

**INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA**
CEARÁ
Campus Limoeiro do Norte

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
CAMPUS LIMOEIRO DO NORTE
MESTRADO ACADÊMICO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

MONIQUE ELLEN TORRES DA SILVA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO EFEITO
ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO POTENCIAL
CONSERVANTE EM PRODUTO CÁRNEO**

LIMOEIRO DO NORTE – CE

2015

MONIQUE ELLEN TORRES DA SILVA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO EFEITO
ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO POTENCIAL
CONSERVANTE EM PRODUTO CÁRNEO**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), *Campus* Limoeiro do Norte, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Sc. Antônio Lucivânia de Sousa Monte

Coorientadora: Profa. Dra. Sc. Marlene Nunes Damaceno

LIMOEIRO DO NORTE - CE

2015

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA IFCE
CAMPUS LIMOEIRO DO NORTE**

DIS
S586e

Silva, Monique Ellen Torres da.

Extração, caracterização e avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais como potencial conservante em produto cárneo / Monique Ellen Torres da Silva. – Limoeiro do Norte, 2015.

123 fls.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus* Limoeiro do Norte, 2015.

"Orientação: Prof.^a D. Sc. Antônia Lucivânia de Sousa Monte".

"Coorientação: Prof.^a D. Sc. Marlene Nunes Damaceno".

Referências.

1. Óleos Essenciais – Ação Bactericida e Antimicrobiana. 2. Orégano - *Origanumvulgare*. 3. Capim Limão - *Cymbopogoncitratus*. 4. Alecrim Pimenta - *Lippiasidoides*. 5. Hambúrguer Bovino. I. Monte, Antônia Lucivânia de Sousa. II. Damaceno, Marlene Nunes. III. Título.

CDD 665.3

MONIQUE ELLEN TORRES DA SILVA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO EFEITO
ANTIMICROBRIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO POTENCIAL
CONSERVANTE EM PRODUTO CÁRNEO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Tecnologia de Alimentos do
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Ceará - *Campus* Limoeiro
do Norte, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em
Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: 21 de 07 de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Antônia Lucivânia de Sousa Monte
Prof. D. Sc. Antônia Lucivânia de Sousa Monte (Orientadora)
Instituto Federal do Ceará – *Campus* Limoeiro do Norte

Marlene Nunes Damaceno
Prof. D. Sc. Marlene Nunes Damaceno (Coorientadora)
Instituto Federal do Ceará – *Campus* Limoeiro do Norte

Renata Chastinet Braga
Prof. D. Sc. Renata Chastinet Braga
Instituto Federal do Ceará – *Campus* Limoeiro do Norte

Denise Josino Soares
Prof. D. Sc. Denise Josino Soares
Instituto Federal do Pernambuco – *Campus* Afogados da Ingazeira

Rondinelli Ribeiro Castro
Prof. D. Sc. Rondinelle Ribeiro Castro
Universidade Estadual do Ceará

À minha mãe, irmãos e irmãs, sobrinhas e tia Ju.

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus por me guiar durante toda a trajetória da minha vida, conduzindo-me ao caminho certo.

À minha mãe Maria Torres e minha irmã Denise Ellen, pelo grande incentivo e apoio em todas as etapas de minha vida, dando as instruções de cidadania, educação e afeto, encorajando-me a buscar melhorias e a superar desafios que possibilitaram o meu crescimento.

Às minhas tias Justina e Elcicleide, por terem me acolhido, pelo encorajamento nos momentos difíceis e por sempre acreditarem em mim. Pela educação por elas prestada, princípios e valores transmitidos e por terem feito de mim o que sou hoje, serei eternamente grata.

A todos os meus professores do curso, orientadora, coorientadora, pelo apoio, incentivo, pelas sugestões, correções, esclarecimentos e por todo conhecimento transmitido.

Aos bolsistas de iniciação científica, Josikelvia Almeida, Josilene Almeida, Candido Pereira e Bruno Felipe, por toda a colaboração, apoio e torcida. Por estarem sempre presentes nos laboratórios com total presteza, foram de imensa ajuda. Ao Gilson Malagueta e Ariadne Coelho, por toda ajuda no laboratório e nas fichas das análises sensoriais.

Ao Daniel Campelo, por sua ajuda nos gráficos, figuras, colaboração, apoio e paciência durante essa trajetória longa e difícil.

A professora Benigna Lessa por toda sua gentileza e revisão de português da dissertação. Ao Vinícius de Oliveira pelo apoio e ajuda nas correções da dissertação.

A todos os meus amigos e amigas, colegas da faculdade e colaboradores dos laboratórios por toda ajuda e companheirismo, e por todos aqueles que estiveram ao meu lado em toda essa jornada.

À CAPES e à FUNCAP pelo apoio financeiro e ao IFCE pelo espaço concedido.

