted through gas chromatography coupled to mass spectrometry. All of the ethanolic extracts, particularly those of young 'Rangpur' limes and tangerines, exhibited antibacterial activity. The total acidity was directly related to the intensity of the antimicrobial activity, indicating that the most active of the compounds identified are the organic acids. It can be concluded the components of 'Rangpur' lime exhibit synergistic activity because the young, whole fruit was more active than its parts. The *in vitro* suspension tests performed using the extract of young 'Montenegrina' tangerines exhibited strong bactericidal activity (reduced the bacterial count by 7-8 log CFU/ml) within the usual contact times (30 min). The essential oils acted specifically on *Enterococcus faecalis* with MBC values close to 0.5% (v/v). Lemon oil is also effective against *S. aureus* (MBC = 0.75% v/v). However, the bactericidal effect of most oils was insignificant for food and cosmetic purposes due to their slight or lack of antibacterial activity (MBC \geq 8% v/v). The results indicate the great potential of the young fruits discarded during the thinning of citrus trees as antibacterial agents for disinfection processes and conservation.

Keywords: CIM; CBM; ethanolic extracts; natural antimicrobial; organic system.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Características morfológicas gerais de citros.....23
- Figura 2 - Croqui do sistema FMC de extração de suco de laranja.....27

CAPÍTULO 2

- Fig. 1 - Average MIC and MBC (ml ethanolic extract/ml) of the ethanolic extracts of ripe and green peels and young fruits of four different citrus cultivars managed under agro-ecological systems against five bacterial strains.....62
- Fig. 2 - Bactericidal effect of different concentrations of young 'Montenegrina' mandarin extract on *E. coli*.....63
- Fig. 3 - Bactericidal effect of different concentrations of young 'Montenegrina' mandarin extract on *S. Enteritidis*.....63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Países com maior área de citros orgânico	21
---	----

CAPÍTULO 2

Table 1 - Dry matter (DM) of the crude plant material, dry residue (DR) of the alcoholature, and ethanolic extract concentration (EEC).....	57
Table 2 - Minimum Inhibitory Concentration (MIC, % v/v) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC, % v/v) of the ethanolic extracts of the ripe and green peels and young fruits of four different citrus cultivars managed under agro-ecological systems against five bacterial strains.	58
Table 3 - Ascorbic acid (mg) and citric acid (g) contents in 100 ml of the ethanolic extract of different citrus varieties.....	60
Table 4 – Correlation (r) between the concentration of two different organic acids identified in the ethanolic extracts of ripe and green peels and young fruits of four different citrus cultivars managed under agro-ecological systems and its MBC values for five different bacterial strains.....	61

CAPÍTULO 3

Table 1 - Minimum Bactericidal Concentration (MBC, % v/v) of the essential oils of ripe organic Mandarin (GM), young organic Mandarin (RM) (<i>Citrus deliciosa</i> Tenore), organic Lime (L) (<i>Citrus × latifolia</i> Tanaka) and organic Orange (O) (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck) against five bacterial strains.....	84
Table 2 - Chemical composition (% relative) of the essential oils of young organic Mandarin (GM), ripe organic Mandarin (RM) (<i>Citrus deliciosa</i> Tenore), organic Lime (L) (<i>Citrus × latifolia</i> Tanaka) and organic Orange (O) (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)...	85

APÊNDICE A

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM, % v/v) e Concentração Bactericida Mínima (CBM, % v/v) de extratos etanólicos brutos ressuspensos de cascas maduras e frutos verdes inteiros de tangerina ‘Montenegrina’, tangerina ‘Ponkan’, limão ‘Cravo’ e laranja ‘Valência’ frente a <i>E. coli</i>	110
Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM, % v/v) e Concentração Bactericida Mínima (CBM, % v/v) de extratos etanólicos brutos ressuspensos de cascas maduras e frutos verdes inteiros de tangerina ‘Montenegrina’, tangerina ‘Ponkan’, limão ‘Cravo’ e laranja ‘Valência’ frente a <i>P. aeruginosa</i>	111
Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima (CIM, % v/v) e Concentração Bactericida Mínima (CBM, % v/v) de extratos etanólicos brutos ressuspensos de cascas maduras e frutos verdes inteiros de tangerina ‘Montenegrina’, tangerina ‘Ponkan’, limão ‘Cravo’ e laranja ‘Valência’ frente a <i>S. Enteritidis</i>	112
Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM, % v/v) e Concentração Bactericida Mínima (CBM, % v/v) de extratos etanólicos brutos ressuspensos de cascas maduras e frutos verdes inteiros de tangerina ‘Montenegrina’, tangerina ‘Ponkan’, limão ‘Cravo’ e laranja ‘Valência’ frente a <i>E. faecalis</i>	113
Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM, % v/v) e Concentração Bactericida Mínima (CBM, % v/v) de extratos etanólicos brutos ressuspensos de cascas maduras e frutos verdes inteiros de tangerina ‘Montenegrina’, tangerina ‘Ponkan’, limão ‘Cravo’ e laranja ‘Valência’ frente a <i>S. aureus</i>	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CFU – Colony-Forming Unit

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DM – Dry Matter

DR – Dry Residue

DTAs – Doenças Transmitidas por Alimentos

DVG - German Veterinary Society

EEC – Ethanolic Extract Concentration

EO – Essential Oil

FDA – U.S. Food and Drug Administration

GRAS – Generally Recognized as Safe

IFOAM – International Federation of Organic Agriculture Movements

MBC – Minimum Bactericidal Concentration

MHB – Mueller-Hinton Broth

MIC – Minimum Inhibitory Concentration

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

OGM – Organismos Geneticamente Modificados

SOLAW - *State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture*

UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivos gerais	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Agroecologia e agriculturas ecológicas	17
3.1.1. <i>Importância econômica</i>	19
3.2. Citros	22
3.2.1. <i>Origem e características</i>	22
3.2.2. <i>Importância econômica</i>	24
3.2.3. <i>Geração de resíduos na cadeia de citros</i>	26
3.3. Antimicrobianos naturais	28
3.4. Doenças transmitidas por alimentos	30
3.5. Antibacterianos naturais de cítricos na perspectiva da produção ecológica e segurança de alimentos	32
CAPÍTULO 2	33
ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE CRUDE EXTRACTS OF AGRO- ECOLOGICAL <i>CITRUS</i> BY-PRODUCTS	33
CAPÍTULO 3	64
COMPOSITION AND BACTERICIDAL ACTIVITY OF CITRUS ESSENTIAL OILS FROM AN ORGANIC CULTIVATION SYSTEM	64
CAPÍTULO 4	86
APROVEITAMENTO DA CASCA DE CITROS NA PERSPECTIVA DE ALIMENTOS: PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	86
CAPÍTULO 5	94
1. DISCUSSÃO GERAL	95

REFERÊNCIAS.....99

APÊNDICE A110

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem-se verificado o aumento crescente da busca de alimentos mais saudáveis, naturais e menos processados, isentos de agrotóxicos e substâncias estranhas aos consumidores. Tanto o aumento do número de pesquisas associando o desenvolvimento de doenças à ingestão de determinados insumos quanto a maior difusão do conhecimento estão aumentando o nível de desconfiança em relação aos alimentos. Apesar de desprezados por uma parcela de consumidores, muitos dos recursos tecnológicos, como os aditivos, são responsáveis por manter ou aumentar sua qualidade e segurança. A utilização de substâncias que reduzem a contaminação microbiana ou a inibem, por exemplo, é de extrema importância na prevenção de doenças. Nesse sentido, existe uma grande e crescente demanda por novos processos e insumos que atendam às necessidades dessa cadeia produtiva.

O desenvolvimento de insumos alternativos não tem acompanhado esse crescimento, exigindo por parte dos produtores e processadores de alimentos a utilização de produtos convencionais. Derivados do cloro continuam sendo utilizados nos processos de desinfecção dentro da cadeia produtiva de orgânicos devido à escassez de insumos, mesmo sendo relacionado a problemas de saúde e impactos ambientais. Apesar disso, antimicrobianos naturais são facilmente obtidos no reino vegetal e podem ser alternativas na conservação e desinfecção de alimentos.

Na natureza, há uma série de substâncias com comprovada atividade antibacteriana, como compostos fenólicos, terpenos, alcaloides e polipeptídeos (COWAN, 1999). Diversos estudos do grupo de pesquisa “Alimentos de Origem Animal”, Diretório dos grupos de pesquisa do CNPq, prospectaram diversas fontes de antimicrobianos naturais derivados de plantas (WIEST et al., 2009a,b,c; CARVALHO; CRUZ; WIEST, 2005; GIROLOMETTO et al., 2009). Agricultores ecológicos já utilizam extratos de plantas e seus princípios ativos no controle e prevenção de pragas na lavoura, porém essas propriedades são pouco exploradas ao longo da cadeia produtiva de alimentos. Esses extratos vegetais poderiam ser, portanto, alternativas aos insumos convencionais.

A utilização desses extratos como aditivos alimentares naturais tem chamado a atenção da indústria, já que muitos deles estão sendo considerados GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (OUATTARA; MAFU, 2003), conforme se pode observar no “GRAS Notice Inventory” (FOOD AND DRUG..., 2013). Isso significa que são isentos de avaliação pré-comercialização e de requerimentos necessários aos aditivos alimentares não GRAS para sua aprovação (FOOD AND DRUG..., 2004). Além disso, extratos vegetais são aprovados pela legislação brasileira de orgânicos para uso em processos de desinfecção. A Instrução Normativa nº 18, que aprova o regulamento técnico de processamento de produtos orgânicos, permite a utilização desses extratos nos processos de higienização de instalações, equipamentos e para contato direto com alimentos (BRASIL, 2009a).

Na busca de fontes de antimicrobianos naturais abundantes, de fácil acesso e de baixo custo, verificou-se um potencial para utilização dos resíduos da cadeia de citros, considerando que o país é o segundo maior produtor do mundo, com uma produção média de 21 milhões de toneladas anuais (FOOD AND AGRICULTURE..., 2013). Essa cadeia gera, anualmente, milhares de toneladas de resíduos, estes ricos em compostos bioativos, que precisam ser aproveitados pelo seu viés econômico e ambiental. Os resíduos consistem de cascas, sementes, polpa e tecidos vegetais, bem como de águas residuais, os quais são transformados basicamente em farelo de polpa cítrica (destinado à alimentação animal), óleo essencial extraído a frio, e outros óleos destilados, como terpenos e D-limoneno (NEVES, 2011). Há um grande potencial de para sua aplicação na indústria agroalimentar e farmacêutica, já que eles são ricos em substâncias antioxidantes e antimicrobianas (ESPINA et al., 2011; SETTANI; PALAZZOLO; GUARRASI, 2012; FISHER; PHILLIPS, 2008) de baixa toxicidade (IPPOLITO; NIGRO, 2005). Além dessas características, muitas dessas substâncias são ligadas a diversos benefícios à saúde, como a pectina, os flavonoides e o ácido ascórbico (MEDEIROS et al., 2009, NANGIA-MAKKER et al., 2002; BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008; ARRIGONI; DE TULLIO, 2002).

A atividade antibacteriana de substâncias presentes em citros já é bastante documentada (ASHOK KUMAR et al., 2011; GIRENNAVAR et al., 2008; BELLETTI et al. 2004; CACCIONI et al., 1998; FISHER; PHILLIPS, 2006). Contudo, a atividade de óleos e extratos de citros cultivados sob sistemas de produção agroecológicos é

ainda desconhecida. Há estudos que indicam que plantas cultivadas organicamente possuem maior concentração de compostos antimicrobianos, como fenóis, quando comparados com aqueles manejados de forma convencional (ASAMI et al., 2003; CARIS-VEYRAT et al., 2004).

Considerando essas questões, este trabalho se propõe a investigar a atividade bacteriostática e bactericida de extratos etanólicos brutos e óleos essenciais de citros na perspectiva da conservação e desinfecção em alimentos, bem como determinar suas composições químicas, visando o aproveitamento dos resíduos gerados pela cadeia citrícola.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Prospectar recursos naturais antibacterianos a partir de resíduos de citros proveniente de sistemas ecológicos de cultivo na perspectiva da agroindústria de alimentos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos etanólicos brutos de cascas de frutos maduros e de frutos verdes inteiros de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osbeck), tangerinas 'Ponkan' (*Citrus reticulata* Blanco) e 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Tenore), pomelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) e limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), cultivados sob sistemas de produção ecológicos, frente aos patógenos alimentares *Escherichia coli* (ATCC® 25992), *Salmonella* Enteritidis (ATCC® 13076), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212), bem como *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853);
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de óleos essenciais orgânicos de tangerinas 'Montenegrina' verdes e maduras (*Citrus deliciosa* Tenore), laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck var. 'Valencia') e limas 'Tahiti' (*Citrus × latifolia* Tanaka);
- Determinar a atividade bactericida dos extratos com menor CBM ao longo do tempo;
- Determinar compostos químicos responsáveis pela ação antibacteriana de óleos essenciais e extratos etanólicos de citros.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AGROECOLOGIA E AGRICULTURAS ECOLÓGICAS

O termo “agroecologia” tem gerado um intenso debate conceitual ao longo das últimas décadas. Segundo o Marco Referencial em Agroecologia, elaborado pela Embrapa, ele foi cunhado para orientar a agricultura à sustentabilidade no seu sentido multidimensional, cumprindo com a sustentabilidade econômica (potencial de renda e trabalho, acesso ao mercado), ecológica (manutenção ou melhoria da qualidade dos recursos naturais e das relações ecológicas de cada ecossistema), social (inclusão das populações mais pobres e segurança alimentar), cultural (respeito às culturas tradicionais), política (organização para a mudança e participação nas decisões) e ética (valores morais transcendentais) (EMBRAPA, 2006). O conceito estabelecido por esse manual é:

A Agroecologia é um campo de conhecimento transdisciplinar que contém os princípios teóricos e metodológicos básicos para possibilitar o desenho e o manejo de agroecossistemas sustentáveis e, além disso, contribuir para a conservação da agrobiodiversidade e da biodiversidade em geral, assim como dos demais recursos naturais e meios de vida (EMBRAPA, 2006).

É um referencial teórico baseado no funcionamento dos ecossistemas naturais, no manejo tradicional e indígena dos agroecossistemas e no conhecimento científico, sendo aplicado e construído segundo as realidades locais. Em relação aos seus aspectos técnicos, Altieri (2009) engloba três elementos básicos para a estratégia agroecológica: a conservação e regeneração dos recursos naturais, como água, solo, recursos genéticos, fauna e flora benéficas; o manejo de recursos produtivos que representem a diversificação, reciclagem de nutrientes e da matéria orgânica e regulação biótica; e a implementação de elementos técnicos, como a definição das técnicas e do nível de implementação.

Agriculturas Ecológicas não podem ser confundidas com agroecologia, pois estas se referem a práticas ou tecnologias agrícolas definidas e que nem sempre atendem plenamente aos seus princípios. Entre as agriculturas ecológicas podem ser citadas a “Agricultura Natural”, a “Agricultura Orgânica”, a “Agricultura Biológica”

a “Agricultura Biodinâmica” e a “Permacultura”. Estas escolas propõem a aplicação de princípios ecológicos à produção agropecuária, incorporando técnicas para diversificação de sistemas de produção e permitindo conseqüentemente a redução ou substituição do uso de agroquímicos (EMBRAPA, 2006).

O surgimento das agriculturas ecológicas ocorreu de forma descentralizada, impulsionada por diferentes situações políticas, econômicas e sociais. Na sua origem, nasceram como alternativas às técnicas de intensivas de cultivo desenvolvidas por Justus Von Liebig no início do século 20, na Alemanha, que introduziu a adubação com fertilizantes sintéticos. Na Europa, entre 1925 e 1930 foram criados Agricultura Biodinâmica, por Rudolf Steiner, a Agricultura Orgânica, por Albert Howard, e a Agricultura Biológica, por Hans Muller. A partir de 1935, no Japão, surgiu a Agricultura Natural, baseada nas ideias de Fukuoka e Mokiti Okada, a qual teria originado outras diversas agriculturas e métodos, como a permacultura e a agricultura ecológica (EMBRAPA, 2006).

No Brasil, o movimento ecológico surgiu a partir do debate internacional, fora do contexto da agricultura, porém foi inserido na década de 70 por alguns agricultores alternativos (EMBRAPA, 2006). Somente em 2003 esses sistemas de produção foram normatizados, através da lei nº 10.831 (BRASIL, 2003). Segundo o Art. 1º:

Considera-se sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (BRASIL, 2003).

Nesta lei, o conceito abrange os sistemas denominados orgânico, ecológico, biodinâmico, natural, regenerativo, biológico, agroecológico, permacultura e outros

que atendam aos seus princípios. Atualmente, predominam no país as agriculturas orgânica, biodinâmica, natural e ecológica (DULLEY, 2003).

3.1.1 Importância econômica

Os sistemas orgânicos de base agroecológica têm crescido cada vez mais, impulsionados, entre outros, pela busca de alimentos mais naturais, saudáveis e nutritivos (WILLER; KILCHER, 2009). Entre as motivações gerais dos consumidores pode-se citar principalmente preocupações geradas a respeito dos alimentos convencionais, como o uso de aditivos químicos, pesticidas, fertilizantes químicos, hormônios, organismos geneticamente modificados, questões de bem-estar animal, questões ambientais, entre outros (LOCKIE et al., 2002; OUGHTON; RITSON, 2007). Segundo Buainain e Batalha (2007), as motivações dos consumidores brasileiros seriam as saúdes pessoal e familiar, seguidas da não-utilização do uso de agroquímicos, do valor biológico, do sabor e do aroma e, por último, da preocupação com o meio ambiente.

Apesar de ser um mercado de nicho, associado a consumidores com níveis mais elevados de renda e escolaridade e preocupados com a questão ambiental, há um esforço de agências nacionais e internacionais de desenvolvimento para a adoção da Agricultura Orgânica nos países de menor renda. Entre os objetivos, se incluem a segurança dos alimentos, o aumento da renda dos produtores e a interrupção (ou reversão) da degradação ambiental, priorizando a maximização do uso dos recursos e dos conhecimentos locais (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

No mundo, a agricultura orgânica cresce em velocidade bastante superior à indústria de alimentos, considerando o crescimento anual de 15 a 20% comparado a 4 a 5% da indústria (SCIALABBA, 2005). Segundo a publicação anual "The World of Organic Agriculture", desenvolvida pelo IFOAM (*International Federation of Organic Agriculture Movements*) e FiBL (*Research Institute of Organic Agriculture*), a América Latina possui 23% da área mundial cultivada organicamente, onde a Argentina é o país com maior área (4,4 milhões de hectares), depois o Brasil (1,8 milhões de hectares) e o Uruguai (930.965 hectares) (WILLER; KILCHER, 2011). Todos os anos

há um aumento da área orgânica mundial, que já atinge 37,2 milhões de hectares, ou 0,9% da área total agriculturável. A tendência é que esses valores continuem crescendo. Nos Estados Unidos da América, a indústria de orgânicos aumentou suas vendas em 21% em 2006, com previsão de aumentar 18% por ano, em média, entre 2007 e 2010 (WILLER; KILCHER, 2009), o que não ocorreu devido à crise econômica em 2009 (WILLER; KILCHER, 2011).

No Brasil, apesar dessas tendências, o Censo Agropecuário de 2006 demonstrou que o número de estabelecimentos sob cultivo orgânico é ainda pequeno em relação ao total, representado aproximadamente 1,8% (IBGE, 2009). Há, porém, uma grande diversidade de produtos para comercialização, que variam de acordo com a região. Dentre os projetos da Região Sudeste, têm destaque a horticultura, ervas e temperos, café, cana-de-açúcar, frutas, pecuária, cosméticos, derivados de soja e bebidas; na Região Sul, a horticultura, grãos, ervas e temperos, café, frutas, pães, doces e compotas, erva mate, pecuária, óleos essenciais; na Região Nordeste, frutas, grãos, café, cacau, guaraná e pecuária, e pouca horticultura; na região Centro Oeste, pecuária, grãos e horticultura; na Região Norte, borracha, guaraná, ervas e temperos, grãos, frutas, óleo de palma e de babaçu (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

Quanto à área de citros cultivada organicamente no mundo, ela representa 0,6% (50.150 hectares) da área total de citros (8,3 milhões de hectares). Nesses dados, porém, não estão incluídos China, Brasil e Índia, que estão entre os maiores produtores de citros do mundo (WILLER; KILCHER, 2009). Considerando isso, é muito provável que esta área seja ainda maior. A Tabela 1 exhibe os maiores produtores mundiais de citros orgânicos.

Tabela 1 - Países com maior área de citros orgânico

País	Ano	Área cultivada organicamente (ha)
Itália	2007	22.062
Cuba	2008	4.195
EUA	2005	4.107
Gana	2008	3.760
México	2007	3.201
Espanha	2007	3.165
Turquia	2007	2.134
Grécia	2007	1.002
Outros	-	6.528
TOTAL		50.154

Fonte: adaptado de Willer e Kilcher (2009)

Atualmente, há diversos incentivos governamentais à produção orgânica, como os programas de desenvolvimento da Agricultura Orgânica “Pró-Orgânico”, do Ministério da Agricultura, Programa de Aquisição de Alimento (PAA), do Ministério do Desenvolvimento Agrário, Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), do Ministério da Educação, e o Pronaf Agroecologia, do Ministério do Desenvolvimento Agrário. Entre os seus objetivos, estão: incentivo à conversão ao sistema orgânico (Pró-orgânico); incentivo à inserção de orgânicos e agroecológicos da agricultura familiar na alimentação escolar (PNAE) (BRASIL, 2009b) e em grupos em situação de insegurança alimentar (PAA) (BRASIL, 2013); e financiamento de investimentos nos sistemas de produção agroecológicos e orgânicos (PRONAF) (BRASIL, 2012).

O Estado do Rio Grande do Sul (RS) é um estado de base econômica predominantemente agrícola e familiar, consistindo as propriedades familiares 85,6% do número total de estabelecimentos rurais (RIO GRANDE DO SUL, 2011). Há diversos casos de sucesso no Estado de cooperativas de agricultores, muitas vezes familiares, dentro do sistema agroecológico de produção. Entre eles está a Cooperativa dos Citricultores Ecológicos do Vale do Caí (Ecocitrus), fundada em 1994 na cidade de Montenegro por 15 pequenos agricultores. Atualmente, a cooperativa possui 110 associados e uma área de produção de cítricos de 255 hectares. Entre as formas de comercialização estão citros *in natura*, sucos integrais ou concentrados e óleos essenciais (ECOCITRUS, 2013).

3.2 CITROS

3.2.1 Origem e características

As espécies selvagens de *Citrus* são naturais do sudeste da Ásia, das regiões do sub-Himalaia, na Índia, da Nova Caledônia, subregião do complexo de ilhas da Malenésia (a noroeste da Austrália), e da Malásia. Estudos indicam que todos os *Citrus* comestíveis provêm da hibridização e seleção de 3 gêneros selvagens (*C. reticulata* Blanco [tangerina], *C. maxima* (Burm.) Merr. [pomelo] e *C. medica* L. [cidra]) mais duas plantas desconhecidas (MABBERLEY, 1997). A maior parte do conhecimento que se tem deles se deve à difusão ao resto do mundo através da Europa (MABBERLEY, 1997; MANNER et al., 2006), já que podem se adaptar a diversos ambientes tropicais e subtropicais e a diferentes tipos de solos (MANNER et al., 2006). Todos os continentes, exceto a Antártida, possuem condições ambientais para plantar citros (KIMBALL; PARISH; BRADDOCK, 2005).

Os citros são formas modificadas ou especializadas de fruto (hesperidium), gerados por um único ovário (LADANIYA, 2008). Suas características morfológicas variam de acordo com a espécie e cultivar, porém se assemelham por sua relativa esfericidade, presença de flavedo (parte externa da casca) rico em flavonoides e glândulas contendo óleos essenciais, de espessura fina e com pigmentação entre as cores laranja, amarelo e verde (Figura 1). A parte interna da casca contém o albedo, de cor marfim a amarelo-claro e textura esponjosa. A porção comestível consiste de diversos lóculos cobertos por uma película que contém as vesículas de suco (ORTIZ, 2002).