Enfim, a todos que, de alguma forma, participaram, torceram, acreditaram e me incentivaram a lutar por meus objetivos.

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original”

(Albert Einstein)

RESUMO

Estudos com óleos essenciais têm atraído a atenção de vários pesquisadores, devido a um crescente interesse dos consumidores na redução mundial da composição de sal em alimentos, e a necessidade de técnicas alternativas para garantir a qualidade e segurança dos alimentos perecíveis. Mediante o exposto, objetivou-se com este trabalho caracterizar e avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* e atividade bactericida de óleos essenciais de alecrim pimenta, capim-limão e orégano, ação bactericida dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e a mistura destes em hambúrguer bovino armazenado sob refrigeração. Foram realizados testes *in vitro*, o teste de difusão em disco baseado na determinação do halo formado e atividade bactericida no tempo de 24 horas. Para composição dos óleos essenciais foram determinados os espectros de massas dos óleos essenciais obtidos em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa. Para avaliação do efeito do orégano no revestimento do hambúrguer bovino, foram elaborados revestimentos com concentrações de óleo essencial de orégano de 0; 0,15, 0,31 e 0,62% de óleo essencial de orégano e aplicados ao hambúrguer bovino, além disso, foi elaborado um controle sem revestimento (C). Foram realizadas análises microbiológicas nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 dias de armazenamento sob refrigeração e determinada a composição centesimal. Para verificar a ação dos óleos essenciais de orégano, capim-limão e a mistura dos dois (mix) frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, a bactéria foi inoculada em hambúrguer bovino e os óleos essenciais de orégano e capim-limão foram adicionados na concentração de 0,312, 0,625, 1,25 e 2,5% e o mix nas concentrações de 0,312 e 0,625%. Os hambúrgueres foram armazenados em temperatura de refrigeração e avaliados nos tempos 0, 1, 2, 4 e 6 dias. Foi realizada também análise sensorial de hambúrguer bovino com concentrações de 0,312% dos óleos essenciais. O óleo essencial de alecrim pimenta apresentou como constituinte majoritário o timol (83,53%), o de capim-limão apresentou os constituintes α -Cital (56,17%) e β -Cital (35,77%) e o óleo essencial de orégano apresentou o Terpinen-4-ol (25,62%), γ -Terpineno (16,18%) e Carvacrol (12,84%). Os resultados apontam atividade antimicrobiana dos óleos essenciais demonstrando sensibilidade das bactérias aos óleos em várias concentrações e atividade bactericida desde o tempo de três horas de contato. O óleo essencial de orégano em revestimento comestível de hambúrguer bovino apresentou bom desempenho como antimicrobiano, mesmo na menor concentração utilizada (0,15%), para algumas bactérias de interesse na área de alimentos, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sem alterar a composição centesimal do alimento.

Os óleos essenciais apresentaram ação antimicrobiana contra a bactéria durante o armazenamento mesmo na menor concentração utilizada e apresentaram aceitação sensorial para todos os atributos avaliados. Conclui-se que os óleos essenciais apresentaram atividade bactericida *in vitro* frente a várias cepas bacterianas de interesse em alimentos, mesmo em baixas concentrações, demonstrando um grande potencial para utilização em indústrias alimentícias, farmacêuticas, dentre outros. Os resultados demonstram uma possibilidade da utilização do óleo essencial de orégano em revestimento de alimentos como antimicrobiano alternativo e também da utilização dos óleos essenciais de orégano e capim-limão e uma mistura dos dois (mix) como conservantes naturais de produto cárneo, com aceitação sensorial.