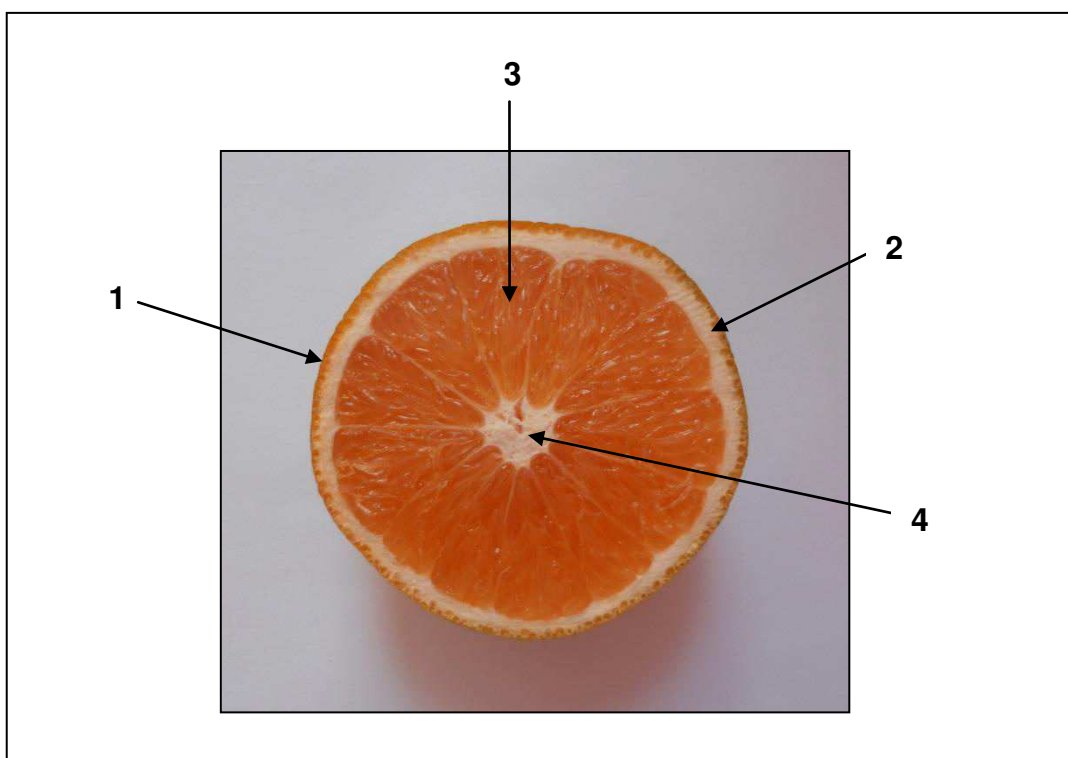


Figura 1 - Características morfológicas gerais de citros. 1 – Flavedo (porção superficial da casca ou epicarpo); 2 – Albedo (porção branca e esponjosa entre a casca ou mesocarpo); 3 – Endocarpo (porção interna da fruta dividida em lóculos ou segmentos contendo as vesículas de suco); 4 – Coluna central ou medula. Fonte: adaptado de Guimarães et al. (2010).

Há uma grande variedade de híbridos de citros gerados de forma espontânea (polinização cruzada) ou artificial devido à grande compatibilidade sexual (ARAÚJO; ROQUE, 2005; ORTIZ, 2002). Isso torna a classificação deste gênero bastante complicada. A classificação botânica de citros comestíveis mais utilizada é a de Swingle e Reece (1967). Ela divide as laranjas comerciais em duas espécies: *Citrus sinensis* L. Osbeck ou laranja doce; e *Citrus aurantium* (L.) Seville, ou laranja azeda. As tangerinas são divididas entre: *Citrus reticulata* Blanco (tangerinas comuns), *Citrus unshiu* Marc. (tangerinas Satsuma), *Citrus deliciosa* Tenore (tangerinas mediterrâneas), *Citrus nobilis* Lourerio (tangerinas King), e *Citrus madurensis* Lourerio (tangerinas calamondin). De uma forma geral, os citros podem ser agrupados de acordo com os seguintes grupos agrônômicos (ORTIZ, 2002):

- a) Laranjas doces;
- b) Laranjas azedas;
- c) Tangerinas;
- d) Limões;

- e) Toronjos;
- f) Pomelos;
- g) Limas;
- h) Cidras;
- i) Híbridos (tangerina híbrida, tangelos, tangor, entre outros).

Segundo Mabberley (1997), já que a morfologia dos citros é muito semelhante, grande parte da sua diferenciação comercial se deve ao sabor. Isso se deve basicamente a diferenças nas proporções relativas de dois estereoisômeros de limoneno, dos quais um é amargo (ex. limão) e outro é doce (ex. tangerinas).

3.2.2 Importância econômica

Os citros estão entre as frutas mais produzidas e consumidas no mundo, principalmente laranjas, tangerinas, limas e limões (OLIVEIRA; EPIFÂNIO; SCIVITTARO, 2008). Na safra de 2009/2010, a produção brasileira foi de 397 milhões de caixas de laranja (40,8 kg/caixa) (NEVES, 2011). Segundo relatório do United States Department of Agriculture (USDA), o Brasil foi o segundo produtor mundial de citros, atrás apenas da China (UNITED STATES..., 2013). É líder na produção de laranjas, representando praticamente 40% da produção mundial na safra 2011/2012. A China deteve 68% da produção mundial de tangerinas, sendo quase toda ela destinada a consumo *in natura*. O México, a Argentina e a União Europeia foram os maiores produtores de limas e limões. Grande parte da colheita brasileira é destinada à produção de suco concentrado de laranja, o qual o Brasil é o maior exportador.

Segundo o USDA, em torno de 40% da safra mundial de laranja em 2012 foi destinada ao processamento (UNITED STATES..., 2013). O Brasil processou 70% da sua produção, principalmente São Paulo e o triângulo mineiro. Semelhantemente ao Brasil, os EUA processaram 75%. Nesses países, o principal destino dessas frutas é a produção de suco concentrado congelado (NEVES, 2011). Outros citros, como tangerinas e limões, seu consumo é principalmente *in natura*.

No país, o Estado de São Paulo é o maior produtor de citros, com 77,4% da produção total (EMBRAPA, 2011). Grande parte da produção brasileira provém do Cinturão Citrícola, composto pelos Estados de Minas Gerais e São Paulo. O Rio Grande do Sul é o 3º Estado produtor de tangerinas, atrás de São Paulo e Paraná (EMBRAPA, 2011). Ele conta hoje com três grandes polos produtores: os vales do Caí e Taquari; fronteira oeste do Estado (principalmente Rosário, Caçapava e São Gabriel); e região do Planalto. Os vales do Caí e Taquari se baseiam principalmente na agricultura familiar. Já a fronteira oeste se voltou a grandes consórcios, produzindo citros de mesa e citros sem sementes (CONSELHO ..., 2008)

Entre as cidades do Vale do Caí, destacam-se Montenegro e São Sebastião do Caí, Harmonia, Pareci Novo, São José do Sul, São José do Hortêncio, Maratá, Brochier, Capela de Santana, Tupandi, Bom Princípio e Portão. Cerca de 4.000 famílias da região têm na citricultura a principal fonte de renda. Além disto, as indústrias envolvidas no beneficiamento e comercialização geram centenas de empregos, sendo importante fonte de renda e emprego a diversos municípios (MONTENEGRO, 2013).

Os grupos agrônômicos e as cultivares mais importantes no RS são (OLIVEIRA et al., 2011):

- a) Laranjas: comum (principalmente cultivares 'Valência' e 'Folha Murcha'), sem acidez ('Lima' ou 'Céu') e umbigo ('Bahia');
- b) Tangerinas: comum ('Ponkan'), bergamota ('Caí', 'Pareci' e 'Montenegrina'), Satsuma e Clementina;
- c) Tangor: 'Murcott' (híbrido natural entre tangerineira e laranjeira) e 'Michal' (cruzamento entre tangerineiras 'Clementina' e 'Dancy');
- d) Limas: 'Tahiti';
- e) Limões: grupo siciliano.

Praticamente não há plantios comerciais de pomelo no RS (OLIVEIRA et al., 2011).

3.2.3 Geração de resíduos na cadeia de citros

Os resíduos da cadeia produtiva de citros e derivados são gerados desde o cultivo até o processamento. Durante o cultivo de alguns citros, principalmente tangerinas, é economicamente interessante e normalmente utilizado o raleio manual ou químico (FALIVENE; HARDY, 2008). Ele consiste da retirada parcial de frutos verdes de diâmetro reduzido, deformados ou doentes, para obtenção de frutos de maior qualidade e tamanho (BANGERTH, 2000) e redução dos gastos com frutos de baixo valor comercial (FALIVENE e HARDY, 2008). Em plantas muito carregadas são retirados aproximadamente 2/3 dos frutos (PANZENHAGEN, 2008). No RS, a remuneração por esses frutos por vezes não compensa, e os frutos acabam sendo deixados no chão (HASSE, 2010). Atualmente, sua principal utilização é para produção de óleos essenciais (casca) e o restante é destinado à alimentação animal (SCHMIDT, 2010).

Na obtenção de suco, o processo mais utilizado no Brasil é o tipo FMC (*Food Machinery Company*) (Figura 2). Esse tipo de equipamento extrai o suco através da movimentação vertical e contrária de dois copos (um inferior, fixo, e outro superior, móvel), realizando a prensagem, a coleta do suco através de um tubo coletor metálico introduzido no fruto, corte e retirada da casca (DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005). Esse processo já inclui a extração do óleo, pois a compressão abre as vesículas da casca e o óleo é removido por lavagem com água. Em geral, o rendimento em peso de suco de frutas cítricas é de 50%, aproximadamente (MCLELLAN; PADILLA-ZAKOUR, 2005), que varia de acordo com os parâmetros da máquina, com a variedade da fruta e a safra. Os 50% restantes são constituídos de casca, membranas, sementes e parte da polpa residual (DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005).

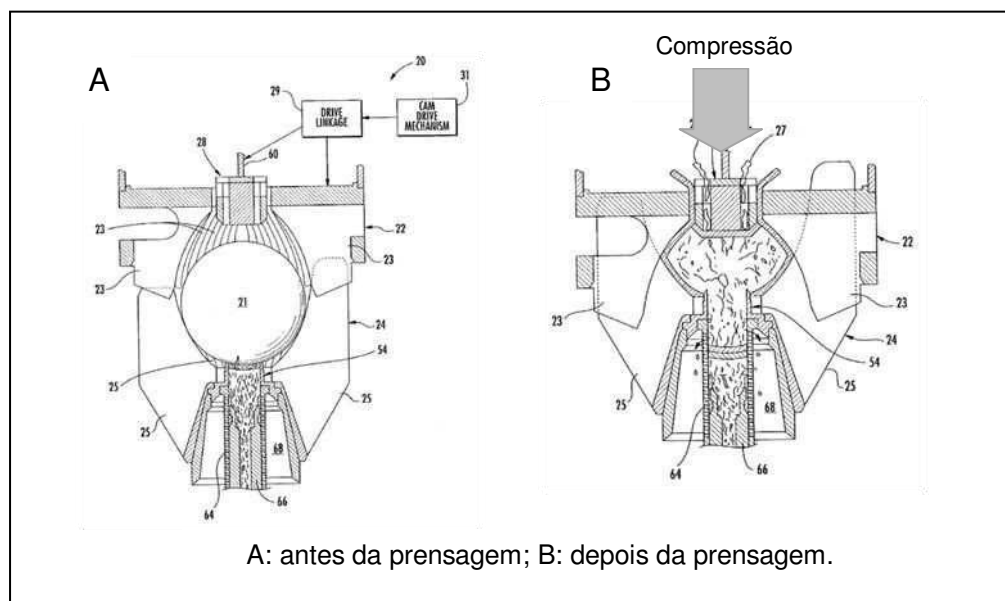


Figura 2 - Croqui do sistema FMC de extração de suco de laranja. Fonte: adaptado de Lokhandwala e Cheng (2004).

De acordo com Neves (2011), a safra de 2009/2010 gerou 851 mil toneladas de subprodutos derivados da laranja. Por isso, o aproveitamento desses subprodutos se torna necessário tanto do ponto de vista econômico quanto do ambiental (LICANDRO; ODIO, 2002; DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005).

Segundo Licandro e Odio (2002), grande parte desses resíduos consiste de água. A porção seca possui basicamente açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose), carboidratos insolúveis (celulose, hemicelulose, protopectina), ácidos orgânicos (cítrico, málico, isocítrico e oxálico) e flavonoides (hesperidina e naringina, dependendo da cultivar). No Brasil, os principais subprodutos de citros comercializados são óleos essenciais e suas frações, como D-limoneno e terpenos, bem como farelo de polpa cítrica (NEVES, 2011).

Óleos de citros podem ser obtidos a partir do fruto inteiro ou a partir da sua casca (DI GIACOMO; DI GIACOMO, 2002). Geralmente ocorrem por abrasão (métodos 'Pellatrici' e 'Brown') ou compressão das cascas ('Sfumatrici' e 'FMC') para abertura das vesículas de óleo. O óleo é retirado por lavagem ou imersão em água e separado por centrifugações e winterização (separação das ceras por redução da temperatura). Estes métodos são realizados a frio, ao contrário de outros óleos obtidos basicamente por hidrodestilação, devido à instabilidade de aldeídos graxos (p. ex. heptanal, octanal) e aldeídos terpênicos (p. ex. neral, geranial, citronelal) à oxidação, gerando compostos com odor ruim (SCHMIDT, 2010).

Outros subprodutos, com D-limoneno e ração animal, são obtidos no processamento da casca úmida recém-extraída. Basicamente, as cascas são prensadas e o líquido residual é destilado para obtenção de D-limoneno. O restante é incorporado às cascas prensadas, passa por uma secagem e é, então, peletizado para destino à alimentação animal (LICANDRO; ODIO, 2002).

Nestes processos, diversos compostos naturais com propriedades bioativas podem ser aproveitados pela indústria de alimentos ou farmacêutica, como fibras, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, cumarinas, psoralenos, flavonoides, limonoides e carotenoides. Muitos estudos demonstraram que essas substâncias possuem atividade antioxidante (FERNANDES-LÓPEZ et al., 2005; XU et al., 2008; BARROS; FERREIRA; GENOVESE, 2012), anticarcinogênica (BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008; NANGIA-MAKKER et al., 2002), e anti-inflamatória (BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997), bem como podem prevenir doenças coronarianas (KRIS-ETHERTON et al., 2002). Além disso, muitas delas apresentaram atividade antimicrobiana, que será explorada no próximo item.

3.3 ANTIMICROBIANOS NATURAIS

Diversas plantas são capazes de produzir substâncias com atividade antimicrobiana. Algumas delas fazem parte do seu metabolismo primário, outras são produto de reações enzimáticas decorrentes de injúria física ou invasão microbiana (fitoalexinas) (ADAMS; SMID, 2003).

Em relação à invasão microbiana, a primeira barreira das plantas contra infecção é de ordem física, impedindo a penetração pela presença de material lipídico (ceras e cutina) nas camadas mais externas. As barreiras químicas se constituem de metabólitos primários, que são aqueles envolvidos na respiração e fotossíntese (ex. ácidos orgânicos), e de metabólitos secundários, não envolvidos diretamente nesses processos (BOUE et al., 2009). As fitoalexinas são metabólitos secundários produzidos em resposta a situações de estresse e ataque microbiano que possuem muitas vezes propriedades antifúngicas ou antibacterianas (BOUE et al., 2009). Esses compostos são agrupados da seguinte maneira: compostos

fenólicos (antocianinas, cumarinas, flavonoides, quinonas e taninos), terpenoides (óleos essenciais, saponinas, esteróis e curcubitacinas), alcaloides, proteínas e peptídeos (AQIL et al., 2006).

Diversos estudos identificaram atividade antimicrobiana de substâncias presentes em citros. Entre elas estão: cumarinas e psoralenos (STANLEY; JURD, 1971; MABRY; ULUBELEN, 1980; JOHANN et al., 2007; GIRENNAVAR et al., 2008); flavonoides (JOHANN et al., 2007; BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997; SALAS et al., 2011) como a quercetina, hesperitina e naringenina, limonoides (VIKRAM et al., 2010; MANNERS, 2007); carotenoides (MOLNÁR et al., 2005; TAO et al., 2010); e ácidos orgânicos (SAMELIS; SOFOS, 2003; NAZER et al., 2005). Além de antimicrobianos, muitas dessas substâncias possuem grande potencial antioxidante (FERNANDES-LÓPEZ et al., 2005; XU et al., 2008; BARROS; FERREIRA; GENOVESE, 2012), agindo comprovadamente como anticarcinogênicos (BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008; NANGIA-MAKKER et al., 2002), antiinflamatórios (BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997), e protegendo contra doenças coronarianas (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Há estudos que aplicaram extratos de citros diretamente em alimentos para verificar a sua ação antioxidante ou desinfetante/conservadora. Sengun e Karapinar (2005) reduziram a contagem de *Salmonella* Typhimurium em rúcula e cebolinha verde entre 1,23 a 4,17 UFC/g utilizando suco de limão. Mexis, Chouliara e Kontominas (2012) encontraram que a combinação de uma mistura comercial de ácidos de citros com um absorvedor de oxigênio aumentaram a vida de prateleira de carne de frango moída embalada em cerca de 5 dias em comparação com amostras embaladas aerobicamente. Fernández-López et al. (2004) adicionaram farinha de casca de laranja e albedo de limão a salsichas e atingiram maior estabilidade à oxidação.

A crescente busca por alimentos mais saudáveis e naturais tem criado uma tendência de substituir antimicrobianos tradicionais no processamento de alimentos, como conservadores e desinfetantes. Os conservantes tradicionais incluem basicamente os ácidos orgânicos e seus derivados, bem como sais (cloreto de sódio, nitrito e nitrato, sulfito). Há muito tempo eles têm sido consumidos de forma segura, porém casos de reações alérgicas e a formação de substâncias carcinogênicas (como as nitrosaminas a partir do nitrito) geram preocupação quanto aos seus efeitos nocivos (ROLLER, 2003). Compostos antimicrobianos de origem

natural têm chamado atenção, já que muitos estão sendo considerados GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (OUATTARA; MAFU, 2003) pelo FDA.

Na desinfecção de alimentos minimamente processados, a substância mais utilizada é o cloro, principalmente devido ao seu baixo custo e alta efetividade. Contudo, há uma tendência atual de eliminação dessa substância nos processos de desinfecção devido a riscos ambientais e de saúde associados ao seu uso (ÖLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009). O cloro pode reagir com a matéria orgânica e formar compostos organoclorados carcinogênicos, como os trihalometanos (HUA; RECKHOW, 2007). Além disso, essa substância é altamente poluidora, contaminando rios, solo e ar, e causando prejuízos à fauna e flora (ÖLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009).

Devido aos riscos expostos, muitas dessas substâncias são proibidas em alimentos orgânicos. A Instrução Normativa Conjunta nº 18, do Ministério da Agricultura, permite a utilização de extratos vegetais na higienização das instalações e equipamentos, bem como na desinfecção de alimentos (BRASIL, 2009a). A legislação também permite o uso de hipoclorito de sódio para ambos os casos, porém sua utilização não é bem aceita pelos produtores e consumidores de orgânicos, bem como seu uso não leva em conta alguns princípios agroecológicos. Na Europa, seu uso é proibido na produção orgânica e, em alguns países, na produção convencional, inclusive (ÖLMEZ; KRETZSCHMAR, 2009). O uso dessas substâncias é, contudo, de extrema importância para evitar doenças transmitidas pelos alimentos, cuja importância será abordada a seguir.

3.4 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

As DTAs são causadas por agentes biológicos, químicos ou físicos, os quais penetram no organismo humano pela ingestão de água ou alimentos contaminados (VAN AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006). Doenças causadas por agentes bacterianos são caracterizadas por diferentes sintomas, geralmente brandos, como diarreias, vômitos, dores corporais e de cabeça, desidratação, e mal estar generalizado (JAY, 2000). Contudo, algumas bactérias como *Escherichia coli*,

Clostridium botulinum e *Listeria monocytogenes* podem causar doenças mais severas, em alguns casos culminando em morte. Em 2011, a bactéria *E. coli* sorotipo O104:H4, de característica enterohemorrágica, foi responsável por um surto com 3816 casos, dentre os quais 54 mortes, na Alemanha (FRANK et al., 2011). Em Missouri, cidade estadunidense, um surto em 1989 envolvendo 243 pessoas e resultando em 4 mortes foi causado por água contaminada com *E. coli* O157:H7 (SWERDLOW et al., 1992).

Nos Estados Unidos da América, a estimativa de custos anuais com DTAs é de 14 bilhões de dólares. Aproximadamente 90% dos casos são causados por cinco patógenos alimentares, entre eles: *Salmonella enterica* não tifoide (3,3 bilhões de dólares), *Campylobacter* spp. (1,7 bilhões de dólares), *Listeria monocytogenes* (2,6 bilhões de dólares), *Toxoplasma gondii* (3 bilhões de dólares) e norovírus (2 bilhões de dólares) (HOFFMANN et al., 2012).

No Brasil, estimativas sobre o impacto econômico das DTAs são praticamente inexistentes. Os custos podem ser diretos ou indiretos, gerando impactos financeiros ao trabalhador, ao empregador e ao sistema de saúde. Segundo Van Amson, Haracemiv e Masson (2006), entre os custos se incluem despesas com serviços médico-hospitalares e com a investigação de surtos, e a redução de dias trabalhados, diminuição da produtividade, diminuição nas vendas e fechamento de empresas. O estudo investigou o custo médio por paciente com enfermidade de origem alimentar no município de Curitiba/PR no ano 2000, que atingiu na época R\$1,87 mil considerando apenas a internação. Naquele ano o impacto econômico, ainda subestimado, seria de R\$1,9 milhões ao município, já que muitos casos não são sequer notificados.

Salmonella spp. tem sido o gênero bacteriano mais envolvido em DTAs no mundo (WORLD..., 2011). No Rio Grande do Sul é o maior responsável por surtos alimentares (COSTALUNGA; TONDO, 2002; GEIMBA et al., 2004). Entre os anos de 1997 a 1999, ela esteve envolvida em 42.45% dos surtos alimentares no Estado (COSTALUNGA; TONDO, 2002). Os principais veículos de *Salmonella* são geralmente alimentos de origem animal, como ovos, carne de frango, bovina e produtos cárneos em geral. Porém, os vegetais também podem ser contaminados através de irrigação e lavagem com água contaminada, contaminação cruzada, contaminação de um manipulador portador da bactéria (JAY, 2000). Entre os alimentos, o principal envolvido em surtos é a maionese caseira (SILVA; DUARTE,

2002). Entre os sintomas da salmonelose pode-se citar: diarreia, náusea, dores abdominais, febre baixa com calafrios e, algumas vezes, vômitos, dores de cabeça e mal-estar (FORSYTHE, 2000).

3.5 ANTIBACTERIANOS NATURAIS DE CÍTRICOS NA PERSPECTIVA DA PRODUÇÃO ECOLÓGICA E SEGURANÇA DE ALIMENTOS

O crescimento da produção e consumo de produtos orgânicos de base agroecológica demandam insumos sustentáveis e renováveis, que estejam de acordo com os princípios da agroecologia. Os cítricos são encontrados em abundância nas propriedades rurais e, na sua forma de cultivo convencional, demonstram apresentar atividade antibacteriana, essencial aos processos de desinfecção e conservação e conseqüente prevenção das doenças transmitidas por alimentos. Considerando o grande potencial de aplicação no processamento de alimentos orgânicos de base agroecológica e a escassez de estudos nessa área, a investigação da atividade antibacteriana de cítricos cultivados ecologicamente demonstra ter grande relevância.

CAPÍTULO 2

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE CRUDE EXTRACTS OF AGRO-ECOLOGICAL
CITRUS BY-PRODUCTS

Artigo submetido ao periódico "Food Control" e formatado de acordo com as suas normas.

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE CRUDE EXTRACTS OF AGRO-
ECOLOGICAL *CITRUS* BY-PRODUCTS**

Carin Gerhardt¹✉, Aline Campos Vieira², Magnólia Aparecida Silva da Silva³,
and José Maria Wiest⁴

1- Institute of Food Science and Technology. Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91505-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: carin.gerhardt@ufrgs.br. Phone: 055 51 3308 7107. Corresponding author.

2- Institute of Food Science and Technology. Federal University of Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 9500, CEP 91505-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: alinecamposvieira@hotmail.com. Phone: 055 51 3308 7107.

3- Department of Horticulture and Silviculture, College of Agronomy, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: magnolia.silva@ufrgs.br

4- Institute of Food Science and Technology. Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91505-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: jmwiest@ufrgs.br. Phone: 0055 51 3308 7107.

ABSTRACT

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the ethanolic extracts of *Citrus* by-products (peels and young fruits) were determined. The cultivars tested were 'Ponkan' (*Citrus reticulata* Blanco) and 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Tenore) mandarins, 'Rangpur' lime (*Citrus limonia* Osbeck), and sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). All of the fruits were cultivated under agro-ecological conditions. The MIC and MBC were determined for *Escherichia coli* (ATCC® 25992), *Salmonella* Enteritidis (ATCC® 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212), and *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923). All of the extracts exhibited bactericidal and bacteriostatic effects at the concentrations tested. The young fruits, particularly 'Rangpur' lime and mandarins, exhibited the best results. This antibacterial activity was directly correlated to the acidity of the extracts, which is higher in young fruits. *P. aeruginosa* and *S. aureus* exhibited higher susceptibility to the extracts. The higher antibacterial efficacy of the whole fruit extract of 'Rangpur' lime compared to that of its parts indicated a synergistic effect between the components of the peel and those of the pulp. Suspension tests showed that the 'Montenegrina' mandarin extract (30% v/v) inactivated 8 log CFU/ml of *S. Enteritidis* within 15 min, 5 log CFU/ml of *E. coli* in 30 min, and 8 log CFU/ml of *E. coli* in 24 h. This study indicates that *Citrus* extracts, particularly those extracted from young fruits, have potential as efficient natural antibacterial agents.

Keywords: natural antibacterial; crude ethanolic extract; organic food; MIC; MBC.

1. INTRODUCTION

Citrus fruits are widely produced worldwide and are normally consumed either *in natura* or as juice, marmalade, candied, or natural flavorants. The production and processing of these fruits generates a large amount of residues with low commercial value and a lack of usefulness. *Citrus* horticultural practices involve the manual or chemical abscission of young fruits to reduce the quantity of trees and consequently improve their final size and quality (Bangerth, 2000). In juice production, 40 to 60% of the fruit weight is discarded as peel, pulp, and seeds. The recycling of this material is fundamental due to its economic and environmental impacts (Licandro & Odio, 2002).

Although considered a problem for the juice industry, these by-products are rich in highly bioactive compounds, such as flavonoids, phenolic compounds, terpenes, coumarins, psoralens, organic acids, carotenoids, and pectin, and are related to many health benefits (Kris-Etherton et al., 2002). In fact, studies have revealed the antioxidant (Fernandes-López, Zhi, Aleson-Carbonell, Pérez-Alvarez, & Kuri, 2005; Xu, Ye, Liu, Ma, Chen, 2008; Barros, Ferreira, & Genovese, 2012), anticarcinogenic (Benavente-García & Castillo, 2008; Nangia-Makker et al., 2002), and anti-inflammatory activities (Benavente-García, Castillo, Marin, Ortuño, & Del Río, 1997) and the protective effect against coronary diseases (Kris-Etherton et al., 2002) exhibited by these by-products. Many of these compounds, such as coumarins, psoralens (Stanley & Jurd, 1971; Mabry & Ulubelen, 1980; Johann et al., 2007; Girenavar et al., 2008), flavonoids (Johann et al., 2007; Benavente-García, Castillo, Marin, Ortuño, & Del Río, 1997; Salas, Céliz, Geronazzo, Daz, & Resnik, 2011), such as quercetin, hesperidin and naringin, limonoids (Vikram, Jesudhasan, Jayaprakasha, Pillai, & Patil, 2010; Manners, 2007), carotenoids (Molnár et al., 2005; Tao, Gao, Liu, & Ge, 2010), and organic acids (Samelis & Sofos, 2003; Nazer, Kobolinsky, Tholozan, & Dubois-Brissonnet, 2005) also present antimicrobial activity.

In general, there is increasing concern regarding the impact of chemicals and pesticides on human health and the environment. According to *State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture* (SOLAW), the increase in food production for the expected population of 9 billion people in 2050 has been found to be associated with management practices that degrade the land and water systems

(FAO, 2011). Organic production and processing principles are based on the maintenance and increase in human, animal, and environmental health and well-being (IFOAM, 2013). This agro-ecological cultivation system requires the substitution or limitation of chemical additives and processing aids without a reduction in the quality and safety parameters (Johannessen, 2007). Natural antimicrobials are largely found in plants and could be an alternative in organic food disinfection and preservation. Chlorine is the most widely used sanitizer in food disinfection. However, there are concerns about its efficacy in fresh-cut products and the health risks associated with the formation of halogenated carcinogenic compounds (Ölmez & Kretzschmar, 2009), such as trihalomethanes. The control of foodborne pathogens through physical and chemical methods is essential for the promotion of safety in food processing.

Studies have revealed that the organic crop management of fruit and vegetables generates higher concentrations of one or more bioactive compounds, such as anthocyanins, carotenoids, flavonoids, and ascorbic acid (Crinnion, 2010). However, many studies have shown variable or inconsistent results likely due to the difficulties associated with ensuring the same environmental conditions and pressures (Chassy, Bui, Renaud, Van Horn, & Mitchell, 2006). Mikulic-Petkovsek, Schmitzer, Slatnar, Stampar, and Veberic (2012) found that wild strawberry, raspberry, and blackberry exhibit a 2- to 5-fold higher amount of total phenolics compared with conventionally cultivated plants. Phenolics are secondary metabolites related to the plant defense mechanism and are produced in response to biotic and abiotic stresses, such as microorganism infection, wounding, freezing, and light exposure (Boue, 2009; Ippolito & Nigro, 2003).

This study aims to determinate the *in vitro* antibacterial activity of the ethanolic extracts of organic *Citrus* residues, i.e., peels and young fruits, of mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore and *Citrus reticulata* Blanco), sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck), and lime (*Citrus limonia* Osbeck) against foodborne pathogens and spoilage bacteria.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Citrus fruits

The fruits were provided by familiar orchards and by certified organic producers under the biodynamic farming system, which do not use any chemical pesticide, from the regions of Montenegro and the metropolitan region of Porto Alegre in southern Brazil. Different varieties of *Citrus* that are normally cultivated in southern Brazil were cropped into two different stages of ripening. The young fruits were manually cropped during the thinning period, which occurs between January and April, and the ripe fruits were cropped in July. The *Citrus* species analyzed were the following: 'Montenegrina' mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore), 'Ponkan' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco), sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck), and 'Rangpur' lime (*Citrus limonia* Osbeck). With the exception of the 'Rangpur' lime, which a common rootstock, these species are the major cultivars consumed in this region. All fruits were stored at 5 °C for at most one week before preparation of the ethanolic extracts.

2.2 Ethanolic extracts obtainment

The young fruits were processed as whole fruit, and the young 'Rangpur' lime was also separated into flavedo with albedo and pulp. The ripe fruits were peeled, and their flavedo and albedo were used. The crude plant material was cut and ground in a meat grimmer (6 mm), rapidly introduced into bottles with ethanol 96 °GL to avoid oxidation at a proportion of 4:10 (w/v), and agitated (Farmacopéia, 1959). The material was then macerated over a period of two weeks in airtight bottles at room temperature, filtered with common filter paper to remove any visual residues, and stored. This alcoholature was fractionally distilled using a vacuum evaporation system at 60 °C for ethanol removal until a minimum of 2/3 of the initial distillate volume was obtained. The crude extracts were obtained by rehydrating the material with sterile demineralized water until exactly 1/3 of the initial volume was obtained.

The samples were then stored at 5 °C in airtight bottles until the antibacterial analysis. All of the extractions were performed in triplicate. These procedures were adopted from the method described by Eloff (2004), who recommends that the plant extracts should not be dried or deep-frozen to avoid precipitation and a reduction in the solubility of the substances.

2.3 Concentration of extracts and dry residue (DR)

The concentration of crude ethanolic extracts (EEC) used for antibacterial testing was calculated according to the fruit dry matter (DM). The DM was determined in triplicate by drying 30 g of the ground plant material at 40 °C until a constant weight was obtained. The dry residue (DR) of the extracts was obtained according to the 6th European Pharmacopoeia (Council of Europe, 2001). The MIC and MBC results (in mg/ml) were calculated based on the concentration of the ethanolic extracts.

2.4 Antibacterial activity of the extracts

2.4.1 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of ethanolic extracts

The strains *Escherichia coli* (ATCC® 25992), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), *Salmonella* Enteritidis (ATCC® 13076), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212), and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853) were obtained from the standard bacterial culture collection maintained in the Food Hygiene Laboratory of the Food Science and Technology Institute of the Federal University of Rio Grande do Sul in Porto Alegre, Brazil. These strains were preserved in BHI agar at 5 °C and grown in BHI broth at 36 °C for at most 4 h (Gram-positive) or overnight (Gram-negative) prior to the antibacterial testing.

The antibacterial activity of the extracts was determined based on the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) using the microdilution method (NCCLS, 1999; CLSI, 2005). Tubes with a 2-ml mixture of Mueller-Hinton broth and different concentrations (5 – 50% v/v) of the ethanolic extracts were inoculated with previously grown bacteria to obtain a final bacterial concentration of 5×10^5 CFU/ml. These tubes were incubated for 20-24 h at 36 ± 1 °C to determine the MIC. For the MBC determination, duplicate 10- μ l aliquots of the mixtures in the abovementioned tubes that did not display turbidity were subcultured in BHI Agar plates, and the bacteria were counted after 24 - 48 h of incubation at 36 ± 1 °C. The MIC represents the lowest concentration without visual turbidity, and the MBC is the lowest concentration that killed at least 3 log CFU/ml of the initial inocula.

2.4.2 Suspension Test

After measuring the MIC and MBC, the bactericidal activity over time was determined by suspension tests according to the German Veterinary Society (DVG, 1988). Due to their importance in fresh-cut vegetables, the strains chosen for this assay were *E. coli* and *S. Enteritidis*. The extract concentrations tested with both strains were approximately 1 x MBC (15%), 2 x MBC (30%), and 2.5 x MBC (37.5%).

2.5 Chemical analysis

2.5.1 Total acidity/citric acid content and ascorbic acid content of ethanolic extracts

The total acidity and its equivalent in citric acid were determined by the titration of 5 ml of the ethanolic extract with 0.1 M NaOH using phenolphthalein as the indicator (Medeiros, Yamanishi, Peixoto, Pires, Junqueira, & Ribeiro, 2009). The free acidity or titratable acidity of the juice of most *Citrus* fruits is due largely to its citric acid content (Ladaniya, 2008). The total acidity was used as an indirect measurement of the citric acid concentration, which is the main acidic compound in

Citrus fruits related to the fruit's acidity (Sadka, Dahan, Cohen, & Marsh, 2000). The ascorbic acid content was determined using the titrimetric method with 2,6-dichloroindophenol (AOAC, 1997).

2.6 Statistical analysis

The MIC and MBC values were analyzed through one-way analysis of variance (ANOVA) with a confidence interval of 95% using the SPSS and SAS 9.0 software programs. The difference between the means was compared by Tukey's test ($p < 0.05$). Pearson's correlation coefficient (r) was also determined to verify the effect of the citric and ascorbic acid contents on the MBC.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 exhibits the results of the DM of the plant material, the DR of the tincture, and the EEC. Further concentrations of the extracts and the results MIC and MBC results are shown in Table 2.

All of the extracts exhibited selective antibacterial activity against all of the strains tested. The extract of the young fruits showed higher activity than the extracts of the ripe peels (Table 2). The results obtained for different parts of the 'Rangpur' lime revealed that the pulp exhibits much higher activity than the peel. Thus, the substances present in the endocarp of young fruits are likely responsible for the higher activities observed in the young fruits. The peels of *Citrus* fruits are rich in carotenoids and other pigments, essential oils, ascorbic acid, and phenolics (Wang, Chuang, & Ku, 2007; Cano, Medina, & Bermejo, 2008; Patil, Murthy, Jayprakash, Chetti, & Patil, 2009; Vikram et al., 2010) and contain a low concentration of acids (Ladaniya, 2008). The pulp and juice also contain pigments, ascorbic acid, phenolics, higher amounts of organic acids (citric and malic, mostly), and low amounts of essential oils. Previous works (unpublished) have demonstrated that the essential oils of the green and ripe peels of *Citrus* fruits have little or no detected activity against the strains tested ($MBC \geq 8\%$ v/v) with the exception of *E. faecalis*. The antibacterial activity of organic acids is well documented (Hsiao & Siebert, 1999). Thus, the total acidity and ascorbic acid contents of the extracts were analyzed to verify their influence on the MIC and MBC.

The contents of ascorbic and citric acids of the extracts are shown in Table 3. The young fruit extracts had a higher citric acid content, particularly the lime pulp (4.01 g/100 ml) and the whole fruit (3.48 g/100 ml). The 'Montenegrina' mandarin extract contained 2.31 g/100 ml, and the 'Ponkan' mandarin and the 'Valencia' orange exhibited intermediate contents of 1.69 g/100 ml and 1.01 g/100 ml, respectively. The peel of the young lime extract exhibited the lowest acidity (0.26 g/100 g). These results confirm that organic acids are primarily present in the fruit pulp (Ladaniya, 2008). The ripe peel extracts, with the exception of lime (0.34 g/100 g), presented similar concentrations ranging from 0.15 g/100 ml to 0.18 g/100 ml. The organic acids involved in fruit acidity are citric, malic, quinic, tartaric, succinic, oxalic, and ascorbic acids (Albertini et al., 2006). These acids are considered weak

organic acids and are traditionally used as additives for food preservation. However, the antimicrobial properties of these acids have demonstrated efficacy as natural household sanitizers (Sengun & Karapinar, 2004; Sengun & Karapinar, 2005). Their antimicrobial mechanisms mainly consists of their entering through the plasma membrane in their undissociated state to release charged anions and protons that accumulate to cause membrane disruption, inhibition of essential metabolic reactions, stress on the intracellular pH homeostasis, and interference in metabolic functions (Forsythe, 2000).

The average activities of the extracts (Fig. 1) exhibit the following order (starting with the most efficient): whole young lime > young lime pulp > young 'Montenegrina' mandarin > young 'Ponkan' mandarin > young orange. This order reveals a correlation between the antibacterial activity of the extracts and the acid content, i.e., an increase in the antibacterial activity is associated with a higher acidity. Table 4 show a significant correlation between the average MBC value and the citric acid content ($p < 0.001$) and a poor correlation between the average MBC value and the ascorbic acid content, perhaps due to its low concentration. *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, and *P. aeruginosa* were the strains that were most influenced by the citric acid concentration, whereas *S. Enteritidis* was less affected.

The differences in the composition of acids of the peel and pulp and between different ripening stages can also impact the inhibition and inactivation concentrations. Normally, malic acid is the major acid in *Citrus* peels. The content of this acid increases in the fruit during maturation and is associated with a reduction in the citric acid content (Ladaniya, 2008). Of the acids present in *Citrus* fruits, the efficacy of citric acid is greater than that of malic acid (Samelis & Sofos, 2003; Hsiao & Siebert, 1999; Gao et al., 2012). This study measured the total acidity, which includes the contents of both of these organic acids. It is likely that the mature peel extracts exhibited reduced antibacterial activity not only because of lower acidity but also because of a greater proportion of malic acid. Mature peels have also higher contents of monosaccharide (Ladaniya, 2008), which make these peels a source of nutrients for bacteria.

The ascorbic acid (AA) contents of ripe 'Montenegrina' mandarin and 'Valencia' orange extracts were very similar (0.36 to 0.39 mg/100 ml, respectively; Table 3). The whole fruit and pulp extracts from young lime exhibited higher values, i.e., 0.63 and 0.80 mg/100 ml, respectively, which are linked to higher citric acid

contents and higher antimicrobial activities. Usually, unripe fruits present a higher content of AA, and peels normally contain greater quantities of AA than juice (Ladaniya, 2008). Although AA is considered a potent antioxidant and bioactive compound (Xu et al., 2008), no relationship was found between the content and the inhibition/inactivation of bacteria for most of the tested extracts. The amounts found were very low compared with the results reported in the literature (Barros, Ferreira, & Genovese, 2012), and this difference may be due to the duration and temperature of their storage. However, the method used to detect the AA content may have underestimated the concentration because it analyzes only L-ascorbic acid and not its oxidized form, i.e., dehydroascorbic acid (DHA), which is also bioactive (Eitenmiller, Ye, & Landen, 2008; Deutsch, 2000). Analyses that do not measure DHA may substantially underestimate the ascorbic acid content (vitamin C) (Wills, Wimalasiri, & Greenfield, 1984). AA is a reducing agent capable of reducing the amount of oxygen that is available to bacteria due to its oxygen absorption capacity (Court, 1974; Salo & Cliver, 1978); in addition, AA can act synergistically with organic acids and regenerates the antioxidant effect of α -tocopherol (Tajkarimi & Ibrahim, 2011). Cursino, Chartone-Souza, and Nascimento (2005) found that ascorbic acid acts synergistically with antibiotics against *P. aeruginosa*.

The comparison of the different parts of fruits revealed that the average activity of the whole young lime is higher than those of the pulp and peel alone (Fig. 1), despite the higher concentrations of citric and ascorbic acid in the pulp. This finding indicates that the compounds in whole young lime might act synergistically against bacteria. The acids and phenolics of pulp could increase the activity of EO present in the peels by injuring the cell membrane and enhancing the damage of oils. Friedly, Crandall, Ricke, Roman, O'Brian, and Chaloca (2009) found that low concentrations of *Citrus* essential oils act synergistically with organic acids (citric and malic acids) and effectively control Gram-positive microbial growth. Baskaran, Amalaradjou, Hoagland, and Venkitanarayanan (2010) reduced 6 log CFU/ml of *E. coli* O157:H7 in acid media, such as apple juice and apple cider, using low concentrations of trans-cinnamaldehyde, which was isolated from the bark extract of cinnamon. Gutierrez, Barry-Ryan, and Bourke (2008) found that the incorporation of organic acids may enhance the efficacy of EO combinations for the preservation of food for extended periods. The application of 2.0% citric acid and up to 0.1% cinnamon bark oil to tomato juice treated with high-intensity pulsed electric fields

successfully achieved the pasteurization level (reduction of 5 log₁₀ CFU) (Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia, & Martin-Belloso, 2008). Synergism occurs when the effect achieved by a combination of substances is greater than the sum of the individual effects of each of the substances (Davidson, & Parish., 1989). Oliveira, Stamford, Neto, and Souza (2010) found synergism between essential oils and organic acids against *S. aureus*. This phenomenon was also found in mixtures of the minor and major components of garlic (Chung, Kwon, Shim, & Kyung, 2007), as well as in isolated essential oils (Delgado, Fernández, Palop, & Periago, 2004; Didry, Dubreuil, & Pinkas, 1993; Gutierrez, Barry-Ryan, & Bourke, 2008; Lv, Liang, Yuan, & Li, 2011) and in other components, such as flavonoids (Mandalari et al., 2007). Mandalari et al. (2007) found that bergamot-fractionated flavonoids were more efficient against Gram-negative than against Gram-positive strains and found synergistic interactions between these compounds. Mexis, Chouliara, and Kontominas (2012) were able to extend the shelf life of fresh ground chicken by 5 days through the use of a commercial blend of citric, ascorbic, and malic acids (Citrox[®]) and an oxygen absorber.

Of the studied ripe peels, lime exhibited the best average activity, followed by mandarin (Fig. 1). This result is most likely due to the higher acidity of these peels because the lime peel removal caused some absorption of juice. Ripe orange exhibited the lowest bactericidal activity against *E. coli* (30.1%), *S. Enteritidis* (26.8%), and *E. faecalis* (40.1%), and there were no significant differences between the strains ($p \geq 0.05$). Although mandarin and orange contain similar concentrations of acids, the mandarin oil has been found to exhibit better activity in previous studies (Espina et al., 2011; Settanni et al., 2012). According to Espina et al. (2011), this oil contains a lower amount of limonene and higher amounts of oxygenated monoterpenes, which exhibit higher antibacterial activity than hydrocarbons (Settanni et al., 2012; Burt, 2004; Consentino et al., 1999; Carson & Riley, 1995). Thyme oil is reported to exhibit high antimicrobial activity (Panizzi, Flamini, Cioni, & Morelli, 1993; Deans, & Ritchie, 1987), which is largely attributed to presence of phenolic monoterpenes rather than monoterpene hydrocarbons (Consentino et al., 1999).

Many of the studies that have tested essential oils found that Gram-positive strains exhibit a slightly higher susceptibility (Burt, 2004). However, this behavior was not observed with citrus extracts. In the present study, *E. faecalis* (Gram-positive), *E. coli*, and *S. Enteritidis* (Gram-negative) were the most resistant strains, and *P.*

aeruginosa (Gram-negative) and *S. aureus* (Gram-positive) were the most susceptible. Unpublished results have shown the specific action of *Citrus* oils against *Enterococcus sp.*, as was demonstrated by Espina et al. (2011), and the high resistance of *P. aeruginosa*, which was also noted by Burt (2004) and Ceylan and Fung (2004). Controversially, this study showed that *E. faecalis* reached the highest MIC and MBC values for approximately 50% of the extracts tested and the *P. aeruginosa* was highly sensitive. These observations indicate that the *Citrus* oils present in the extracts poorly influence the resulting antibacterial action, potentially due to their low solubility in aqueous solutions or their low content in the extracts.

In general, Gram-negative bacteria are less sensitive than Gram-positive bacteria to essential oils due to their lipopolysaccharide outer membrane, which restricts the diffusion of hydrophobic compounds (Burt, 2004). The crude ethanolic extracts of *Citrus* contain a mixture of hydrosoluble and ethanol-extractable liposoluble components, which have different inhibitory mechanisms and targets. However, during ethanol removal some of the liposoluble components precipitate or volatilize (mainly essential oils). It is therefore expected that non-volatile and water-soluble antimicrobials, such as organic acids and flavonoids, play a major role in the bacterial inhibitory activity of these extracts, as was confirmed in part by the correlation found between the acidity and the MBC.

The 'Montenegrina' mandarin extract was chosen for the subsequent *in vitro* suspension tests because of its high inhibitory and bactericidal concentrations. The results are displayed in Figures 2 and 3. *S. Enteritidis* was more susceptible to this extract than *E. coli*. The 2 x MBC concentration of this extract killed 7 log CFU of *S. Enteritidis* within 5 min, whereas the same result for *E. coli* was archived after 60 min. However, at the 1 x MIC concentration, a longer time was required to reduce the concentration of *S. Enteritidis* by 7 log CFU. During the first 30 min. there was a marked decrease in the bacterial counts. All of the extracts tested archived a reduction of 8 log CFU within 24 h. The typical contact times during food sanitizing are between 15 and 30 min. The mandarin extract exhibited excellent efficacy (> 5 log CFU reduction) with a 30-min contact time at a concentration of 30%. These results indicate the great potential of this extract for use as a natural disinfectant, but further studies are required to test its interaction with food because the sanitizer efficacy of plant extracts is typically reduced upon contact with food (Gutierrez, Barry-Ryan, & Bourke, 2008; Tiwari et al., 2009).

4. CONCLUSIONS

The results indicate that *Citrus* fruit waste could be an interesting source of natural and green antibacterial agents. Normally, the essential oils from young citrus fruits are extracted, and the pulp and peel are simply ground, dried, and made into animal feed. However, the extracts of these fruits exhibit potential antibacterial activity that can be used in many applications in which conventional products are prohibited or avoided, such as organic food disinfection and conservation. The sensorial characteristics of *Citrus* are normally well accepted by food consumers compared with the residual odor of chlorine-based products. Moreover, the antioxidant properties of these extracts due to the presence of flavonoids, limonoids, and phenolic compounds might provide an additional benefit for the maintenance of food quality.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Brazilian funding agencies CNPq and CAPES for their financial support.

REFERENCES

- Albertini, M.-V., Carcouet, E., Pailly, O., Gambotti, C., Luro, & F., Berti, L. (2006). Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless *Citrus* fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8335-8339.
- AOAC (1997). Official methods of analysis of the AOAC. Washington, 1997. p. 16-17. (v. 2).
- Bangerth, F. (2000). Abscission and thinning of young fruit and their regulation by plant hormones and bioregulators. *Plant Growth Regulation*, 31, 43–59.
- Barros, H. R. M., Ferreira, T. A. P. C., Genovese, M. I. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*, 134, 1892-1898.
- Baskaran, S. A., Amalaradjou, M. A. R., Hoagland, T., & Venkitanarayanan, K. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice and apple cider by trans-cinnamaldehyde. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 126-129.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., Del Río, J. A. (1997). Uses and Properties of *Citrus* Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (12), 4505-4515.
- Benavente-García, O., Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of *citrus* flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6185-6205.
- Boue, S. M., Cleverland, T. E., Carter-Wientjes, C., Shih, B. Y., Bhatnagar, McLachlan, D., et al. (2009). Phytoalexin-enriched functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2614–2622.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–53.
- Cano, A., Medina, A., & Bermejo, A. (2008). Bioactive compounds in different *Citrus* varieties. Discrimination among cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 377-381.

Carson, C. F., & Riley, T. V. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, 78 (3), 264-269.

Ceylan, E., & Fung, D. Y. C. (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 12(1), 1–55.

Chassy, A. W., Bui, L., Renaud, E. N. C., Van Horn, M., Mitchell, A. E. (2006). Three-year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and Bell peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8244–8252.

Chung, I., Kwon, S. H., Shim, S.-T., & Kyung, K. H. (2007). Synergistic antiyeast activity of garlic oil and allyl alcohol derived from alliin in garlic. *Journal of Food Science*, 72 (9), 437-440.

Crinnion, W. J. (2010). Organic foods contain higher levels of certain nutrients, lower levels of pesticides and may provide health benefits for the consumer. *Alternative Medicine Review*, 15 (1), 4-12.

CLSI. 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S15. CLSI, Wayne, PA.

Consentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., et al. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 29, 130-135.

Council of Europe (2001). European pharmacopoeia. Strasbourg: Council of Europe.

Court, W. M. (1974). Antioxidant activity of tocopherols, Ascorbyl palmitate and ascorbic acid and their mode of action. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 51, 321-325.

Cursino, L., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. A. (2005). Synergic interaction between ascorbic acid and antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (3), 379-384.

Davidson, P. M., & Parish, M. E. (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*, 43, 148-155.

Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5, 165-180.

Delgado, B., Fernández, P. S., Palop, A., & Periago, P. M. (2004). Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. *Food Microbiology*, 21, 327-334.

Deutsch, J. C. (2000). Dehydroascorbic acid. *Journal of Chromatography A*, 881, 299-307.

Didry, N., Dubreuil, L. & Pinkas, M. (1993). Antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Pharmazie*, 48, 301–304.

DVG (Deutsche Veterinärmedizin Gesellschaft). (1988). *Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel* (2th ed.). Deutsche Veterinärmedizin Gesellschaft, Giessen.

Eitenmiller, R. R., Ye, L., & Landen, W. O. (2008). *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences* (2th ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.

Eloff, J. N. (2004) Quantification the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay guided fractionation (Letter to the Editor). *Phytomedicine*, 11, 370-371.

Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22, 2011, 896-902.

FAO. (2011). The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) - Managing systems at risk. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, London.

Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. (1959) (2th Ed.). São Paulo, SP: Indústria Gráfica Siqueira.

Fernandes-López, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Pérez-Alvarez, J. A., Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69, 371-380.

Forsythe, S. J. (2000). *The microbiology of safe food*. Oxford: Blackwell Sciences.

Friedly, E. C., Crandall, P. G., Ricke, S. C., Roman, M., O'Brian, C., & Chaloca, V. I. (2009). *In vitro* antilisterial effects of *Citrus* oil fractions in combination with organic acids. *Journal of Food Science*, 74(2), 67-72.

Gao, Z., Shao, J., Sun, H., Zhong, W., Zhuang, W., & Zhan, Z. (2012). Evaluation of different kinds of organic acids and their antibacterial activity in Japanese Apricot fruits. *African Journal of Agricultural Research*, 7(35), 4911-4918.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 91-97.

Girenavar, B., Cepeda, M. L., Soni, K. A., Kikram, A., Jesudhasan, P., Jayaprakasha, G. K., et al. (2008). Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 204-208.

Hsiao, C.-P., & Siebert, K. J. (1999). Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 189-201.

IFOAM. (2013). The principles of organic agriculture. Retrieved from IFOAM website: http://www.ifoam.org/about_ifoam/principles/index.html.

Ippolito, A., & Nigro, F. (2003). Natural antimicrobials in postharvest storage of fresh fruits and vegetables. In S. Roller (Ed.), *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods* (pp. 201-234). Boca Raton: Woodhead Publishers, CRC Press.

Johann, S., Oliveira, V. L., Pizzolatti, M. G., Schripsema, J., Braz-Filho, R., Branco, A., Smânia Jr, A. (2007). Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. Peels. *Memórias do Instituto Oswald Cruz*, 102(6), 681-685.

Johannessen, G. S. (2007). Post-harvest strategies to reduce enteric bacteria contamination of vegetable, nut and fruit production. In J. Cooper, U. Niggli, & C. Leifert (Eds.), *Handbook of organic food safety and quality* (pp. 433-453). Boca Raton: Woodhead Publishing, CRC Press.

Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., et al. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113 (98), 71S-88S.

Ladaniya, M. (2008). *Citrus fruit: biology, technology and evaluation*. San Diego, CA: Academic Press.

Licandro, G., & Odio, C. E. (2002). Citrus by-products. In G. Dugo, A. Di Giacomo (Eds.), *Citrus: the genus Citrus* (pp. 159-178). London: Taylor & Francis.

Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., & Li, C. (2011). *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44, 3057-3064.

Mabry, T. J., Ulubelen, A. (1980). Chemistry and Utilization of Phenylpropanoids Including Flavonoids, Coumarins, and Lignans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 188-196.

Mandalari, G., Bennett, R. N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C. B., et al. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2056-2064.

Manners, G. D. (2007). Citrus Limonoids: Analysis, Bioactivity, and Biomedical Prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8285–8294.

Medeiros, S. A. F., Yamanishi, O. K., Peixoto, J. R., Pires, M. C., Junqueira, N. T. V., Ribeiro, J. G. B. L. (2009). Caracterização físico-química de progênies de maracujá-roxo e maracujá-azedo cultivados no Distrito Federal. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31,

Mexis, S. F., Chouliara, E., & Kontominas, M. G. (2012). Shelf life extension of ground chicken meat using an oxygen absorber and a citrus extract. *LWT – Food Science and Technology*, 49, 21-27.

Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R. (2012). Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *Journal of Food Science*, 77(10), 1064-1070.

Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R. M., & Martin-Belloso, O. (2008). Inactivation of *Salmonella enterica* Ser. Enteritidis in tomato juice by combining of

high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *Journal of Food Science*, 73(2), 47-53.

Molnár, P., Kawase, M., Satoh, K., Sohara, Y., Tanaka, T., Tani, S., et al. (2005). Biological activity of carotenoids in red paprika, Valencia orange and Golden Delicious apple. *Phytotherapy Research*, 19, 700–707.

Nangia-Makker, P., Hogan, V., Honjo, Y., Baccarini, S., Tait, L., Bresalier, R., et al. (2002). Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified *Citrus pectin*. *Journal of the National Cancer Institute*, 94 (24), 1854-1862.

Nazer, A. I., Kobolinsky, A., Tholozan, J.-L., Dubois-Brissonnet, F. (2005). Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? *Food Microbiology*, 22, 391-398.

NCCLS, 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement, Vol. 18, No. 1. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, Pa.

Oliveira, C.E.V.; Stamford, T.L.M.; Gomes Neto, N.J.; Souza, E.L. (2010). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 312-316.

Ölmez, H., & Kretzschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 686–693.

Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L. and Morelli, I. (1993) Composition and antimicrobial activity of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 39, 167–170.

Patil, J. R., Murthy, K. N. C., Jayprakash, G. K., Chetti, M. B., & Patil, B. S. (2009). Bioactive compounds from Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) juice induce apoptosis in human pancreatic cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10933-10942.

Sadka, A., Dahan, E., Cohen, L., & Marsh, K. B. (2000). Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiologia Plantarum*, 108, 255–262.

- Salas, M. P., Céliz, G., Geronazzo, H., Daz, M., & Resnik, S. L. (2011). Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*, 124, 1411-1415.
- Salo, R. J., & Cliver, D. O. (1978). Inactivation of enteroviruses by ascorbic acid and sodium bisulfite. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(1), 68-75.
- Samelis, J., & Sofos, J. N. (2003). Organic acids. In S. Roller (Ed.), *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods* (pp. 98-132). Boca Raton: Woodhead Publishers, CRC Press.
- Sengun, I. Y., & Karapinar, M. (2004). Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucus carota* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 96, 301– 305.
- Sengun, I. Y., & Karapinar, M. (2005). Effectiveness of household natural sanitizers in the elimination of *Salmonella typhimurium* on rocket (*Eruca sativa* Miller) and spring onion (*Allium cepa* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 98, 319– 323.
- Settanni, L., Palazzolo, E., Guarrasi, V., Aleo, A., Mammina, C., Moschetti, G., et al. (2012). Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control*, 26, 326-330.
- Stanley, W. L., & Jurd, L. (1971). Citrus coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19(6), 1106-1110.
- Tajkarimi, M., & Ibrahim, S. A. (2011). Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Control*, 22, 801-804.
- Tao, N., Gao, Y., Liu, Y., & Ge, F. (2010). Caretonoids from the peel of Shatian Pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its antimicrobial activity. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 7(1), 110-115.
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnel, C. P., Muthukumarappan, Bourke, P., & Cullen, P. J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5987-6000.

Vikram, A., Jesudhasan, P. R., Jayaprakasha, G. K., Pillai, B. S. & Patil, B. S. (2010). Grapefruit bioactive limonoids modulate *E. coli* O157:H7 TTSS and biofilm. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 109-116.

Wang, Y.-C., Chuang, Y.-C., & Ku, Y.-H. (2007). Quantification of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 102, 1163-1171.

Williamson, E. M. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicine. *Phytomedicine*, 8(5), 401–409.

Wills, R. B. H., Wimalasiri, P., & Greenfield, H. (1984). Dehydroascorbic Acid Levels in Fresh Fruit and Vegetables in Relation to Total Vitamin C Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 836-838.

Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y., Shi, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106, 545-551.

TABLES AND GRAPHICS

Table 1 - Dry matter (DM) of the crude plant material, dry residue (DR) of the alcoholature, and ethanolic extract concentration (EEC).

Cultivar ^a	DM ^b	DR ^c	EEC ^d
RMM	0.206 (±0.003)	27.64 (±0.29)	187.614
YMM	0.199 (±0.008)	-	180.575
RPM	0.301 (±0.003)	40.78 (±0.32)	281.958
YPM	0.222 (±0.002)	19.37 (±0.80)	202.731
RRL	0.172 (±0.003)	20.45 (±0.26)	154.645
YRLPe	0.222 (±0.001)	12.18 (±0.10)	203.085
YRLW	0.156 (±0.002)	18.22 (±0.33)	140.148
YRLPu	0.136 (±0.004)	20.64 (±0.07)	121.093
RO	0.274 (±0.010)	22.57 (-)	254.805
YO	0.269 (±0.002)	22.97 (±0.20)	250.122

Notes: a – RMM, Ripe ‘Montenegrina’ mandarin; YMM, young ‘Montenegrina’ mandarin; RPM, ripe ‘Ponkan’ mandarin; YPM, young ‘Ponkan’ mandarin; RRL, ripe ‘Rangpur’ lime; YRLPe, young ‘Rangpur’ lime peel; YRLW, whole young ‘Rangpur’ lime; YRLPu, ‘Rangpur’ lime pulp; RO, ripe orange; YO, young orange; b – g of dry plant/g of crude plant; the standard deviation is shown in parentheses; c – g/l of tincture; the standard deviation is shown in parentheses; d – mg of dry matter/ml.

Table 2 - Minimum Inhibitory Concentration (MIC, % v/v) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC, % v/v) of the ethanolic extracts of the ripe and green peels and young fruits of four different citrus cultivars managed under agro-ecological systems against five bacterial strains.

Strain	Extract	Mat. ^a	Part ^b	MIC			MBC			Equivalent in mg/ml (dry matter)	
				% v/v (±sd)			% v/v (±sd)			MIC	MBC
<i>E. coli</i>	'Montenegrina' mandarin	R	Pe	16.4% (±2.1%)	abc	21.3% (±1.7%)	abcde	30.8	40.0		
		Y	W	9.7% (±2.3%)	bc	16.7% (±1.8%)	cde	17.5	30.2		
	'Ponkan' mandarin	R	Pe	16.8% (±2.1%)	abc	26.9% (±1.7%)	ab	47.4	75.8		
		Y	W	12.9% (±2.2%)	abc	19.5% (±1.7%)	bcde	26.2	39.5		
	'Rangpur' lime	R	Pe	14.6% (±2.2%)	abc	24.5% (±1.7%)	abc	22.6	37.9		
			Pe	19.2% (±2.2%)	ab	29.0% (±1.7%)	a	39.0	58.9		
		Y	W	7.5% (±2.2%)	c	12.2% (±1.7%)	e	10.5	17.1		
	'Valencia' orange	R	W	21.8% (±2.1%)	a	30.1% (±1.7%)	a	55.5	76.7		
			Y	Pe	14.3% (±2.2%)	abc	22.4% (±1.7%)	abcd	35.8	56.0	
	<i>S. Enteritidis</i>	'Montenegrina' mandarin	R	Pe	16.3% (±1.2%)	a	23.1% (±2.0%)	ab	30.6	43.3	
Y			W	11.4% (±1.2%)	ab	16.5% (±2.1%)	ab	20.6	29.8		
'Ponkan' mandarin		R	Pe	17.2% (±1.0%)	a	23.5% (±2.0%)	ab	48.5	66.3		
		Y	W	12.8% (±1.2%)	ab	22.9% (±2.0%)	ab	25.9	46.4		
'Rangpur' lime		R	Pe	14.4% (±1.2%)	a	21.2% (±2.0%)	ab	22.3	32.8		
			Pe	17.3% (±1.2%)	a	22.5% (±2.0%)	ab	35.1	45.7		
		Y	W	7.2% (±1.2%)	b	15.7% (±2.0%)	b	10.1	22.0		
'Valencia' orange		R	W	16.7% (±1.2%)	a	26.8% (±2.0%)	a	73.6	118.2		
			Y	Pe	14.2% (±1.0%)	a	23.1% (±1.7%)	ab	35.5	57.8	
<i>P. aeruginosa</i>		'Montenegrina' mandarin	R	Pe	11.5% (±1.1%)	a	16.4% (±1.6%)	abcd	21.6	30.8	
	Y		W	7.3% (±1.2%)	abc	9.1% (±1.7%)	d	13.2	16.4		
	'Ponkan' mandarin	R	Pe	12.9% (±1.0%)	a	18.0% (±1.4%)	abc	36.4	50.8		
		Y	W	9.7% (±1.1%)	ab	11.3% (±1.6%)	cd	19.7	22.9		
	'Rangpur' lime	R	Pe	9.7% (±1.1%)	ab	16.3% (±1.6%)	abcd	15.0	25.2		
			Pe	12.8% (±1.2%)	a	22.7% (±1.6%)	a	26.0	46.1		
		Y	W	≤5.0%	-	c	9.4% (±1.6%)	d	≤ 7.0	13.2	
	'Valencia' orange	R	W	11.7% (±1.1%)	a	20.0% (±1.6%)	ab	51.6	88.2		
			Y	Pe	9.6% (±1.0%)	ab	17.0% (±1.4%)	abcd	24	42.5	

Continue

Continuation

Strain	Extract	Mat. ^a	Por. ^b	MIC			MBC			Equivalent in mg/ml (dry matter)	
				% v/v (\pm sd)			% v/v (\pm sd)			MIC	MBC
<i>E. faecalis</i>	'Montenegrina' mandarin	R	Pe	19.9%	(\pm 1.8%)	a	37.1%	(\pm 2.4%)	a	37.3	69.6
		Y	W	10.3%	(\pm 2.2%)	abc	15.6%	(\pm 2.8%)	cd	18.6	28.2
	'Ponkan' mandarin	R	Pe	17.6%	(\pm 1.8%)	a	34.3%	(\pm 2.7%)	ab	49.6	96.7
		Y	W	11.0%	(\pm 2.1%)	abc	14.2%	(\pm 2.7%)	de	22.3	28.8
	'Rangpur' lime	R	Pe	14.4%	(\pm 2.1%)	ab	25.8%	(\pm 2.7%)	abcd	22.3	39.9
			Pe	17.1%	(\pm 2.1%)	ab	29.8%	(\pm 2.7%)	abc	34.7	60.5
		Y	W	\leq 5.0%	-	c	7.3%	(\pm 2.7%)	e	\leq 7.0	10.2
	'Valencia' orange		Pu	5.4%	(\pm 2.3%)	b	13.3%	(\pm 2.9%)	de	6.5	16.1
		R	W	19.6%	(\pm 2.1%)	a	40.1%	(\pm 2.7%)	a	86.4	176.8
		Y	Pe	16.6%	(\pm 1.8%)	ab	22.6%	(\pm 2.4%)	bcd	41.5	56.5
<i>S. aureus</i>	'Montenegrina' mandarin	R	Pe	17.1%	(\pm 1.8%)	a	23.2%	(\pm 2.3%)	a	32.1	43.5
		Y	W	\leq 5.0%	-	c	\leq 5.0%	-	d	\leq 9.0	\leq 9.0
	'Ponkan' mandarin	R	Pe	15.4%	(\pm 1.8%)	a	20.6%	(\pm 2.3%)	abc	43.4	58.1
		Y	W	13.2%	(\pm 2.1%)	abc	13.1%	(\pm 2.6%)	abcd	26.8	26.6
	'Rangpur' lime	R	Pe	14.8%	(\pm 2.1%)	ab	19.7%	(\pm 2.6%)	abc	22.9	30.5
			Pe	16.3%	(\pm 2.1%)	a	22.8%	(\pm 2.6%)	ab	33.1	46.3
		Y	W	\leq 5.0%	-	c	7.8%	(\pm 2.7%)	cd	\leq 7.0	10.9
	'Valencia' Orange		Pu	\leq 5.0%	-	bc	8.8%	(\pm 2.8%)	bcd	\leq 6.1	10.7
		R	W	14.9%	(\pm 2.0%)	a	21.5%	(\pm 2.6%)	abc	65.7	94.8
		Y	Pe	17.2%	(\pm 1.8%)	a	19.6%	(\pm 2.3%)	abc	43.0	49.0

Note: The same letters indicate that the mean (MIC or MBC) obtained for the indicated extract is not significantly different ($p \geq 0.05$) from the means (MIC or MBC) of the other extracts against the indicated strain.

a) Mat: Maturation stage. R – ripe; Y – young;

b) Part: W – Whole fruit; Pe – Peel; Pu – Pulp.

Table 3 - Ascorbic acid (mg) and citric acid (g) contents in 100 ml of the ethanolic extract of different citrus varieties

			Ascorbic Acid	Citric Acid^a
			mg/100ml	g/100ml
'Montenegrina' mandarin	Ripe	Peel	0.36 (\pm 0.04)	0.15 (\pm 0.02)
	Young	Whole	0.36 (\pm 0.03)	2.31 (\pm 0.06)
'Ponkan' mandarin	Ripe	Peel	0.45 (\pm 0.05)	0.18 (\pm 0.01)
	Young	Whole	0.37 (\pm 0.03)	1.69 (\pm 0.04)
'Rangpur' lime	Ripe	Peel	0.39 (\pm 0.04)	0.34 (\pm 0.01)
	Young	Whole	0.63 (\pm 0.08)	3.48 (\pm 0.08)
		Pulp	0.80 (\pm 0.02)	4.01 (\pm 0.05)
		Peel	0.39 (\pm 0.06)	0.26 (\pm 0.01)
'Valencia' orange	Ripe	Peel	0.38 (\pm 0.03)	0.15 (\pm 0.01)
	Young	Whole	0.39 (\pm 0.03)	1.01 (\pm 0.02)

^a Total Acidity equivalent

Table 4 – Correlation (r) between the concentration of two different organic acids identified in the ethanolic extracts of ripe and green peels and young fruits of four different citrus cultivars managed under agro-ecological systems and its MBC values for five different bacterial strains.

Strain	Ascorbic Acid		Citric Acid ^a	
	Pearson Corr. (r)	Sig.	Pearson Corr. (r)	Sig.
<i>E. faecalis</i>	-0.320	0.169	-0.733***	<0.001
<i>S. aureus</i>	-0.400	0.065	-0.761***	<0.001
<i>E. coli</i>	-0.427**	0.047	-0.834***	<0.001
<i>S. Enteritidis</i>	-0.351	0.119	-0.653***	<0.001
<i>P. aeruginosa</i>	-0.275	0.216	-0.714***	<0.001

^aTotal Acidity equivalent

** Correlation is statistically significant at 0.05 level (2-tailed)

*** Correlation is statistically significant at 0.01 level (2-tailed)

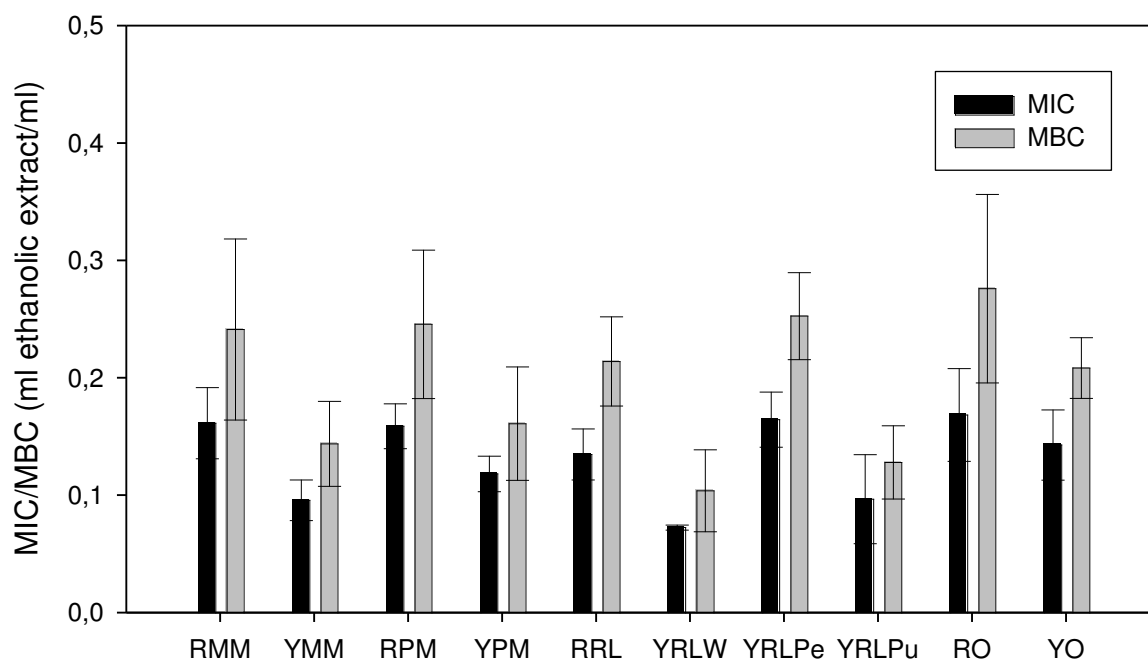


Fig. 1 - Average MIC and MBC (ml ethanolic extract/ml) of the ethanolic extracts of ripe and green peels and young fruits of four different citrus cultivars managed under agro-ecological systems against five bacterial strains. Abbreviations: RMM – ripe ‘Montenegrina’ mandarin; YMM – young ‘Montenegrina’ mandarin; RPM – ripe ‘Ponkan’ mandarin; YPM – young ‘Ponkan’ mandarin; RRL – ripe ‘Rangpur’ lime; YRLW – whole young ‘Rangpur’ lime; YRLPe – young ‘Rangpur’ lime peel; YRLPu – young ‘Rangpur’ lime pulp; RO – ripe orange; YO – young orange.

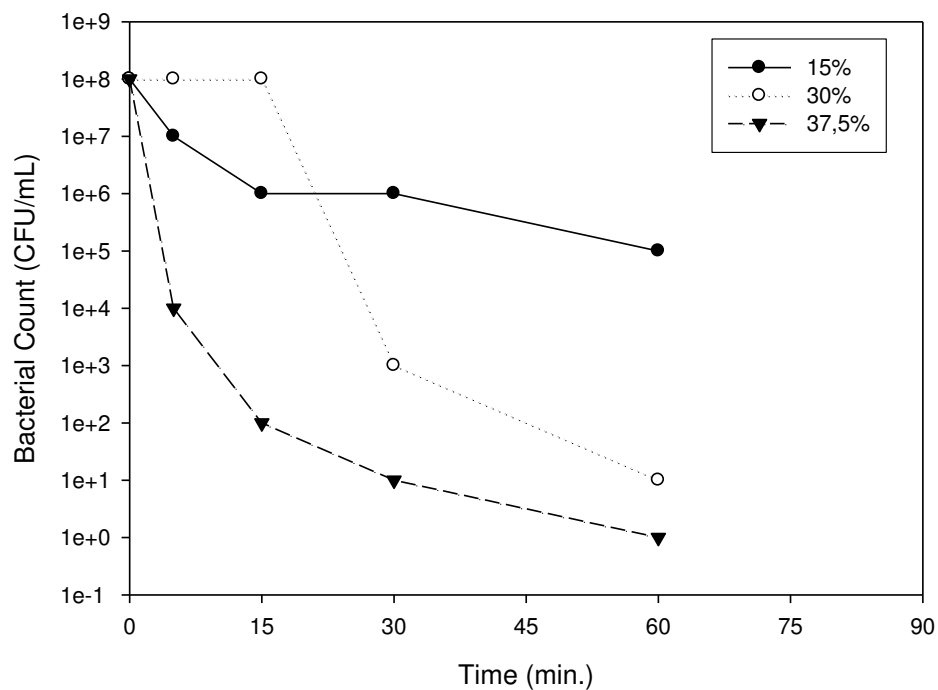


Fig. 2 - Bactericidal effect of different concentrations of young 'Montenegrina' mandarin extract on *E. coli*.

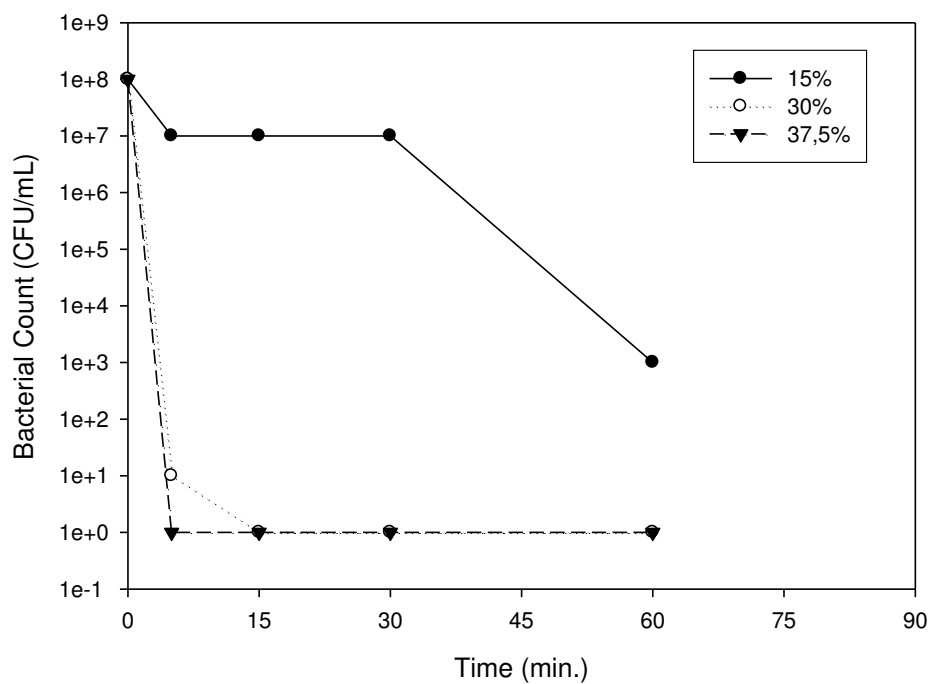


Fig. 3 - Bactericidal effect of different concentrations of young 'Montenegrina' mandarin extract on *S. Enteritidis*.

CAPÍTULO 3

COMPOSITION AND BACTERICIDAL ACTIVITY OF CITRUS ESSENTIAL OILS
FROM AN ORGANIC CULTIVATION SYSTEM

Artigo submetido à revista “International Journal of Food Science and Technology” e formatado de acordo com as suas normas.

COMPOSITION AND BACTERICIDAL ACTIVITY OF CITRUS ESSENTIAL OILS FROM AN ORGANIC CULTIVATION SYSTEM

Carin Gerhardt¹✉, Magnólia Aparecida Silva da Silva²,
Marcia Ortiz Mayo Marques³, José Maria Wiest⁴.

1- Institute of Food Science and Technology. Federal University of Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves Av., 9500, zip code 91505-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: carin.gerhardt@ufrgs.br. Phone: 055 51 99467887. Corresponding author.

2- Department of Horticulture and Silviculture, College of Agronomy, Federal University of Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves Av., 7712, zip code 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: magnolia.silva@ufrgs.br.

3- Natural Products Laboratory. Center of R&D Vegetable Genetic Resources. Agronomic Institute of Campinas (IAC), Post Office Box 28, zip code 13012-970, Campinas, SP, Brazil. Email: mortiz@iac.sp.gov.br

4- Institute of Food Science and Technology. Federal University of Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 9500, CEP 91505-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: jmwiest@ufrgs.br. Phone: 055 51 3308 7107.

ABSTRACT

There is a current trend of substituting conventional chemical antimicrobials in food products. Occasional allergic reactions, the formation of potentially carcinogenic by-products, and consumer and organic food producer demands are creating a need for more natural solutions. This study aimed to determine the bactericidal activity and chemical composition of citrus essential oils from an organic cultivation system. Essential oils of mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore var. 'Montenegrina'), oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck var. 'Valencia') and limes (*Citrus × latifolia* Tanaka) were obtained from a cooperative of organic citrus growers in the 'Caf' River Valley, RS, Brazil. Bactericidal activity was determined by the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) using the Macrodilution Method for *Escherichia coli* (ATCC® 25992), *Salmonella* Enteritidis (ATCC® 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212) and *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923). The chemical composition was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The bactericidal activity of oils showed high specificity against *E. faecalis*, with an average MBC of 0.5% (v/v). Lime oil was also effective against *S. aureus* (MBC of 0.75% v/v). In general, the oils had low activity against the other strains tested, a showing MBC higher than 8% (v/v). The chemical analysis revealed high contents of monoterpene hydrocarbons (99 – 100%). Oxygenated terpenes were only found in lime oil in the form of nerol and geraniol (1.28% and 2.2%, respectively). Higher and broader bactericidal activity of this oil was linked to higher of oxygenated monoterpene content and higher chemical complexity.

Keywords: organic cultivation system; bactericidal activity; citrus essential oil.

1. INTRODUCTION

Natural antimicrobials have been extensively studied in recent decades. Increasing concerns about health injuries from common additives in processed food and beverages are encouraging the food industry to find new alternative preservatives (Outtara & Mafu, 2003). Such inputs, which are mainly added to processed foods, are vital for maintaining quality and safety over the highest possible storage periods.

In food storage, antimicrobials are required both as preservatives and sanitizers. Common food preservatives are primarily weak organic acids, their salts, nitrites and nitrates, sulfur dioxide and sulfites. Regardless of their increasingly low acceptance, many are normally found in nature. According to Phillips (1971), nitrites and nitrates are present in spinach and beets and are used as curing agents in meat products. Benzoic and sorbic acids are found in some berries and are widely used as preservatives in many foods and beverages to protect against yeasts and molds (Chipley, 2005; Stopforth, Sofos & Busta, 2005). Sulfites occur as a natural consequence of fermentation in a number of foods and beverages (Lester, 1995), such as wine and beer.

The extensive use of a limited variety of food preservatives can increase their toxicological risks due to elevation of daily intake. Benzoates and sulfites are preservatives that are commonly related to allergic reactions in humans, such as immunological or non-immunological urticaria and asthma (Hannuksela & Haahtela, 1987). High consumption of nitrite results in the formation of a stable complex with hemoglobin (methemoglobin), causing asphyxia (Wolff & Wasserman, 1972). Nitrite was also reported to be a potential carcinogen, reacting with amines to form carcinogenic nitrosamines during meat product processing (Stopforth et al., 2005; Pobel, Riboli, Cornée, Hémon & Guyader, 1995).

In food sanitization and fresh-cut vegetables, the most widely used antimicrobial is chlorine. It has many advantages, such as low cost, established efficacy, and wide availability (Tsai, Schade & Molyneux, 1992). However, its disadvantages include reduced antimicrobial efficacy, generation of carcinogenic halogenated compounds with contact with organic matter, and production of high volumes of wastewater with high levels of biological oxygen demand (BOD) (Cords,

Burnett, Hilgren, Finley & Magnuson, 2005; Ölmez & Kretzschmar, 2009). There is a current trend of eliminating chlorine in disinfection processes (Ölmez & Kretzschmar, 2009).

Plant antimicrobials are extensively found in nature, produced partly by normal metabolism (such as organic acids) or as a response to environmental stress, physiological damage or microbiological attack (Peñuellas & Llusà, 2001; Boue et al., 2009). The antimicrobial characteristics of herbs and spices are traditionally used for food preservation. Traditional medicine has used plants and their extracts for curative purposes from the earliest records. Many essential oils (EO) and plant extracts show efficacy against a wide range of pathogenic and spoilage microorganisms, including bacteria, yeasts, molds and viruses (Dorman & Deans, 2000; Deans & Richie, 1987; Molnár et al., 2005). Significant bactericidal/bacteriostatic properties are attributed to a high percentage of phenolics, such as eugenol, carvacrol and thymol (Gutierrez, Barry-Ryan, & Bourke, 2008; Burt, 2004). A compilation of a wide range of EOs and their antimicrobial actions was compiled by Pauli and Schilcher (2010) from those listed in the 6th European Pharmacopoeia. Citrus essential oils are one of the most produced oils in the world, and studies have demonstrated that they possess antimicrobial activity (Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Fernández-López & Perez-Álvarez, 2008; Settani, Palazzolo & Guarrasi, 2012; Javed, Javaid, Mahmood, Javaid & Nasim, 2011; Fisher & Phillips, 2006).

There is evidence that the type of farming system affects the composition of plants (Williams, 2002). Some studies demonstrated that organically cultivated fruits and vegetables possess higher contents of secondary metabolites in comparison to those that are conventionally cultivated, which are directly linked to antimicrobial activity (Cowan, 1999). However, there is little information about the impact of the farming method on the composition of these metabolites (Brandt & Mølgaard, 2001). There is strong evidence of higher content of phenolic compounds (Asami, Hong, Barret & Mitchell, 2003; Vallverdú-Queralt, Medina-Remón, Casals-Ribes, Amat & Lamuela-Raventós, 2012; Caris-Veyrat et al., 2004) and vitamin C (Caris-Veyrat et al., 2004; Carbonaro, Mattera, Nicoli, Bergamo & Cappeloni, 2002). However, the influences of organic, agroecological, and biodynamic cultivation systems on the composition of essential oils are still poorly understood.

The main objective of this study was to determinate the antibacterial activity and chemical composition of organic citrus essential oils obtained by cold extraction.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Organic citrus essential oils

Certified organic citrus oils were kindly provided by a cooperative of organic producers of the Caí Valley in southern Brazil. The following citrus oils were tested: young and ripe organic mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore 'Montenegrina'), ripe organic 'Tahiti' Lime (*Citrus × latifolia* Tanaka) and ripe organic orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck 'Valencia'). All oils were obtained by cold expression (ripe fruits) and rasping of peels (young fruits), washing, centrifugation and winterization. They were stored at ≤ 0 °C until bacterial testing.

2.2. Antibacterial activity of oils

2.2.1. Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of oils

Escherichia coli (ATCC® 25992), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), *Salmonella* Enteritidis (ATCC® 13076), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853) were obtained from the standard bacterial culture collection of the Food Hygiene Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. These strains were maintained in BHI agar under refrigeration until antimicrobial testing, when they were grown in BHI broth at 36 ± 1 °C for ≤ 4 h (gram positive) or overnight (gram negative).

The antibacterial activity of extracts was determined by the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) through the Macro-dilution Method (NCCLS, 1999). Dilution methods evaluate the bactericidal activity of substances in the aqueous phase. However, the high hydrophobicity of citrus oils demanded the use of high amounts of polysorbate, a common surfactant usually applied in microbiological assays. High concentrations of this surfactant can inhibit bacterial growth (Rose, Aron & Janicki, 1966), biofilm formation (Toutain-Kidd, Kadivar, Bramante, Bobin & Zegans, 2009) and inactivate antibacterial substances at $\geq 1\%$ (Lehmann, 2001). In the flavor industry, propylene glycol is a food-grade surfactant with low antibacterial

activity used in some antimicrobial assays testing essential oils (Negi, Jayaprakasha, Rao & Sakariah, 1999). Considering that self-tests were previously performed using a mixture of polysorbate 80 and propylene glycol (unpublished results) and demonstrated total solubility (absence of turbidity) in 1% tangerine oil (v/v) and at 5% and 30% (v/v). First, a solution of surfactants and oil was made. This solution was diluted 2-fold in tubes containing 1 mL 2X Mueller-Hinton broth, reaching 8%, 4%, 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125% and 0.0625% (v/v) oil concentration. A MBC higher than 8% was not analyzed given its low solubility and sensorial impairment.

To prepare the cell suspension, the turbidity of previously grown inocula with actively growing cells was adjusted to the 0.5 McFarland standard using 0.1% peptone water. This suspension was added to the tubes of essential oil until a final concentration of 5×10^5 CFU/ml. The concentration of the cell suspension was confirmed by subculture in BHI agar in duplicate. The tubes were incubated for 20-24 h at 36 ± 1 °C, and 10 μ l of each one was subcultured in duplicate in BHI agar plates. Plates were incubated at 36 ± 1 °C and counted after 24 h to 48 h. The MBC represented the lowest concentration that killed at least 3 log CFU/ml of the initial inocula.

2.3. Chemical analysis

2.3.1. Gas chromatography of oils

Identification of substances was conducted in a gas chromatograph coupled with a mass spectrometer (CG-EM, Shimadzu, QP-5000) equipped with a fused-silica OV – 5 capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.), operated by electron impact (70 eV). The analysis was taken with an initial temperature of 60 °C until it reached 240 °C (3 °C/min.), injector at 240 °C, detector at 230 °C, helium as carrier gas at 1.0 mL/min, 1 μ l essential oil dilution in 1.3 ml ethyl acetate, split 1/20. Identification of substances was performed by comparing mass spectra with the system CG-EM database (Nist. 62 lib.), literature (Mclafferty & Stauffer, 1989) and retention index (Adams, 2007). The Kovats Retention Index (IK) was obtained by co-injection of a standard mixture of hydrocarbons (C9-C24), applying Van den Dool and Kratz equation (Van den Dool & Kratz, 1963).

2.4. Statistical analysis

MBC values were analyzed by SPSS software v.18 by one-way analysis of variance (ANOVA), and the difference between the means was compared by Tukey's test ($p < 0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The results of the antibacterial activity of oils and their chemical composition are shown in Table 1 and Table 2, respectively. In general, the results obtained by this microbiological assay indicated low activity of the oils against bacteria. The majority of the results showed a MBC above the detection limit (>8% v/v), mainly Gram-negative bacteria. However, strong and selective activity of oils was identified against *E. faecalis*, with an average MBC between 0.5% (v/v). Lime oil was also effective against *S. aureus* (MBC of 0.75% v/v).

Similar results were found by Espina et al. (2011) using different citrus oils. They found greater susceptibility of *Enterococcus*, followed by *S. aureus*, and high resistance of *E. coli*, *S. Enteritidis* and *P. aeruginosa*. Fisher & Phillips (2009) also achieved a low MIC for *E. faecalis* and *E. faecium* when testing a citrus oil blend. Previous studies testing crude citrus extracts showed a high resistance of *E. faecalis* (Gerhardt, Wiest, Girolometto, Da Silva & Weschenfelder, 2012). Such differences in susceptibility indicate that the hydrophobic compounds of citrus peel oils are more effective against *Enterococci*. Fisher & Phillips (2009) studied the effect of citrus oil blends and its vapors against *E. faecalis* and *E. faecium*, mainly showing morphological changes and an increase in cell permeability. This would have caused a loss of ions and dysregulation of the chemical gradients, resulting in dysfunction of the H⁺-ATPase pump. Uptake of oils was suggested by Cristani et al. (2007), considering that the cell wall of Gram-positive bacteria is usually permeable to antimicrobials. They also speculated that the hydrophobic portion of monoterpenes, which are the main constituent of citrus oils, interact with and insert into the lipidic fraction of plasma membranes, making it dysfunctional. Bacterial membranes are responsible for many important functions, such as energy transduction, solute transport, metabolic regulation and control of energy status and turgor pressure (Cox et al., 2000).

Lime oil showed the best bactericidal effect, mainly against Gram-positive bacteria. *E. faecalis* and *S. aureus* were inactivated by 0.31% and 0.75% (v/v), respectively. Low but detectable susceptibility was found for *S. Enteritidis* and *P. aeruginosa*, with a MBC of 8% (v/v). The most resistant strain was *E. coli*, which has shown high resistance against essential oils (Cristani et al., 2007; Lv, Liang, Yuan &

Li, 2011), as has *P. aeruginosa* (Espina et al., 2011, Burt, 2004). Deans & Richie (1987) also found lower susceptibility of these bacteria compared to *E. faecalis* and *S. aureus* in citrus oils. It is believed that Gram-negative strains are more resistant to essential oils because of their outer membrane, which restrict the penetration of macromolecules and hydrophobic compounds (Helander et al., 1998). The higher activity of lime oil could be due to its more complex list of chemicals. Different antibacterial compounds could act on different targets by permeabilizing the membrane to other substances that could interfere in intracellular metabolism. Furthermore, strong antibacterials such as the oxygenated monoterpenes nerol and geraniol were only found in lime oil. This class of terpenes is related to stronger antimicrobial activity when compared to hydrocarbon terpenes (Carson & Riley, 1995; Settani et al. 2012). Mandarin oils showed marked antibacterial activity against *E. faecalis*, resulting in a similar MBC for ripe and young mandarin (0.40%-0.42% v/v, respectively). *S. aureus* was more sensitive to oil from ripe fruits, mainly mandarin. Bourgou, Rahalt, Ourghemmi & Tounsi (2012) found that strains reacted differently to the ripening stage of citrus oils. *E. coli* was more susceptible to the oils of younger fruits of mandarin and lemon, while *S. aureus* responded inversely, confirming our results.

The results of the chromatographic analysis of unripe and ripe mandarin oils showed basic differences in sabinene (2.56%→0%), myrcene (traces→4.31%) and p-cymene (traces→0.73%) concentration. During mandarin maturation, Bourgou et al. (2012) found a reduction of sabinene (1.31→0.18%) and an increase in p-cymene (0.63→0.70%) content. Frizzo, Lorenzo & Dellacassa (2004) analyzed the chemical profile of the 'Montenegrina' mandarin, which was also grown in the Caí Valley, and found a reduction in monoterpene hydrocarbons and esters and an increase in oxygenated mono- and sesquiterpenes, sesquiterpene hydrocarbons, aldehydes and alcohols.

Except for lime oil, the oils presented no oxygenated phenolics and oxygenated monoterpenes, in contrast to the results of other authors who tested conventional citrus (Frizzo et al., 2004; Bourgou et al., 2012; Espina et al., 2011). The mandarin and orange (99%-100%) oil content almost completely consisted of hydrocarbon monoterpenes, which have a lower antibacterial activity compared to oxygenated ones (Settani et al., 2012; Carson & Riley, 1995; Consentino et al.,

1999). There is evidence that plants cultivated in organic systems have higher amounts of some phytochemicals such as phenolics (Lamperi et al., 2008; Asami et al., 2003; Koh, Charoenprasert & Mitchell, 2012; Caris-Veyrat et al., 2004). Most plants produce antimicrobial, antibiotic, insecticidal and hormonal agents either as a normal part of their metabolism of growth and development (inbuilt chemical barriers) or in response to pathogen attack or stress (phytoalexins) (Rosa, Bennett & Aires, 2007). Higher exposure to biotic and abiotic stress could result in higher production of these phytochemicals (Boue, 2009). Another factor that influences the biosynthesis of phytoalexins is the use of pesticides. They can positively or negatively modulate the content of phytoalexins because of its protective or toxic effects on the plant (Daniel, Meier, Shlatter & Frischnecht, 1999). Compounds such as phenolics are related to the highest antimicrobial activities in essential oils (Burt, 2004). Thymol and carvacrol are highly effective phenolics found in thyme and oregano oils as well as in citrus oils (Frizzo et al., 2004). These chemicals, however, were not identified in this study. Organic cultivation could have induced lower production of these antibacterial compounds, considering that this system can lead to lower stress in plants.

The cultivation system could also have affected the composition of the non-volatile fraction of oils in addition to its volatile fraction. Such compounds could have directly interfered in the antibacterial activity, considering the activity of the non-volatile citrus coumarins and psoralens (Stanley & Jurd, 1971; Mabry & Ulubelen, 1980; Johann et al., 2007; Girenavar et al, 2008), flavonoids (Johann et al., 2007; Benavente-García, 1987; Salas, Céliz, Geronazzo, Daz, & Resnik, 2011) and carotenoids (Molnár et al. 2005; Tao, Gao, Liu, & Ge, 2010). Therefore, new studies testing the antibacterial activity of citrus oils should analyze both the volatile and non-volatile fractions to obtain a better understanding of the impact of the cultivation system on their biocidal activity.

4. CONCLUSION

In general, essential oils of organic citrus showed selective activity against Gram-positive bacteria, mainly *E. faecalis*. The high susceptibility of this specific strain compared to other bacteria should be investigated. These data raise the possibility that one or more common components in citrus oils are related to this bactericidal effect. Only lime oil could inactivate Gram-negative strains, partially due to the presence of oxygenated hydrocarbons. However, high concentrations of this oil were required for inactivation (8% v/v). The absence of this class of components in most of oils may be linked to the farming system, considering that several studies found them in a diverse set of citrus oils. We recommend the investigation of non-volatile oil fractions given that they could interfere in the global antibacterial effect.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Brazilian funding agencies CNPq and CAPES for their financial support.

REFERENCE LIST

- Adams, R.P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. 4rd edn. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- Asami, D.K., Hong, Y.-H., Barret, D.M. & Mitchell A.E. (2003). Comparision of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn gorwn using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 1237-1241.
- Benavente-García, O. (1987). Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 4505-4515.
- Boue, S.M., Cleveland, T.E., Carter-Wientjes, et al. (2009). Phytoalexin-enriched functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 2614-2622.
- Bourgou, S., Rahalt, F.Z., Ourghemmi, I. & Tounsi, M.S. (2012). Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. *The Scientific World Journal*, **2012**, 1-10.
- Brandt, K., Mølgaard, J. P. (2001). Organic agriculture: Does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 924-931.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 223–53.
- Carbonaro, M., Mattera, M., Nicoli, S., Bergamo, P. & Cappeloni, M. (2002). Modulation of Antioxidant Compounds in Organic vs Conventional Fruit (Peach, *Prunus persica* L., and Pear, *Pyrus communis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5458-5462.
- Caris-Veyrat, C., Amiot, M.-J., Tyssandier, V. et al. (2004). Influence of organic versus conventional agricultural practice on the antioxidant microconstituent content of tomatoes and derived purees; consequences on antioxidant plasma status in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 6503-6509.

- Carson, C, Riley, J.J. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, **78**, 264–269.
- Chiple, J.R. (2005). Sodium benzoate and benzoic acid. In P.M. Davidson, J.N. Sofos & A.L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp.11-48). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Consentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B. et al. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, **29**, 130-135.
- Cords, B.R., Burnett, S.L., Hilgren, J., Finley, M. & Magnuson, J. (2005). Sanitizers: Halogen, surface-active agents, and peroxides. In P.M. Davidson, J.N. Sofos & A.L. Branen (Eds.). *Antimicrobials in food* (pp. 507-572). 3th ed. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 564-582.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., et al. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 170–175.
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G. et al. (2007). Interaction of four monoterpene contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 6300-6308.
- Daniel, O., Meier, M.S., Shlatter, J. & Frischnecht, P. (1999). Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications and modulation by pesticides. *Environmental Health Perspectives*, **107**, 109-114.
- Deans, S.G. & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, **5**, 165-180.
- Dorman, H.J.D. & Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 308-316.
- Espina, L. Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D. & Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their

antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, **22**, 896-902.

Fisher, K. & Phillips, C.A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, **101**, 1232-1240.

Fisher, K. & Phillips, C. (2009). The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Microbiology*, **106**, 1343-1349.

Frizzo, C.D., Lorenzo, D., Dellacassa, E. (2004). Composition and seasonal variation of the essential oils from two mandarin cultivars of southern Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 3036-3041.

Gerhardt, C., Wiest, J.M., Girolometto, G., Da Silva, M.A.S. & Weschenfelder, S. (2012). Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. *Brazilian Journal of Food Technology*, **IV SSA**, 11-17.

Girenavar, B., Cepeda, M.L., Soni, K.A., Vikram, A. et al. (2008). Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **125**, 204-208.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, **124**, 91-97.

Hannuksela, M. & Haahtela, T. (1987). Hypersensitivity reaction to food additives. *Allergy*, **42**, 561-575.

Helander, I.M., Alakomum H.-L., Latva-Kala, K. et al. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 3590-3595.

Javed, S., Javaid, A., Mahmood, Z., Javaid, A. & Nasim, F. (2011). Biocidal activity of citrus peel essential oils against some food spoilage bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 3697-3701.

Johann, S., De Oliveira, V.L., Pizzolatti, M.G. et al. (2007). Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **102**, 681-685.

Koh, E., Charoenprasert, S. & Mitchell, A.E. (2012). Effect of organic and conventional cropping systems on ascorbic acid, vitamin C, flavonoids, nitrate, and oxalate in 27 varieties of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 3144-3150.

Lamperi, L., Chiuminatto, U., Cincinelli, A. et al. (2008). Polyphenol levels and free radical scavenging activities of four apple cultivars from integrated and organic farming in different Italian areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 6536–6546.

Lehmann, R.H. (2001). Synergism in disinfectant formulation. In S.S. Block (Ed.), *Disinfection, Sterilization, and Preservation* (pp. 459–472). 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Lester, M.R. (1995). Sulfite sensitivity: significance in human health. *Journal of the American College of Nutrition*, **14**, 229-232.

Lv, F., Liang, H., Yuan, Q. Li, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, **44**, 3057-3064.

Mabry, T.J., Ulubelen, A. (1980). Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins, and lignans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **26**, 188-196.

McLafferty, F.W. & Stauffer, D.B. (1989). *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*. 2th ed. New York: Wiley.

Molnár, P., Kawase, M., Satoh K. et al. (2005). Biological Activity of Carotenoids in Red Paprika, Valencia Orange and Golden Delicious Apple. *Phytotherapy Research*, **19**, 700-707.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (1999). *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline M26-A*. Wayne, PA: NCCLS.

Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Jagan Mohan Rao, L. & Sakariah, K.K. (1999). Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 4297-4300.

Ölmez, H., Kretzschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT – Food Science and Technology*, **42**, 686-693.

Outtara, B. & Mafu, A.A. (2003). Natural antimicrobials in combination with gamma irradiation. In S. Roller (Ed.), *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods* (pp. 263-271). Boca Raton, FL: CRC Press.

Pauli, A. & Schilcher, H. (2010). *In vitro* antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia 6th edition. In K.H.C Başer & G. Buchbauer (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications* (pp. 353-548). Boca Raton, FL: CRC Press.

Peñuellas, J., Llusià, J. (2001). The complexity of factors driving volatile compounds emissions by plants. *Biologia Plantarum*, **44**, 481-487.

Phillips, W. E. J. (1971). Naturally occurring nitrate and nitrite in foods in relation to infant methaemoglobinaemia. *Food and Cosmetics Toxicology*, **9**, 219-228.

Pobel, D., Riboli, E., Cornée, J., Hémon, B. & Guyader, M. (1995). Nitrosamine, nitrate and nitrite in relation to gastric cancer: a case-control study in Marseille, France. *European Journal of Epidemiology*, **11**, 67-73.

Rosa, E.A.S., Bennett, R.N. & Aires, A. (2007). Levels and potential health impacts of nutritionally relevant phytochemicals in organic and conventional food production systems. In J. Cooper, U. Niggli, & C. Leifert (Eds.), *Handbook of organic food safety and quality* (pp.297-329). Boca Raton, FL: CRC Press.

Rose, M.J., Aron, S.A., Janicki, B.W. (1966). Effect of various nonionic surfactants on growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **91**, 1863-1868.

Salas, M.P., Céliz, G., Geronazzo, H., Daz, M. & Resnik, S.L. (2011). Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*, **124**, 1411-1415.

Settani, L., Palazzolo, E. & Guarrasi, V. (2012). Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control*, **26**, 326-330.

Stanley, W. L. & Jurd, L. (1971). Citrus coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **19**, 1106-1110.

Stopforth, J.D., Sofos, J.N. & Busta, F.F. (2005). Sorbic acid and sorbates. In P.M. Davidson, J.N. Sofos & A.L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp. 49-90). Boca Raton, FL: CRC Press.

Tao, N., Gao, Y., Liu, Y. & Ge, F. (2010). Carotenoids from the peel of shatian pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its antimicrobial activity. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*. **7**, 110-115.

Toutain-Kidd, C.M., Kadivar, S.C., Bramante, C.T., Bobin, S.A. & Zegans, M.E. (2009). Polysorbate 80 inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its cleavage by the secreted lipase LipA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**, 136-145.

Tsai, L., Schade, J.E., Molyneux, B.T. (1992). Chlorination of poultry chiller water: chlorine demand and disinfection efficiency. *Poultry Science*, **71**, 188–196.

Vallverdú-Queralt, A., Medina-Remón, A., Casals-Ribes, I., Amat, M. & Lamuela-Raventós, R.M. (2012). A metabolomic approach differentiates between conventional and organic ketchups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 11703-11710.

Van den Dool, H. & Kratz, D.J. (1963). A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, **11**, 463-467.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Perez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, **19**, 1130-1138.

Williams, C.M. (2002). Nutritional quality of organic food: shades of grey or shades of green? *The Proceedings of the Nutrition Society*, **61**, 19–24.

Wolff, I.A. & Wasserman, A.E. (1972). Nitrates, nitrites, and nitrosamines. *Science*, **177**, 15-19.

TABLES AND GRAPHICS

Table 1 - Minimum Bactericidal Concentration (MBC, % v/v) of the essential oils of ripe organic Mandarin (GM), young organic Mandarin (RM) (*Citrus deliciosa* Tenore), organic Lime (L) (*Citrus × latifolia* Tanaka) and organic Orange (O) (*Citrus sinensis* L. Osbeck) against five bacterial strains.

		MBC (% v/v ± sd)				
		Gram-positive		Gram-negative		
		<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>E. coli</i>
Mandarin	Ripe	0.42 ±0.14 a	8.0 ±0.0 a	> 8.0 ±0.0 *	> 8.0 ±0.0 *	> 8.0 ±0.0 *
	Young	0.40 ±0.14 a	> 8.0 ±0.0 *	> 8.0 ±0.0 *	> 8.0 ±0.0 *	> 8.0 ±0.0 *
Orange	Ripe	0.67 ±0.29 a	8.0 ±0.0 a	> 8.0 ±0.0 *	> 8.0 ±0.0 *	> 8.0 ±0.0 *
Lime	Ripe	0.31 ±0.13 a	0.75 ±0.29 b	8.0 ±0.0 *	8.0 ±0.0 *	> 8.0 ±0.0 *

Table 2 - Chemical composition (% relative) of the essential oils of young organic Mandarin (GM), ripe organic Mandarin (RM) (*Citrus deliciosa* Tenore), organic Lime (L) (*Citrus × latifolia* Tanaka) and organic Orange (O) (*Citrus sinensis* L. Osbeck).

	GM	RM	L	O	IK*	IK**
α -thujene	1.32	1.44	0.76	-	924	930
α -pinene	3.57	3.90	2.71	0.95	931	939
sabinene	2.56	-	2.27	-	970	975
β -pinene	3.59	2.75	14.38	1.24	974	980
myrcene	tr	4.31	1.90	2.93	987	990
hexyl acetate	-	-	-	0.75	1000	1009
α -terpinene	0.57	0.68	-	-	1015	1017
p-cymene	tr	0.73	-	-	1022	1024
limonene	62.65	61.46	53.50	94.14	1027	1029
γ -terpinene	24.59	23.16	16.53	-	1056	1059
terpinolene	1.15	1.11	0.60	-	1085	1088
nerol	-	-	1.28	-	1236	1238
geraniol	-	-	2.20	-	1266	1267
neryl acetate	-	-	1.13	-	1361	1361
α -trans-bergamotene	-	-	1.08	-	1433	1434
β -bisabolene	-	-	1.66	-	1505	1505

(*) Experimental Retention Index

(**) Theoretical Retention Index (Adams, 2007)

(tr) Traces of substance (tr \leq 0.45)

CAPÍTULO 4

APROVEITAMENTO DA CASCA DE CITROS NA PERSPECTIVA DE ALIMENTOS: PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Trabalho apresentado oralmente no IV Simpósio de Segurança Alimentar, em Gramado/RS, e publicado na revista “Brazilian Journal of Food Technology”, Campinas, IV SSA, v.15, p.11-17, 2012.

Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana

Utilization of citrus by-products in food perspective: screening of antibacterial activity

Autores | Authors

✉ Carin GERHARDT

Universidade Federal do
Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos
Departamento de Ciência dos Alimentos
Av. Bento Gonçalves, 9500
Caixa Postal: 15090
CEP: 91505-970
Porto Alegre/RS - Brasil
e-mail: carin.gerhardt@ufrgs.br

José Maria WIEST

Universidade Federal do
Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos
Departamento de Ciência dos Alimentos
Porto Alegre/RS - Brasil
e-mail: jmwiest@ufrgs.br

Giovani GIROLOMETTO

Universidade Federal do
Rio Grande do Sul (UFRGS)
Faculdade de Ciências Veterinárias
Porto Alegre/RS - Brasil
e-mail: giovanigiro@yahoo.com.br

Magnólia Aparecida Silva da SILVA

Universidade Federal do
Rio Grande do Sul (UFRGS)
Departamento de Horticultura e Silvicultura
Faculdade de Agronomia
Porto Alegre/RS - Brasil
e-mail: magnolia.silva@ufrgs.br

Simone WESCHENFELDER

Universidade Federal do
Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos
Departamento de Ciência dos Alimentos
Porto Alegre/RS - Brasil
e-mail: simone.weschenfelder@yahoo.com.br

✉ Autor Correspondente | Corresponding Author

Publicado | Published: dezembro/2012

Resumo

Os citros são as frutas mais produzidas e consumidas no mundo. O Brasil ocupa primeiro lugar na produção mundial e na exportação de suco de laranja, sendo o Estado do Rio Grande do Sul um importante produtor. Ao longo do cultivo e do processamento dos citros, são geradas toneladas de resíduos de baixo valor comercial, mas com grande potencial de aproveitamento dentro da indústria de alimentos. Esses resíduos possuem elevados teores de nutrientes, pigmentos e componentes bioativos, bem como possuem baixa toxicidade e baixo custo. Há evidências de que a casca de diferentes espécies de citros possui princípios ativos antibacterianos e antifúngicos. O objetivo deste trabalho, portanto, foi verificar a atividade antibacteriana de extratos alcoólicos da casca de citros na perspectiva da desinfecção e da conservação de alimentos, propondo alternativas sustentáveis e naturais voltadas a consumidores cada vez mais preocupados com sua saúde. Foram obtidos extratos alcoólicos da casca crua de bergamota-ponkan (*Citrus reticulata* Blanco), pomelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) e limão-bergamota (*Citrus limonia* Osbeck ou limão-cravo) maduros, provenientes de cultivo agroecológico, cujas atividades antibacterianas foram avaliadas quanto à Concentração Inibitória Mínima (CIM) e à Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente a cinco diferentes bactérias. O extrato de limão-bergamota apresentou a melhor atividade antibacteriana, apresentando CIM em torno de 24 mg.mL⁻¹ e CBM de 42 mg.mL⁻¹ para as bactérias mais resistentes. A bactéria mais sensível a todos os extratos foi *Pseudomonas aeruginosa*, com CIM entre 16 e 36 mg.mL⁻¹ e CBM entre 28 e 49 mg.mL⁻¹. Os extratos inibiram ou inativaram na sua totalidade as bactérias testadas, indicando a possibilidade de se tornarem alternativas naturais na desinfecção e na conservação de alimentos.

Palavras-chave: Casca de citros; Atividade antibacteriana; Extrato alcoólico; Desinfetante natural; CIM; CBM.

Summary

Citrus are the most produced fruits in the world. Brazil ranks first in global production and export of orange juice. The State of Rio Grande Do Sul is an important producer of citrus. During farming and processing of citrus, tons of residues are generated, with low commercial value and great potential for use in the field of food production. These residues possess many nutrients, pigments and bioactive compounds, as well as low toxicity and cost. There is evidence that the peel of citrus have antibacterial and antifungal activity. In this work, we aim to determine the antibacterial activity of ethanolic extracts of citrus peels in the perspective of disinfection and preservation of food, presenting sustainable and natural alternatives directed at consumers concerned with health. Ethanolic extracts of crude peel of ripe ponkan tangerine (*Citrus reticulata* Blanco), pomelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) and rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) were obtained from ecological family farms. Their antibacterial activities were evaluated regarding Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) against five different bacterial strains. The rangpur lime extract presented the best antibacterial activity, with about 24 mg.mL⁻¹ MIC and 42 mg.mL⁻¹ MBC for the most resistant strain. *Pseudomonas aeruginosa* was the most sensitive strain. All ethanolic extracts inhibited or inactivated all tested strains, indicating they could be used as natural alternatives in food disinfection and preservation.

Key words: Citrus peel; Antibacterial activity; Crude ethanolic extract; Natural disinfectant; MIC; MBC.

Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana

GERHARDT, C. et al.

1 Introdução

Os *Citrus* são as frutas mais produzidas e consumidas no mundo, principalmente laranjas, tangerinas, limas e limões (OLIVEIRA et al., 2008). O Brasil é o país que mais produz esse gênero, com 18.538.100 MT em 2008 (FAO, 2011). O Rio Grande do Sul (RS) se destaca na produção de tangerinas, sendo o terceiro produtor, depois de São Paulo e Paraná (EMBRAPA, 2011). O Estado tem produção estimada de 537 mil toneladas de citros, sendo que a atividade gera 250 milhões de reais anualmente (AGRIANUAL, 2009). Neste Estado, a citricultura é mais evidente nas regiões do Vale do Caí e Taquari, Alto Uruguai e Campanha, cuja base das três primeiras é fortemente familiar, gerando renda a cerca de 20 mil produtores (OLIVEIRA et al., 2010). Além disto, as indústrias envolvidas no beneficiamento e na comercialização são responsáveis por centenas de empregos, sendo importante fonte de renda para vários municípios (MONTENEGRO, 2011).

Tanto no cultivo quanto no processamento de citros podem ser gerados grandes volumes de resíduos. No manejo dos pomares de citros é realizado o raleio, que é a remoção e o descarte de parte dos frutos verdes para atingir melhor qualidade final de frutos. Já na extração de suco de citros, praticamente 50% do fruto é considerado subproduto (CHON e CHON, 1997). Atualmente, os resíduos de suco de laranja são aproveitados na forma de farelo de polpa cítrica peletizada, polpa congelada, melaço, d-limoneno, suco extraído da polpa (*Pulp Wash*), óleos essenciais, essência oleosa e essência aquosa (DARROS-BARBOSA e CURTOLO, 2005).

As características de fruto são esfericidade e presença de flavedo (porção superficial da casca) rico em flavonoides, fino e com pigmentação entre laranja escuro ou avermelhado, a laranja claro, amarelo ou verde (ORTIZ, 2002).

A casca dos frutos de citros possui diversos metabólitos secundários, responsáveis por sua proteção contra fatores bióticos e abióticos, como terpenoides, carotenoides, cumarinas, furanocumarinas e flavonoides, principalmente flavononas e flavonas polimetoxiladas, raras em outras plantas (AHMAD et al., 2006). Esses compostos estão presentes em extratos e óleos de citros, e têm despertado interesse em diversas áreas em virtude da bioatividade, como atividade antibacteriana (FRIEDMANN et al., 2004; DABBAH et al., 1970; BISIGNANO e SAIJA, 2002; FISHER e PHILLIPS, 2008; GIRENNAVAR et al., 2008; ASHOK KUMAR et al., 2011; STANLEY e JURD, 1971), antifúngica (LIU et al., 2012; CACCIONI et al., 1998; MABRY e ULUBELEN, 1980; STANLEY e JURD, 1971), antioxidante (PATIL et al., 2009; CHOI et al., 2000), inseticida (SISKOS et al., 2008), anti-inflamatória (MABRY e ULUBELEN, 1980), entre outras atividades. Estudos etnológicos encontraram registros

da utilização de citros para fins medicinais em 500 a.C. (ARIAS e RAMÓN-LACA, 2005). Apesar da extensa bioatividade, apenas recentemente as características antimicrobianas dos óleos de citros foram mais bem exploradas (FISHER e PHILLIPS, 2008). Óleos de citros já compõem diversas preparações farmacêuticas nas áreas de ginecologia, oftalmologia e cirurgia em função das suas propriedades antissépticas (BISIGNANO e SAIJA, 2002), porém ainda são pouco utilizados em alimentos.

Antimicrobianos naturais parecem ser alternativas viáveis na substituição de conservantes ou desinfetantes químicos (ASHOK KUMAR et al., 2011), estes muitas vezes poluidores, alérgenos (FREEDMAN, 1977; GOODMAN et al., 1990) e com pouca aceitação dos consumidores. Além disso, óleos de citros são considerados GRAS (Generally Recognised as Safe). Em alimentos, essas vantagens poderiam ser exploradas nas indústrias de bebidas e alimentos infantis, bem como em produtos orgânicos.

Na desinfecção convencional, a substância mais utilizada é o cloro. Porém, podem-se formar compostos organoclorados carcinogênicos, como os trihalometanos, na presença de matéria orgânica (ZARPELON e RODRIGUES, 2002). Além disso, o cloro é considerado altamente poluidor, podendo contaminar rios, solo e ar, causando prejuízos à fauna e à flora (MOREIRA, 2011), já que é utilizado em grandes quantidades e possui alto nível de DBO. Há uma tendência atual de eliminação do cloro em processos de desinfecção (ÓLMEZ e KRETZSCHMAR, 2009).

Neste trabalho propôs-se estudar a atividade antibacteriana dos extratos alcoólicos de três variedades diferentes de citros cultivadas no Rio Grande do Sul frente a bactérias importantes à segurança e à qualidade de alimentos, com vistas ao desenvolvimento de desinfetantes e conservantes naturais, de baixo custo, baixa toxicidade e biodegradáveis, aproveitando resíduos da indústria de alimentos.

2 Material e métodos**2.1 Material vegetal**

As variedades testadas foram bergamota-ponkan (*Citrus reticulata* Blanco), pomelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) e limão-bergamota (ou limão-cravo, *Citrus limonia* Osbeck). Todas as variedades foram colhidas maduras, no estágio de consumo. As amostras foram coletadas em propriedades agroecológicas de agricultura familiar, da cidade de Porto Alegre-RS (limão-bergamota e bergamota ponkan) e do Parque das Acácias, Parque Eldorado, Eldorado do Sul-RS, Região Metropolitana de Porto Alegre (pomelo).

Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana

GERHARDT, C. et al.

2.2 Determinação da Matéria Seca (MS)

Foi determinada a matéria seca das amostras vegetais por meio de secagem de 30 g de material em estufa com circulação forçada de ar, a 40 °C, até atingir peso constante, em três repetições.

2.3 Preparação de alcooluturas e extratos alcoólicos

Foram preparadas alcooluturas de epicarpo e mesocarpo do limão-cravo e da bergamota, bem como do epicarpo do pomelo, na proporção de 400 g para 1.000 mL de álcool 96 °GL. O material foi moído em moedor de carne, com diâmetro de saída de 6 mm, para a abertura das vesículas de óleo e melhor solubilização das substâncias da casca. Logo em seguida foi adicionado o álcool, agitado vigorosamente e armazenado em recipiente hermético, ao abrigo de luz, sob temperatura ambiente. Após maceração mínima de 15 dias, as alcooluturas foram filtradas e armazenadas sob as mesmas condições. A partir dos valores de MS, extrapolou-se para a concentração de matéria seca por mL de alcoolutura.

Para a obtenção dos extratos alcoólicos as alcooluturas foram submetidas à destilação fracionada sob pressão reduzida em sistema rota vapor até a retirada do álcool (aproximadamente 2/3 do volume inicial de alcoolutura). No momento da análise de sensibilidade a antimicrobianos, esses extratos foram diluídos em tubos de ensaio com água estéril, às proporções de 90% a 10%, em intervalos de 10%. Para a determinação da concentração dos extratos, utilizou-se o volume de alcoolutura inicial antes da evaporação, o volume de extrato obtido após a evaporação e o resultado da proporção de matéria seca na alcoolutura. Os extratos não foram totalmente secos durante a evaporação para que os compostos não se tornassem insolúveis (ELOFF, 2004).

2.4 Determinação da atividade antibacteriana dos extratos

As cepas utilizadas são provenientes da bacterioteca do Laboratório de Higiene de Alimentos, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, compreendendo: *Escherichia coli* (ATCC® 25992),

Enterococcus faecalis (ATCC® 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), *Salmonella* Enteritidis (ATCC® 13076) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853).

O teste de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado pelo Método de Macrodiluição, através do qual foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos, segundo as normas M7-A6 (CLSI, 2005) e M-26A (CLSI, 1999) do Clinical Laboratory and Standards Institute, respectivamente, com modificações. Foram preparados tubos de 10 mL contendo diferentes concentrações de extrato alcoólico, dos quais foi retirado 1 mL de cada concentração e adicionado a tubos contendo 1 mL de Caldo Mueller-Hinton (Himedia) duplamente concentrado e 3% de Polisorbato 80. Para a preparação do inóculo foi suspensa uma alçada da cultura bacteriana, previamente incubada em Ágar BHI e armazenada sob refrigeração, em 5mL de Caldo BHI (Himedia) e incubada por 18-24 horas (bactérias gram-negativas) ou por até 6 horas (bactérias gram-positivas), a 36 °C (± 1 °C). O inóculo foi ajustado para atingir 0,5 na escala de turbidez de McFarland ($1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ de *E. coli* ATCC® 25922) e diluído de modo que o inóculo desafio fosse $5 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$. Foram adicionados 100 μL de inóculo aos tubos com extrato e caldo Mueller-Hinton, que foram incubados a 36 °C (± 1 °C) por 24 horas. A CIM foi a menor concentração em que não se apresentou crescimento bacteriano visível. Para determinação da CBM, retiraram-se alíquotas de 10 μL , em duplicata, dos quatro tubos de menor concentração sem crescimento visível, plaqueou-se em Ágar BHI (Himedia) e incubou-se a 36 °C (± 1 °C) por 24 horas. A CBM foi considerada a menor concentração de extrato na qual ocorreu inativação 3 log UFC/mL do inóculo inicial. Os testes de sensibilidade foram realizados em triplicata.

2.5 Análise estatística

Os resultados de CIM e CBM para os diferentes extratos e bactérias foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$) no software SAS 9.0.

3 Resultados e discussão

Os resultados do percentual de Matéria Seca (MS) obtidos das amostras vegetais podem ser visualizados na Tabela 1. Pode-se observar que a bergamota-ponkan

Tabela 1. Resultados do percentual de Matéria Seca (MS) das amostras vegetais e seus equivalentes na alcoolutura e no extrato alcoólico final.

	MS (% g vegetal seco/g vegetal fresco)	MS alcoolutura (mg vegetal seco/mL alcoolutura)	Concentração do extrato alcoólico (mg vegetal seco/mL)
Pomelo	23,06% ($\pm 0,8\%$)	92,3	329,5
Bergamota ponkan	30,07% ($\pm 0,3\%$)	120,3	364,5
Limão-bergamota	17,16% ($\pm 0,3\%$)	68,6	245,1

Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana

GERHARDT, C. et al.

apresentou o maior teor de matéria seca, ou seja, a menor umidade. A casca do limão-bergamota apresentou maior umidade entre as variedades. Atribui-se esse resultado ao método de retirada da casca, já que, ao contrário das outras variedades, foi inicialmente extraído o suco e retirada a polpa. Nesse processo, a casca absorveu parte do suco, o que pode ter influenciado neste parâmetro. Considerando-se que, nos outros casos, não houve contato do suco com a casca, esses componentes podem ter interferido positivamente na atividade antimicrobiana da casca de limão-bergamota, já que alguns estudos apontam que o suco de limões possui atividade antimicrobiana (TOMOTAKE et al., 2006; ARAÚJO et al., 2007).

Os resultados de atividade antimicrobiana podem ser visualizados na Tabela 2. Todas as variedades apresentaram ação frente às bactérias testadas, tanto de inibição quanto de inativação. A variedade mais eficiente foi o limão-bergamota, que apresentou CIM em torno de 35 mg.mL⁻¹ para *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. Enteritidis* e *E. coli*. A bergamota-ponkan e o pomelo apresentaram atividades menores e não houve diferença significativa entre os valores de CIM e CBM destes cítricos. O melhor resultado obtido para limão-bergamota pode ter ocorrido em razão da interferência do suco, rico em ácidos orgânicos, como o ácido ascórbico. Há trabalhos que demonstram efeitos aditivos deste composto na ação de outros antimicrobianos (CURSINO et al., 2005; TAJKARIMI e IBRAHIM, 2011).

A bactéria mais sensível foi *P. aeruginosa*, com CIM entre 16 e 36 mg.mL⁻¹. Já a bactéria mais resistente aos extratos foi *E. faecalis*, que não foi inativada por nenhum dos extratos e apresentou os maiores valores necessários

de CIM e CBM, seguida de *E. coli*. Em média, a diferença de concentração entre a CIM e a CBM ficou em torno de 30 mg.mL⁻¹, exceto para a bactéria *E. faecalis*, que não foi inativada em todas as concentrações testadas e para todos os extratos. Ashok Kumar et al. (2011) realizaram análises de atividade antimicrobiana com extratos etanólicos de *Citrus lemon* e encontraram valores semelhantes aos obtidos nestas análises. Para a bactéria *E. coli*, foram obtidas CIM de 25 mg.mL⁻¹ e CBM de 50 mg.mL⁻¹ (24 e 43 mg.mL⁻¹ neste experimento, respectivamente), e para *S. aureus*, os valores de CIM foram 50 mg.mL⁻¹ e CBM > 50 mg.mL⁻¹ (24 e 32 mg.mL⁻¹, respectivamente).

Os resultados para CIM para os extratos de citros mostram que as bactérias testadas apresentaram inibição semelhante, porém a bactéria *P. aeruginosa* diferiu significativamente de *E. faecalis*. Nos resultados para CBM, as bactérias *E. faecalis* e *E. coli* não diferiram entre si, mostrando-se significativamente mais resistentes do que as outras ($p < 0,05$). *E. coli* diferiu somente de *P. aeruginosa* ($p < 0,05$), para CBM. Esses resultados indicam que os extratos não foram seletivos quando ao tipo de parede celular bacteriana, ao contrário do que se tem encontrado para óleos essenciais. Alguns estudos verificaram menor suscetibilidade de bactérias gram-negativas a óleos essenciais, provavelmente por causa da maior complexidade da parede celular (DABBAH et al., 1970; BISIGNANO e SAIJA, 2002; SMITH-PALMER et al., 2001). O mecanismo de ação dos óleos de citros, contudo, ainda não é conhecido (BISIGNANO e SAIJA, 2002). Na medida em que a maior parte das doenças transmitidas por alimentos (DTAs) é causada por bactérias gram-negativas, como *Salmonella* e *E. coli*, os

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de três diferentes extratos para cinco bactérias.

Bactéria	Extrato	CIM (mg.mL ⁻¹)	CBM (mg.mL ⁻¹)
<i>E. faecalis</i>	B. Ponkan	46,12 ^{ab}	92,24 ^{ab}
	Limão-bergamota	23,26 ^{aA}	41,34 ^{aA}
	Pomelo	44,87 ^{ab}	85,53 ^{ab}
<i>E. coli</i>	B. Ponkan	47,19 ^{ab}	75,51 ^{abB}
	Limão-bergamota	24,37 ^{aA}	42,91 ^{abA}
	Pomelo	49,10 ^{ab}	65,48 ^{abB}
<i>S. Enteritidis</i>	B. Ponkan	45,29 ^{abB}	59,44 ^{bcB}
	Limão-bergamota	24,37 ^{abA}	39,04 ^{bcA}
	Pomelo	40,67 ^{abB}	60,71 ^{bcB}
<i>S. aureus</i>	B. Ponkan	41,76 ^{abB}	55,68 ^{bcB}
	Limão-bergamota	24,37 ^{abA}	32,49 ^{bcA}
	Pomelo	49,10 ^{abB}	57,04 ^{bcB}
<i>P. aeruginosa</i>	B. Ponkan	34,89 ^{ab}	48,82 ^{cb}
	Limão-bergamota	16,24 ^{aA}	28,61 ^{aA}
	Pomelo	35,92 ^{ab}	44,87 ^{cb}

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença significativa entre as bactérias testadas ($p \geq 0,05$); letras maiúsculas iguais na mesma coluna ausência de diferença significativa entre os extratos testados ($p \geq 0,05$).

Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana

GERHARDT, C. et al.

extratos alcoólicos de citros se tornam interessantes na perspectiva de alimentos.

Na 6ª Edição da Farmacopeia Europeia (PAULI e SCHILCHER, 2010), são listadas as atividades médias de óleos de algumas espécies de citros comprovadamente antimicrobianas. Segundo essa farmacopeia, o CIM do óleo de limão e da bergamota-mandarina variou entre 0,5 e >20 mg.mL⁻¹. Contudo, o percentual de óleos nas cascas de citros é relativamente baixo. Segundo Júnior (2009), o rendimento de óleo para casca crua variou de 0,37 a 2,04%, em *Citrus aurantium* L. e *Citrus sinensis* Osbeck var. Mimo, respectivamente. Considerando-se esses valores, é interessante a utilização da casca inteira, já que existem outros componentes antimicrobianos que poderiam ser mais bem aproveitados, como as cumarinas (GIRENNAVAR et al., 2008) e os flavonoides (BISIGNANO e SAIJA, 2002), que poderiam agir sinergicamente entre si. Eloff et al. (2008) encontraram efeitos sinérgicos para diferentes componentes de *Combretaceae*, o que justificaria a utilização da casca integralmente, permitindo seu melhor aproveitamento.

As frutas testadas são provenientes de agricultura familiar agroecológica, a qual não utiliza fertilizantes, herbicidas e inseticidas químicos. Segundo Boue et al. (2009), plantas submetidas a esse tipo de prática cultural ficam mais vulneráveis a ataques de patógenos e, por isso, produzem maiores teores de metabólitos secundários, como os polifenóis. Além disso, a prática orgânica aumentaria o sistema de defesa antioxidante da planta. Lester et al. (2007) demonstrou que a toranja orgânica (*Grapefruit*) apresentou maiores quantidades de naringenina e ácido ascórbico. Além do ácido ascórbico, a naringenina também demonstrou possuir atividade antibacteriana (MANDALARI et al., 2007). É possível que os extratos testados sejam mais eficientes do que os de agricultura convencional, porém a comparação é difícil, já que poucos trabalhos utilizam o tipo de extração testado.

Em relação ao tipo de material vegetal utilizado, muitos dos trabalhos utilizam a casca seca na extração dos princípios ativos. Porém, Chanthaphon et al. (2008) encontraram melhores resultados de inibição utilizando cascas frescas, indicando que alguns inibidores podem ter sido perdidos durante a secagem, principalmente componentes voláteis. Além disso, a secagem em nível industrial é um processo caro e que exige investimentos altos. Por isso, indústrias de menor porte têm buscado alternativas para utilização de resíduos frescos de citros (SANTOS et al., 2001).

4 Conclusão

Todos os extratos de diferentes variedades de citros foram capazes de inibir e/ou inativar as bactérias testadas. Isso demonstra que, possivelmente, outras variedades de

citros também possuem ação antibacteriana e que podem ser estudadas na mesma perspectiva.

O aproveitamento de resíduos agroindustriais é vital para que seja minimizado seu impacto ambiental. Por isso, é fundamental que sejam exploradas alternativas para sua utilização. Os consumidores estão a cada dia mais preocupados com sua saúde, buscando produtos mais naturais, ecológicos e que atendam, ao mesmo tempo, suas expectativas quanto à segurança e à qualidade. Os resultados encontrados sugerem novas pesquisas acerca da sua efetividade como desinfetantes naturais ou conservadores.

Referências

- AGRIANUAL 2009: anuário brasileiro da fruticultura 2009. 14. ed. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2008. 504 p.
- AHMAD, M. M.; REHMAN, S.; IQBAL, Z.; ANJUM, F. M.; SULTAN, J. I. Genetic variability to essential oil composition in four citrus fruit species. *Pakistan Journal of Botany*, Karachi, v. 38, n. 2, p. 319-324, 2006.
- ARAÚJO, P. R. L.; ALMEIDA, F. R.; SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A. A.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Estudo antimicrobiano de sucos de frutas e hortaliças frente a isolados clínicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 47., 2007, Natal. *Anais eletrônicos...* Natal: ABQ-RN, 2007. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/777-602-750.htm>. Acesso em: 21 jan. 2012.
- ARIAS, B. A.; RAMÓN-LACA, L. Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 97, n. 1, p. 89-95, 2005. PMID:15652281. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.019>
- ASHOK KUMAR, K.; NARAYANI, M.; SUBANTHINI, A.; JAYAKUMAR, M. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of citrus fruit peels – utilization of fruit waste. *International Journal of Engineering Science and Technology - IJEST*, Singapore, v. 3, n. 6, p. 5414-21, jun. 2011.
- BISIGNANO, G.; SAIJA, A. The biological activity of citrus oils. In: DUGO, G.; DI GIACOMO, A. (Eds.). *Citrus: the Genus Citrus*. Boca Raton: CRC Press, 2002. 642 p. cap. 28, p. 602-630.
- BOUE, S. M.; CLEVELAND, T. E.; CARTER-WIENTJES, C.; SHIH, B. Y.; BHATNAGAR, D.; McLACHLAN, J. M.; BUROW, M. E. Phytoalexin-enriched functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 57, n. 7, p. 2614-2622, 2009. <http://dx.doi.org/10.1021/jf8040403>
- CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 43, n. 1-2, p. 73-79, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00099-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00099-3)

Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana

GERHARDT, C. et al.

- CHANTHAPHON, S.; CHANTHACHUM, S.; HONGPATTARAKERE, T. Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus spp.* against food-related microorganisms. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Songkhla, v. 30, n. 1, p. 125-131, apr. 2008.
- CHOI, H.; SONG, H. S.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Radical-Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 9, p. 4156-4161, 2000. <http://dx.doi.org/10.1021/jf000227d>
- CHON, R.; CHON, A. L. Subprodutos del procesado de las frutas. In: ARTHEY, D.; ASHURST, P. R. (Eds.). **Procesado de Frutas**. Zaragoza: Acirbia, 1997. 273 p.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada, Sexta Edição – M7 – A6**. Pennsylvania: CLSI, 2005. v. 23, n. 2. Tradução pela ANVISA com permissão do CLSI.
- CLINICAL LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **M26-A: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents**. Wayne: CLSI, 1999. v. 18, n. 18. Approved Guideline.
- CURSINO, L.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Synergic Interaction between Ascorbic Acid and Antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 3, p. 379-384, may 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132005000300007>
- DABBAH, R.; EDWARDS, V. M.; MOATS, W. A. Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. **Applied Microbiology**, Washington, v. 19, n. 1, p. 27-31, jan. 1970.
- DARROS-BARBOSA, R.; CURTOLO, J. E. Produção industrial de suco e subprodutos cítricos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRÍ, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Orgs.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fapesp, 2005. cap. 28, p. 839-870.
- ELOFF, J. N. Quantification the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay guided fractionation (Letter to the Editor). **Phytomedicine**, Jena, v. 11, p. 370-371, 2004.
- EMBRAPA. **Planilhas**. Embrapa, 2011. Disponível em: <<http://www.cnpqm.embrapa.br/planilhas/>>. Acesso em: 14 jun. 2011.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **FAOSTAT – FAO Statistics Division/ Production: About (country by commodities)**. Roma: FAO, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 10 jun. 2011.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus an answer? **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 19, n. 3, p. 156-164, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.11.006>
- FREEDMAN, B. J. Asthma induced by sulphur dioxide, benzoate and tartrazine contained in orange drinks. **Clinical & Experimental Allergy**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 407-415, 1977. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.1977.tb01471.x>
- FRIEDMANN, M.; HENIKA, P. R.; LEVIN, C. E.; MANDRELL, R. E. Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 19, p. 6042-6048, 2004. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0495340>
- GIRENNAVAR, B.; CEPEDA, M. L.; SONI, K. A.; VIKRAM, A.; JESUDHASAN, P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PILLAI, S. D.; PATIL, B. S. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 204-208, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.028>
- GOODMAN, D. L. Chronic urticaria exacerbated by the antioxidant food preservatives, butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 86, n. 1-4, p. 570-575, 1990.
- LESTER, G. E.; MANTHEY, J. A.; BUSLIG, B. S. Organic vs Conventionally Grown Rio Red Whole Grapefruit and Juice: Comparison of Production Inputs, Market Quality, Consumer Acceptance, and Human Health-Bioactive Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 4474-4480, 2007.
- LIU, L.; XU, X.; CHENG, D.; YAO, X.; PAN, S. Structure-Activity relationship of Citrus polymethoxylated flavones and their inhibitory effects on *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 12, p. 4336-4341, 2012.
- MABRY, T. J.; ULUBELEN, A. Chemistry and Utilization of Phenylpropanoids Including Flavonoids, Coumarins and Lignans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 28, n. 2, p. 188-196, 1980.
- MANDALARI, G.; BENNETT, R. N.; BISIGNANO, G.; TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; FAULDS, C. B.; GASSON, M. J.; NARBAD, A. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 6, p. 2056-2064, 2007. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03456.x>
- MONTENEGRO (Município). Secretaria Municipal de Agricultura e Meio Ambiente - SMAM. **Município: Dados Citricultura**. SMAM, 2011. Disponível em: <<http://www.montenegro.rs.gov.br/>>. Acesso em: 16 jul. 2011.
- MOREIRA, C. **Operadores de ETAs da Sanecap Recebem Treinamento para Manuseio de Cloro Gás**. Blog Da Mesa do C.L.O., 26 jan. 2011. Disponível em: <<http://claudiomoreira.wordpress.com/2011/01/26/operadores-de-etras-da-sanecap->

Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacterianaGERHARDT, C. *et al.*

recebem-treinamento-para-manuseio-de-cloro-gas/>. Acesso em: 11 jul. 2011.

OLIVEIRA, R. P.; EPIFÂNIO, N. B.; SCIVITTARO, W. B. A nova citricultura na fronteira oeste do Rio Grande do Sul. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CITRICULTURA DO RIO GRANDE DO SUL, 2008, Alpestre. **Anais...** Alpestre: EMATER-RS, 2008. p. 60-66.

OLIVEIRA, R. P.; SCHRODER, E. C.; ESSWEIN, F. J.; SCIVITTARO, W. B. **Produção Orgânica de Citros no Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 296 p. (Sistema de Produção, n. 20).

ÖLMEZ, H.; KRETZSCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 3, p. 686-693, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001>

ORTIZ, J. M. Botany: taxonomy, morphology and physiology of fruits, leaves and flowers. In: DUGO, G.; DI GIACOMO, A. (Eds.). **Citrus: the Genus Citrus**. Boca Raton: CRC Press, 2002. 642 p.

PATIL, J. R.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K.; CHETTI, M. B.; PATIL, B. S. Bioactive Compounds from Mexican Lime (*Citrus aurantifolia*) Juice Induce Apoptosis in Human Pancreatic Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 10933-10942, 2009. <http://dx.doi.org/10.1021/jf901718u>

PAULI, A.; SCHILCHER, H. In vitro antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia 6th edition. In: BAŞER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (Eds.). **Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2010. 975 p.

SANTOS, G. T.; ÍTAVO, L. C. V.; MODESTO, E. C.; JOBIM, C. C.; DAMASCENO, J. C. Silagens Alternativas de resíduos agro-industriais. In: Simpósio sobre utilização de forragens conservadas, 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO, 2001. p. 262-285.

SISKOS, E. P.; MAZOMENOS, B. E.; KONSTANTOPOULOU, M. A. Isolation and identification of insecticidal components from *Citrus aurantium* fruit peel extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 14, p. 5577-5581, 2008. <http://dx.doi.org/10.1021/jf800446t>

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 4, p. 463-470, 2001. <http://dx.doi.org/10.1006/fmic.2001.0415>

STANLEY, W.; JURD, L. Citrus Coumarins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 19, n. 6, p. 1106-1110, 1971. <http://dx.doi.org/10.1021/jf60178a007>

TAJKARIMI, M.; IBRAHIM, S. Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 6, p. 801-804, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.030>

TOMOTAKE, H.; KOGA, T.; YAMATO, M.; KASSU, A.; OTA, F. Antibacterial activity of citrus fruit juices against *Vibrio* species. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 52, n. 2, p. 157-160, 2006. <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.52.157>

ZARPELON, A.; RODRIGUES, E. M. Os trihalometanos na água de consumo humano. **Revista Técnica da Sanepar**, Curitiba, v. 17, n. 17, p. 20-30, 2002. Disponível em: <<http://www.sanepar.com.br/sanepar/sanare/v17/TRIHALOMETANOS.htm>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

CAPÍTULO 5

Discussão Geral

1 DISCUSSÃO GERAL

A motivação para a realização deste trabalho foi aliar questões gerais, como o aproveitamento de resíduos industriais e a busca por produtos naturais alternativos aos convencionais, a questões regionais, como a tradição e a força do cultivo de citros no Rio Grande do Sul e no Brasil. Os incentivos governamentais à sustentabilidade são cada vez maiores, gerando benefícios diretos à produção orgânica, principalmente daquela proveniente da agricultura familiar. O desenvolvimento de agroindústrias de pequeno porte também tem sido foco como uma forma de aumentar a renda, fixar as pessoas no campo, incentivar a produção local, e aumentar o número de empregos em regiões que ocupam pouca mão de obra (UCHA, 2011; DUARTE, 2012).

Há uma demanda crescente de produtos antimicrobianos seguros para o uso, e ao mesmo tempo eficazes, de baixo custo e de fácil obtenção, principalmente na perspectiva da produção orgânica. Os citros são frutas de fácil acesso: estão largamente difundidas por propriedades citrícolas de diversos portes, ou fazem parte dos pomares de propriedades familiares para consumo próprio. Os resultados encontrados sugerem que os citros poderiam ser uma alternativa na desinfecção. A sua preparação é de certo modo rudimentar, à exceção da obtenção de extratos por destilação, realizada neste trabalho. O etanol, além de solvente extrator, é um conservador natural que demonstrou, neste estudo, manter os princípios ativos por muitos meses, mesmo sob temperatura ambiente (resultados não publicados). Isso permite que, durante a safra de citros, as alcoolaturas sejam elaboradas e armazenadas para utilização ao longo do ano. Devido ao teor de umidade das cascas e frutos verdes, a maioria das alcoolaturas atingiu percentual alcoólico em torno de 70% (v/v), valor em que o álcool etílico possui a maior eficácia na desinfecção (PRICE, 1950). Além disso, ele é um solvente de baixa toxicidade, e de fácil obtenção e aplicação (SANTOS et al., 2002).

Pode-se aproximar o uso direto das alcoolaturas de forma bastante simples. Por exemplo, o CBM do extrato de tangerina 'Montenegrina' verde para a bactéria mais resistente é de, aproximadamente, 15%. Na sua obtenção, houve uma concentração até atingir 1/3 do volume inicial, portanto, 15 ml de extrato

correspondem a 45 ml de alcoolatura. Ou seja, pode-se preparar um desinfetante a partir da alcoolatura de frutos verdes de tangerina diluindo-se 45 ml em 55 ml de água.

Para fins de aplicação direta, uma importante questão a ser levantada é se óleos e extratos seriam igualmente efetivos *in loco*. Os resultados dos testes de suspensão apresentados no Capítulo 2 confirmaram que, para ser eficaz em tempos usuais (30 min.), há a necessidade de utilizar concentrações mais altas de extrato quando comparados à CIM e à CBM. Os resultados indicados pelo Teste de Macrodiluição *in vitro* servem, portanto, apenas para fins de comparação e indicação preliminar da ação antibacteriana. A utilização direta em alimentos exige novos testes, já que alguns desinfetantes têm ação reduzida quanto em contato com componentes orgânicos, como o cloro (MOORE; PAYNE, 2004). Testes de diluição e suspensão utilizando substratos de diferentes agroindústrias, como proteínas do leite e de carnes, amidos, açúcares, sais e ácidos, devem ser realizados para verificar a sua interferência.

Com o objetivo de ampliar a possibilidade de utilização dos extratos, sugere-se analisar outros tipos de extração sem a etapa de destilação. Estudos não publicados realizados no laboratório indicaram que o aumento do volume destilado impactou negativamente na atividade de alguns extratos, como se pode observar no Apêndice A. Entre as hipóteses estão: a redução da solubilidade e precipitação de componentes com a retirada do solvente, a perda de óleos essenciais por evaporação e a contribuição do álcool residual à atividade antibacteriana. A última hipótese foi excluída devido ao baixo teor de álcool residual encontrado. As observações permitem sugerir que alcoolaturas de citros possuem atividade superior aos extratos, de modo que não passam pela destilação.

De uma forma geral, o estudo indicou grande potencial de aplicação de extratos etanólicos de citros na perspectiva da conservação e desinfecção. Aqueles obtidos a partir de frutos verdes, principalmente, demonstraram amplo poder bacteriostático e bactericida mesmo sob concentrações relativamente baixas ($\leq 5\%$ de extrato) (Capítulo 2, Tabela 2). Diferenças marcantes de atividade de porções oleosas e aquosas de citros frente às bactérias *P. aeruginosa* e *E. faecalis* (Capítulos 2 e 3) levantam perguntas a respeito das diferenças entre os seus mecanismos de ação e sua especificidade. Também sugerem estudos sobre o sinergismo dessas frações com o objetivo de aumentar seu espectro de ação e

efetividade, considerando também o sinergismo observado entre extratos da casca e da polpa para o limão 'Cravo'. *E. faecalis* apresentou-se como uma das cepas mais resistentes aos extratos, enquanto em relação aos óleos, foi a mais susceptível. Para a bactéria *P. aeruginosa* ocorreu exatamente o inverso. Esses resultados indicam que a adição de óleo aos extratos etanólicos pode ter efeitos de ampliação do seu espectro de ação. A especificidade da ação dos óleos de citros contra *E. faecalis* também levanta perguntas acerca dos mecanismos de ação contra essa cepa bacteriana. Nesse ponto, sugere-se então estudos futuros sobre a ação de componentes lipossolúveis e hidrossolúveis, seu sinergismo, e a sua ação em nível de parece celular e sobre o metabolismo de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Além da ação antibacteriana propriamente dita, os citros possuem diversos componentes antioxidantes que poderiam evitar diversas reações oxidativas nos alimentos, como o escurecimento enzimático e a rancificação de gorduras. Na desinfecção de vegetais é utilizado o hipoclorito de sódio, um produto altamente oxidante. Esta seria outra vantagem do uso deste antimicrobiano natural. Indica-se aqui a melhor investigação da ação desses componentes, já que além de atividade antioxidante, muitos têm apresentado atividade antimicrobiana, como os flavonoides, compostos fenólicos e limonoides cítricos, conforme já comentado anteriormente.

Geralmente, a concentração de componentes ativos em plantas aromáticas e condimentares é muito baixa para serem eficazes sem prejudicar as características sensoriais (NAIDU, 2000). Sistemas de preservação multifatoriais (*Hurdle technology*), que combinam diferentes fatores inibitórios com reduzido impacto sensorial, podem ser, portanto, alternativas. A combinação de radiações, atmosfera modificada, tratamentos térmicos e a utilização de outras formas de preservação têm demonstrado favorecer a ação desses extratos e permitir a extensão da vida de prateleira de diversos alimentos (OUATTARA; MAFU, 2003).

Entre as dificuldades encontradas relata-se, principalmente, a turbidez do meio nos teste de Macrodiluição, tanto para óleos quanto para alguns extratos. A visualização da CIM foi prejudicada, principalmente com os extratos de tangerina 'Ponkan' e laranja 'Valência' maduras. Extratos de frutos verdes geralmente se mostraram límpidos, porém apresentaram maior conteúdo de substâncias precipitadas, possivelmente óleos e resinas. A principal hipótese para a turbidez é o maior conteúdo de pectina e óleos de cascas maduras. É possível que a utilização

de pectinases pudesse ter contornado o problema. Nos testes utilizando óleos, sugere-se otimizar a combinação de polissorbato 80 e propileno glicol para obter emulsões translúcidas. Assim será possível identificar, também, a concentração inibitória mínima.

De uma maneira geral, há uma série de análises que podem ser realizadas a partir dos resultados encontrados. O grande potencial de utilização e as vantagens demonstradas pelos extratos de citros em diversos processos em alimentos e, possivelmente, em cosméticos, juntamente à crescente necessidade de produtos naturais alternativos, justifica estudos mais aprofundados acerca da sua ação, com futuro promissor.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.; SMID, E. Nisin in multifactorial food preservation. In: ROLLER, S. (Ed.). **Natural antimicrobials for the minimal processing of foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. Cap.2, p.11-33.
- ALTIERI, M. **Agroecologia**: A dinâmica produtiva da agricultura sustentável. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2009. 117p.
- AQIL et al. Targeted screening of bioactive plant extracts and phytochemicals against problematic groups of multidrug-resistant bacteria. In: AHMAD, I.; AQIL, F.; OWAIS, M. (Ed.). **Modern Phytomedicine**: turning medicinal plants into drugs. Weinheim: Wiley, 2006. Cap.9, p.173-198.
- ARAÚJO, E. F.; ROQUE, N. **Taxonomia dos citros**. In: JUNIOR, D. M. et al. (Ed.). Citros. Anhangüera: Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC, 2005. Cap. 6, p.125-145.
- ARRIGONI, O.; DE TULLIO, C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1569, p.1-9, 2002.
- ASAMI, D.K. et al. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, p.1237-1241, 2003.
- ASHOK KUMAR, K. et al. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of citrus fruit peels – utilization of fruit waste. **International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)**, Singapore, v.3, n.6, p.5414-5421, 2011.
- BANGERTH, F. Abscission and thinning of young fruit and their regulation by plant hormones and bioregulators. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.31, p.43-59, 2000.
- BARROS, H.R.M.; FERREIRA, T.A.P.C.; GENOVESE, M.I. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. **Food Chemistry**, London, v.134, p.1892-1898, 2012.

BELLETTI, N. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, p.6932-6938, 2004.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of *citrus* flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.56, p.6185-6205, 2008.

BENAVENTE-GARCÍA, O. et al. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.45, n.12, p.4505-4515, 1997.

BOUE, S. M. et al. Phytoalexin-enriched functional foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.57, p. 2614–2622, 2009.

BRASIL. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 dez. 2003, Seção 1, p.8.

_____. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento e Ministério da Saúde. Instrução Normativa Conjunta nº 18, de 28 de maio de 2009. Aprova o Regulamento Técnico para o Processamento, Armazenamento e Transporte de Produtos Orgânicos. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 mai. 2009a. n.101-E, Seção 1, p. 15-16.

_____. Ministério da Educação. Resolução/CD/FNDE nº 38, de 16 de julho de 2009. Dispõe sobre o atendimento da alimentação escolar aos alunos da educação básica no Programa Nacional de Alimentação Escolar - PNAE. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jul. 2009b, Seção 1, p.10-15.

_____. Ministério do Desenvolvimento Agrário. **Alimentos orgânicos estão mais presentes na mesa do brasileiro**. Brasília: MDA, 2012. Seção notícias. Disponível em: <http://www.mda.gov.br/portal/noticias/item?item_id=9487475>. Acesso em: 16 fev. 2013.

_____. Ministério do Desenvolvimento Social. **Programa de Aquisição de Alimentos**. Brasília: MDS, 2013. Disponível em: <<http://www.mds.gov.br/segurancaalimentar/decom/paa>>. Acesso em: 15 fev. 2013.

BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. **Cadeia produtiva de produtos orgânicos**. Série Agronegócios, v. 5. Brasília: IICA/MAPA/SPA, 2007. 108 p.

CACCIONI, D.R.L. et al. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.43, p.73-79, 1998.

CARIS-VEYRAT, C. et al. Influence of organic versus conventional agricultural practice on the antioxidant microconstituent content of tomatoes and derived purees; consequences on antioxidant plasma status in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, p.6503-6509, 2004.

CARVALHO, H.H.C.; CRUZ, F.T. da; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/BR. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 7, n.3, p. 25-32, 2005.

CONSELHO EM REVISTA. Produtividade de Qualidade na Fruticultura Gaúcha. Revista mensal do Conselho Regional de Engenharia e Arquitetura do Rio Grande do Sul. Março 2008. Nº 43. 34p.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997–1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 342–346, 2002.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington (D.C.), p. 564–582, 1999.

DARROS-BARBOSA, R.; CURTOLO, J.E. Produção industrial de suco e subprodutos cítricos. In: JUNIOR, D.M. et al. (Ed.). **Citros**. Anhanguera: Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC, 2005. Cap. 28, p. 839-870.

DI GIACOMO, A.; DI GIACOMO, G. Essential oil production. In: DUGO, G.; DI GIACOMO, A (ed.). **Citrus: the Genus Citrus**. Boca Raton: CRC Press, 2002. Cap.8, p.114-147.

DUARTE, R. **Governo gaúcho decreta incentivos à agroindústria familiar no RS. Política**. Sul 21. Disponível em: <<http://www.sul21.com.br/jornal/2012/07/governo-decreta-incentivos-a-agroindustria-familiar-no-rs/>>. Acesso em: 17 fev. 2012.

DULLEY, R. D. Agricultura orgânica, biodinâmica, natural, agroecológica ou ecológica? **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 33, n. 10, p.96-99, 2003.

ECOCITRUS. Disponível em: <<http://www.ecocitrus.com.br/>>. Acesso em: 16 fev. 2013.

EMBRAPA. **Marco referencial em agroecologia**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 70p.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Planilhas**. Disponível em: <<http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/>>. Acesso em: 14 jun. 2011.

ESPINA, L. et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, Guildford, v.22, p.896-902, 2011.

FALIVENE, S., HARDY, S. **Hand thinning citrus**. Primefact 789, NSW Department of Primary Industries, August, 2008. Disponível em: http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0003/242814/Hand-thinning-citrus.pdf. Acesso em: 17 fev. 2012.

FERNANDEZ-LÓPEZ, J. et al. Application of functional citrus by-products to meat products. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.15, p.176-185, 2004.

_____. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. **Meat Science**, Barking, v. 69, p.371-380, 2005.

FISHER, K.; PHILLIPS, C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, p.1232-1240, 2006.

_____. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus an answer? **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 19, p.156-164, 2008

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAO Statistics Division/Production - FAOSTAT**. Crops: citrus fruit. Roma: FAO, 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 17 fev. 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry**: frequently asked questions about GRAS. December 2004. Disponível em: <<http://www.fda.gov/>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **GRAS Notice Inventory**. New Hampshire: USFDA. Disponível em: <www.fda.gov>. Acesso em: 16 fev. 2013.

FORSYTHE, S. **Microbiology of Safe Food**. 2 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2000. 496 p.

FRANK, C. et al. Epidemic profile of shiga-toxin–producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.365, n.19, p.1771-1780, 2011.

GEIMBA, M. P. et al. Serological characterization and prevalence of spvR genes in Salmonella isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, p.1229–1233, 2004.

GIRENNAVAR, B. et al. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.125, p.204–208, 2008.

GIROLLOMETTO, G. et al. Atividade antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis* A St.Hil.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 11, p. 49–55, 2009.

HASSE, G. A rainha da primavera. **Globo Rural**. Seção Reportagens, São Paulo, n.299, set. 2010. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,ERT168644-18283,00.html>>. Acesso em: 17 fev. 2013.

HOFFMANN, S. et al. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.75, n.7, 2012.

HUA, G.; RECKHOW, D.A. Comparison of disinfection byproduct formation from chlorine and alternative disinfectants. **Water Research**, New York, v.41, p.1667–1678, 2007.

IBGE. **Censo Agropecuário 2006**: Brasil, regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. 777p.

IPPOLITO, A.; NIGRO, F. Natural antimicrobials in postharvest storage of fresh fruits and vegetables. In: ROLLER, S. (Ed.). **Natural antimicrobials for the minimal processing of foods**. Boca Raton: Woodhead Publishers, CRC Press, 2003. Cap.10, p.201–234.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 6. ed. Maryland: Aspen Publishers Inc. 2000. 635 p.

JOHANN, S. et al. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. Peels. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, n.6, p.681–685, 2007.

KIMBALL, D.; PARISH, M.E.; BRADDOCK, R. Oranges and tangerines. In: BARRET, D.M.; SOMOGYI, L.; RAMASWAMY, H. (Ed.). **Processing Fruits: Science and Technology**. (2 ed.). Boca Raton: CRC Press, 2005. Cap. 25, p.617–638.

KRIS-ETHERTON, P.M. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, New York, v.113, n.98, p.71S–88S, 2002.

LADANIYA, M. **Citrus fruit: biology, technology and evaluation**. San Diego, CA: Academic Press, 2008. 576p.

LICANDRO, G.; ODIO, C. E. Citrus by-products. In: DUGO, G.; DI GIACOMO, A (Ed.). **Citrus: the Genus Citrus**. Boca Raton: CRC Press, 2002. Cap.11, p.159–178.

LOCKIE, S. et al. Eating 'green': motivations behind organic food consumption in Australia. **Sociologia Ruralis**, Assen, v.42, n.1, p.23–40, 2002.

LOKHANDWALA, J. A.; CHENG, G. **Juice extractor including cutter components for enhanced quality and yield performance and associated methods**. US Patent Application Publication, n. 0069159, 15 Abr. 2004. 9f.

MABBERLEY, D.J. A classification for edible *Citrus*. **Teloepa**, Wales, v.7, n.2, 167–172, 1997.

MABRY, T.J.; ULUBELEN, A. Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins, and lignans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.26, p.188–196, 1980.

MANNER et al. **Citrus (citrus) and Fortunella (kumquat)**. Species profiles for Pacific island agroforestry. Traditional Tree Initiative. Abr. 2006. Disponível em: <<http://www.traditionaltree.org/>>. Acesso em: 15 jul. 2011.

MANNERS, G.D. Citrus limonoids: analysis, bioactivity, and biomedical prospects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.55, p.8285–8294, 2007.

MCLELLAN, M.R.; PADILLA-ZAKOUR, O.I. In: BARRET, D.M.; SOMOGYI, L.; RAMASWAMY, H. (Ed.). **Processing Fruits: Science and Technology**. (2 ed.). Boca Raton: CRC Press, 2005. Cap.20, p.497–512.

MEDEIROS, J.S. et al. Ensaio toxicológico clínico da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*), como alimento com propriedade de saúde. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n.2A, p.394–399, 2009.

MEXIS, S.F.; CHOULIARA, E.; KONTOMINAS, M.G. Shelf life extension of ground chicken meat using an oxygen absorber and a citrus extract. **LWT – Food Science and Technology**, London, v.49, p.21–27, 2012.

MOLNÁR, P. et al. Biological Activity of Carotenoids in Red Paprika, *Valencia Orange* and *Golden Delicious Apple*. **Phytotherapy Research**, London, v.19, p.700–707, 2005.

MONTENEGRO. Secretaria Municipal de Agricultura e Meio Ambiente. **Dados Citricultura**. Montenegro, RS: SMMA, 2013. Disponível em: <https://www.montenegro.rs.gov.br/home/show_page.asp?titulo=dados_citricultura&categoria=municipio&id_conteudo=2098&codid_cat=503&inc=includes/how_texto.asp&imgcat=&id_link_pai=2502>. Acesso em: 19 fev. 2013.

MOORE, S.L.; PAYNE, D.N. Types of antimicrobial agents. In: RUSSEL, A.D.; HUGO, W.B.; AYLIFFE, G.A.J. (Ed.). **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. Cap.2, p.8–97.

NAIDU, A.S. (Ed.). **Natural food antimicrobial systems**. Boca Raton: CRC Press, 2000. 818 p.

NANGIA-MAKKER, P. et al. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified *Citrus* pectin. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v.94, n.24, p.1854–1862, 2002.

NAZER, A.I. et al. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**, London, v.22, p.391–398, 2005.

NEVES, M. F. **O retrato da citricultura brasileira**. Elaboração: Markestrat – Centro de Projetos e Pesquisa em Marketing e Estratégia. Disponível em: <http://www.citrusbr.com.br/exportadores-citricos/biblioteca/artigo193605-1.asp>. Acesso em: 15 jul. 2011.

OLIVEIRA, R. P.; EPIFÂNIO, N. B.; SCIVITTARO, W. B. A nova citricultura na **fronteira oeste do Rio Grande do Sul**. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CITRICULTURA DO RS, 25-26 jun. 2008, Alpestre. Anais... Alpestre: EMATER-RS, 2008. p. 60-66. Disponível em: < <http://www.cesnors.ufsm.br/professores/zecca/fruticultura-agronomia/A%20NOVA%20CITRICULTURA%20NA%20FRONTEIRA%20OESTE.pdf> >. Acesso em: 16 jul. 2011.

OLIVEIRA, R. P. et al. **Sistemas de Produção (20)**: Produção orgânica de Citros no Rio Grande do Sul. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011. 295p.

ÖLMEZ, H.; KRETZSCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **LWT - Food Science and Technology**, London, v.42, p. 686–693, 2009.

ORTIZ, J. M. Botany: taxonomy, morphology and physiology of fruits, leaves and flowers. In: DUGO, G.; DI GIACOMO, A (ed.). **Citrus: the Genus Citrus**. Boca Raton: CRC Press, 2002. 642 p. Cap. 2, p. 16-35.

OUATTARA, B.; MAFU, A.A. Natural antimicrobials in combination with gamma Irradiation. In: ROLLER, S. (Ed.). **Natural antimicrobials for the minimal processing of foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. Cap. 13, p.263–271.

OUGHTON, E.; RITSON, C. Food consumers and organic agriculture. In: COOPER, J.; NIGGLI, U.; LEIFERT, C. (Ed.). **Handbook of organic food safety and quality**. Boca Raton: Woodhead Publishing, CRC Press, 2007. Cap. 6. 74–96.

PANZENHAGEN, N. et al. Aspectos técnico-ambientais da produção orgânica na região citrícola do Vale do Caí. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.90–95, 2008.

PRICE, P.B. Re-evaluation of ethyl alcohol as a germicide. **Archives of Surgery**, Chicago, v.60, p.492–502, 1950.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Desenvolvimento Rural, Pesca e Cooperativismo. **Programa Agricultura de Base Ecológica**. Publicado em 12 jun. 2012. Disponível em: <http://www.sdr.rs.gov.br/upload/20120612150755programa_agricultura_de_base_ecologica.pdf>. Acesso em 15 fev. 2013.

ROLLER, S. Introduction. In: ROLLER, S. (Ed.). **Natural antimicrobials for the minimal processing of foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. Cap. 1, p.1–10.

SALAS, M.P. et al. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, Barking, v.124, p.1411–1415, 2011.

SAMELIS, J.; SOFOS, J.N. Organic acids. In: ROLLER, S. (Ed.), **Natural antimicrobials for the minimal processing of foods**. Boca Raton: Woodhead Publishers, CRC Press, 2003. Cap.6, p.98–132.

SANTOS, A. A. M.; et al. Importância do álcool no controle de infecções em serviços de saúde. **Revista de Administração em Saúde**, São Paulo, v. 4, n. 16, p. 7–14, 2002.

SCHMIDT, E. Production of Essential Oils. In: BASER, K. H. N.; BUCHBAUER, G (Ed.). **Essential Oils: Science, Technology and Applications**. London: CRC Press, 2010. 975 p.

SCIALABBA, N. E.-H. Global trends in organic agriculture markets and countries' demand for FAO assistance. International Farming Systems Association. Roundtable: Organic Agriculture. Rome, 1 nov. 2005. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/paia/organicag/2005_12_doc04.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2013.

SENGUN; I.Y.; KARAPINAR, M. Effectiveness of household natural sanitizers in the elimination of *Salmonella typhimurium* on rocket (*Eruca sativa* Miller) and spring onion (*Allium cepa* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.98, p.319–323, 2005.

SETTANI, L.; PALAZZOLO, E.; GUARRASI, V. Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. **Food Control**, Guildford, v.26, p.326–330, 2012.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. Salmonella Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira da Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 85–100, 2002.

STANLEY, W. L.; JURD, L. Citrus coumarins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.19, n.6, p.1106–1110, 1971.

SWERDLOW, D.L. et al. Waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.117, n.10, 1992.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Riverside: University of California Press, 1967. Cap.1, p.190–430.

TAO, N. et al. Carotenoids from the peel of Shatian Pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its antimicrobial activity. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Faisalabad, v.7, n.1, p.110–115, 2010.

UCHA, D. Apoio e incentivo às agroindústrias familiares na Campanha. **Jornal do Comércio**. Porto Alegre, n. 63, ago. 2011. Seção Painel Econômico. Disponível em: <<http://jcrs.uol.com.br/site/noticia.php?codn=70776>> Acesso em: 17 fev. 2013.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Foreign Agricultural Services. **Citrus**: world markets and trade. Washington, DC: USDA, 2013. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>. Acesso em: 16 fev. 2013.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná- Brasil, no período de 1978 A 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.6, 2006.

VIKRAM, A. et al. Grapefruit bioactive limonoids modulate *E. coli* O157:H7 TTSS and biofilm. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 140, 109–116, 2010.

WIEST, J.M. et al. Inibição e inativação *in vitro* de *Salmonella* spp. com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 119–127, 2009a.

WIEST, J.M. et al. Inibição e inativação de *Escherichia coli* por extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, p. 1–7, 2009b.

_____. Atividade anti-estafilocócica em extratos de plantas com indicativo medicinal ou condimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 11, p. 209–215, 2009c.

WILLER, H.; KILCHER, L. (Ed.). **The world of organic agriculture**: statistics and emerging trends 2009. Bonn: IFOAM, 2009. 299 p.

_____. **The world of organic agriculture**: statistics and emerging trends 2011. Bonn: IFOAM, 2011. 286p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health topics**: Salmonella. Disponível em: <http://www.who.int/topics/salmonella/en/>. Acesso em: 15 jul. 2011.

XU, G. et al. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. **Food Chemistry**, London, v.106, p.545–551, 2008.

APÊNDICE A

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM, % v/v) e Concentração Bactericida Mínima (CBM, % v/v) de extratos etanólicos brutos ressuspensos de cascas maduras e frutos verdes inteiros de tangerina ‘Montenegrina’, tangerina ‘Ponkan’, limão ‘Cravo’ e laranja ‘Valência’ frente a *E. coli*.

Extrato	CIM ^a	CBM ^a	V _{extrato} ^b
TMM	15%	20%	85
TMM	15%	20%	89
TMM	20%	25%	78
TMV	10%	15%	100
TMV	10%	15%	96
TMV	5%	15%	89
TPM	15%	25%	90
TPM	15%	25%	99
TPM	20%	30%	72
TPV	20%	25%	66
TPV	10%	20%	86
TPV	10%	15%	96
LCM	15%	25%	96
LCM	15%	25%	90
LCM	15%	25%	62
LCVC	20%	35%	72
LCVC	15%	25%	84
LCVC	25%	30%	84
LCVI	10%	15%	90
LCVI	5%	10%	68
LCVI	10%	15%	80
LCVP	10%	15%	92
LCVP	10%	10%	104
LCVP	10%	10%	102
LVM	30%	35%	79
LVM	15%	25%	94
LVM	20%	30%	86
LVV	15%	25%	76
LVV	15%	25%	78
LVV	15%	20%	88

^a % v/v de extrato alcoólico diluído

^b obtido na evaporação e posteriormente reidratado até atingir 100 ml

Nota: 1) TMM - tangerina 'Montenegrina' madura; TMV – tangerina 'Montenegrina' verde; TPM – tangerina 'Ponkan' madura; TPV – tangerina 'Ponkan' verde; LCM – limão 'Cravo' maduro; LCVI – limão 'Cravo' verde inteiro; LCVP – limão 'Cravo' verde polpa; LCVC – limão 'Cravo' verde casca; LVM - laranja 'Valência' madura; LVV - laranja 'Valência' verde; 2) “E” significa erro de análise.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM, % v/v) e Concentração Bactericida Mínima (CBM, % v/v) de extratos etanólicos brutos ressuspendidos de cascas maduras e frutos verdes inteiros de tangerina 'Montenegrina', tangerina 'Ponkan', limão 'Cravo' e laranja 'Valência' frente a *P. aeruginosa*.

Extrato	CIM ^a	CBM ^a	V _{extrato} ^b
TMM	10%	15%	84,5
TMM	10%	15%	89
TMM	15%	20%	78
TMV	10%	10%	100
TMV	5%	10%	96
TMV	5%	5%	89
TPM	15%	20%	90
TPM	10%	15%	107
TPM	10%	15%	99
TPM	15%	20%	72
TPV	10%	15%	66
TPV	10%	10%	86
TPV	10%	10%	96
LCM	10%	20%	96
LCM	10%	15%	90
LCM	10%	15%	62
LCVI	≤5%	10%	90
LCVI	5%	10%	68
LCVI	5%	10%	80
LCVP	≤5%	10%	92
LCVP	≤5%	10%	104
LCVP	≤5%	10%	102
LCVC	15%	25%	72
LCVC	10%	20%	84
LCVC	15%	25%	84
LVM	15%	25%	79
LVM	10%	15%	94
LVM	10%	20%	86
LVV	10%	20%	76,2
LVV	10%	20%	83
LVV	10%	15%	78
LVV	10%	15%	88

^a % v/v de extrato alcoólico diluído

^b obtido na evaporação e posteriormente reidratado até atingir 100 ml

Nota: 1) TMM - tangerina 'Montenegrina' madura; TMV - tangerina 'Montenegrina' verde; TPM - tangerina 'Ponkan' madura; TPV - tangerina 'Ponkan' verde; LCM - limão 'Cravo' maduro; LCVI - limão 'Cravo' verde inteiro; LCVP - limão 'Cravo' verde polpa; LCVC - limão 'Cravo' verde casca; LVM - laranja 'Valência' madura; LVV - laranja 'Valência' verde; 2) "E" significa erro de análise; 3) Para fins estatísticos, valores de CIM e CBM ≤ 5% foram considerados como 3%.

Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima (CIM, % v/v) e Concentração Bactericida Mínima (CBM, % v/v) de extratos etanólicos brutos ressuspensos de cascas maduras e frutos verdes inteiros de tangerina 'Montenegrina', tangerina 'Ponkan', limão 'Cravo' e laranja 'Valência' frente a *S. Enteritidis*.

Extrato	CIM ^a	CBM ^a	V _{extrato} ^b
TMM	15%	25%	84,5
TMM	15%	20%	89
TMM	20%	25%	78
TMV	10%	15%	100
TMV	10%	15%	96
TMV	10%	15%	89
TPM	15%	25%	90
TPM	15%	E	107
TPM	15%	20%	99
TPM	20%	25%	72
TPV	20%	30%	66
TPV	10%	20%	86
TPV	10%	20%	96
LCM	15%	25%	96
LCM	15%	20%	90
LCM	15%	20%	62
LCVC	20%	25%	72
LCVC	15%	20%	84
LCVC	20%	25%	84
LCVI	5%	15%	90
LCVI	10%	15%	68
LCVI	10%	20%	80
LCVP	10%	15%	92
LCVP	10%	15%	104
LCVP	10%	15%	102
LVM	20%	35%	79
LVM	15%	20%	94
LVM	15%	25%	86
LVV	15%	25%	76,2
LVV	15%	25%	83
LVV	15%	25%	78
LVV	15%	20%	88

^a % v/v de extrato alcoólico diluído

^b obtido na evaporação e posteriormente reidratado até atingir 100 ml

Notas: 1) TMM - tangerina 'Montenegrina' madura; TMV – tangerina 'Montenegrina' verde; TPM – tangerina 'Ponkan' madura; TPV – tangerina 'Ponkan' verde; LCM – limão 'Cravo' maduro; LCVI – limão 'Cravo' verde inteiro; LCVP – limão 'Cravo' verde polpa; LCVC – limão 'Cravo' verde casca; LVM - laranja 'Valência' madura; LVV - laranja 'Valência' verde; 2) "E" significa erro de análise; 3) Para fins estatísticos, valores de CIM e CBM ≤ 5% foram considerados como 3%;

Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM, % v/v) e Concentração Bactericida Mínima (CBM, % v/v) de extratos etanólicos brutos ressuspendidos de cascas maduras e frutos verdes inteiros de tangerina 'Montenegrina', tangerina 'Ponkan', limão 'Cravo' e laranja 'Valência' frente a *E. faecalis*.

Extrato	CIM ^a	CBM ^a	V _{extrato} ^b
TMM	35%	45%	66
TMM	15%	35%	85
TMM	15%	35%	89
TMM	20%	40%	78
TMV	10%	15%	100
TMV	10%	15%	96
TMV	5%	10%	89
TPM	15%	30%	90
TPM	15%	30%	107
TPM	15%	E	99
TPM	20%	40%	72
TPV	15%	25%	66
TPV	10%	10%	86
TPV	10%	10%	96
LCM	15%	30%	96
LCM	15%	25%	90
LCM	15%	25%	62
LCVC	20%	35%	72
LCVC	15%	E	84
LCVC	20%	35%	84
LCVC	E	20%	100
LCVI	≤5%	10%	90
LCVI	5%	5%	68
LCVI	≤5%	10%	87
LCVP	≤5%	10%	92
LCVP	≤5%	10%	104
LCVP	≤5%	10%	102
LVM	E	50%	79
LVM	15%	35%	94
LVM	20%	35%	86
LVV	20%	25%	76
LVV	15%	20%	88

^a % v/v de extrato alcoólico diluído

^b obtido na evaporação e posteriormente reidratado até atingir 100 ml.

Notas: 1) TMM - tangerina 'Montenegrina' madura; TMV – tangerina 'Montenegrina' verde; TPM – tangerina 'Ponkan' madura; TPV – tangerina 'Ponkan' verde; LCM – limão 'Cravo' maduro; LCVI – limão 'Cravo' verde inteiro; LCVP – limão 'Cravo' verde polpa; LCVC – limão 'Cravo' verde casca; LVM - laranja 'Valência' madura; LVV - laranja 'Valência' verde; 2) "E" significa erro de análise; 3) Para fins estatísticos valores de CIM e CBM ≤ 5% foram considerados como 3%.

Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM, % v/v) e Concentração Bactericida Mínima (CBM, % v/v) de extratos etanólicos brutos ressuspensos de cascas maduras e frutos verdes inteiros de tangerina 'Montenegrina', tangerina 'Ponkan', limão 'Cravo' e laranja 'Valência' frente a *S. aureus*.

Extrato	CIM ^a	CBM ^a	V _{extrato} ^b
TMM	25%	35%	66
TMM	10%	15%	84,5
TMM	15%	20%	89
TMM	20%	25%	78
TMV	≤5%	≤5%	100
TMV	≤5%	≤5%	96
TMV	≤5%	≤5%	89
TPM	15%	20%	90
TPM	15%	20%	107
TPM	15%	20%	99
TPM	15%	20%	72
TPV	20%	20%	66
TPV	10%	10%	86
TPV	10%	10%	96
LCM	20%	25%	96
LCM	15%	20%	90
LCM	10%	15%	62
LCVC	15%	25%	72
LCVC	15%	20%	84
LCVC	20%	25%	84
LCVI	≤5%	10%	90
LCVI	5%	5%	68
LCVI	5%	10%	80
LCVP	≤5%	10%	92
LCVP	≤5%	≤5%	104
LCVP	≤5%	10%	102
LVM	15%	20%	94
LVM	15%	25%	86
LVM	15%	20%	72
LVV	20%	25%	76,2
LVV	20%	20%	83
LVV	15%	20%	78
LVV	15%	15%	88

^a % v/v de extrato alcoólico diluído

^b obtido na evaporação e posteriormente reidratado até atingir 100 ml

Notas: 1) TMM - tangerina 'Montenegrina' madura; TMV - tangerina 'Montenegrina' verde; TPM - tangerina 'Ponkan' madura; TPV - tangerina 'Ponkan' verde; LCM - limão 'Cravo' maduro; LCVI - limão 'Cravo' verde inteiro; LCVP - limão 'Cravo' verde polpa; LCVC - limão 'Cravo' verde casca; LVM - laranja 'Valência' madura; LVV - laranja 'Valência' verde; 2) Para fins estatísticos, valores de CIM e CBM ≤ 5% foram considerados como 3%.