Palavras-chave: Conservante natural, *Cymbopogon citratus*; *Lippia sidoides*; *Origanum vulgare*; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Studies with essential oils (volatile oils) have attracted the attention of several researchers, due to a growing interest of consumers in the global reduction in food salt composition (health reasons), and the need for alternative techniques to ensure the quality and safety of perishable food. Through the above objective of this study was to characterize and evaluate the antimicrobial effect of essential oils in vitro against five bacterial strains and bactericidal action of the essential oils from oregano (*Origanum vulgare*), lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and the mixture of the two in hamburger beef stored under refrigeration. Tests were carried out in vitro with the essential oils of rosemary pepper (*Lippia sidoides*), oregano (*Origanum vulgare*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and used disk diffusion test based on determining the formed halo and bactericidal activity in time 24 hours. To establish the essential oils were determined mass spectra of essential oils obtained by gas chromatography coupled to mass spectrometer. To evaluate the effect of oregano in the lining of beef burger, coatings were developed with essential oil of oregano concentrations of 0; 0.15, 0.3 and 0.6% essential oil of oregano and applied to beef burger also was an elaborate uncoated control. The burgers were stored for 8 days and analyzed for microbiological at times 0, 2, 4, 6 and 8 days storage at $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, and accomplished the chemical composition. To check the action of essential oils of oregano, lemon grass and mixing the two (mix) against *Staphylococcus aureus*, the bacterium was inoculated into hamburger beef and essential oils of oregano and lemon grass were added at a concentration of 0.312, 0.625, 1.25 to 2.5% and mix at concentrations of 0.312 and 0.625%. The burgers were stored at refrigeration temperature and evaluated at times 0, 1, 2, 4 and 6 days. It was also conducted sensory analysis beef burger with 0.312% concentrations of essential oils. The essential oil of pepper rosemary presented as major constituent thymol (83.53%), the lemon grass presented the α -Citral constituents (56.17%) and β -Citral (35.77%) and essential oil oregano presented Terpinen-4-ol (25.62%), γ -terpinenO (16.18%) and Carvacrol (12.84%) as major compounds. The results show antimicrobial activity of essential oils showing susceptibility of bacteria to oils in various concentrations and bactericidal activity from the time of three hours of contact. The essential oil of oregano in edible coating beef burger performed well as antimicrobial, even in the lowest concentration used (0.15%), for some bacteria of interest in the food area, such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, without changing the composition Proximate food. Essential oils presented antimicrobial activity against bacteria during storage even in small concentration used and showed sensory acceptance for all parameters evaluated. It follows that the essential oils had bactericidal activity in vitro against

several bacterial strains of the interest in food, even at low concentrations, demonstrating a great potential for use in food, pharmaceutical, among others. The results demonstrate the possibility of using oregano essential oil coating of food as an alternative antimicrobial and also the use of essential oils of *Origanum vulgare* L., *Cymbopogon citratus* and a mixture of both (Mix) as a natural preservative composed of meat product, even when low concentrations associated with sensory acceptance.

Keywords: Natural Food Preservatives; *Cymbopogon citratus*; *Lippia sidoides*; *Origanum vulgare*; *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – Extração, Caracterização e Atividade *in vitro* de óleos essenciais frente a cinco linhagens bacterianas

Tabela 1 – Constituintes do óleo essencial das folhas secas de <i>Lippia sidoides</i>	47
Tabela 2 – Médias e desvio padrão do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> frente a cinco espécies de bactérias.....	49
Tabela 3 – Constituintes do óleo essencial das folhas secas de <i>Cymbopogon citratus</i>	52
Tabela 4 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> frente a cinco espécies de bactérias.....	54
Tabela 5 – Constituintes do óleo essencial das folhas secas de <i>Origanum vulgare</i>	57
Tabela 6 – Médias e desvio padrão de halos de inibição do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> frente a cinco espécies de bactérias.....	59

CAPÍTULO III – Avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) no revestimento de hambúrguer bovino

Tabela 1 - Formulação do hambúrguer bovino.....	71
Tabela 2 - Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas em hambúrguer bovino revestido com diferentes concentrações de óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L., durante 8 dias de armazenamento sob refrigeração.....	74
Tabela 3 - Contagem de Coliformes termotolerantes em hambúrguer bovino revestido com diferentes concentrações de óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L., durante 8 dias de armazenamento sob refrigeração.....	75
Tabela 4 – Incidência da <i>Escherichia coli</i> em hambúrguer bovino revestido com diferentes concentrações de óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L., durante 8 dias de armazenamento sob refrigeração.....	77
Tabela 5 - Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> em hambúrguer bovino revestido com diferentes concentrações de óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L., durante 8 dias de armazenamento sob refrigeração.....	78
Tabela 06 - Composição Centesimal de hambúrguer bovino revestido com diferentes concentrações de óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L.....	80

CAPÍTULO IV – Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais na formulação do hambúrguer bovina frente ao *Staphylococcus aureus* e avaliação sensorial

Tabela 01 – Efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e MIX (Mistura de orégano e capim-limão 1:1) em diferentes concentrações sobre *Staphylococcus aureus* em hambúrguer bovino durante armazenamento à temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 2$ por seis dias.....91

Tabela 02 - Índice de aceitabilidade do hambúrguer bovino com óleos essenciais, para cada atributo avaliado.....99

Tabela 03 – Médias dos atributos no teste de aceitação e intenção de compra para hambúrguer bovino com adição de óleo essencial.....99

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II – Extração, Caracterização e Atividade *in vitro* de óleos essenciais frente a cinco linhagens bacterianas

Figura 1 – Contagens de log UFC mL⁻¹ para cinco linhagens de bactérias na concentração de 1% (v/v) de óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) em função do tempo.....50

Figura 2 – Contagens de log de UFC mL⁻¹ para cinco linhagens de bactérias na concentração de 0,312% (v/v) de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) em função do tempo.....55

Figura 3 – Contagens de log de UFC mL⁻¹ obtidos para cinco linhagens de bactérias testadas na concentração de 0,312% (v/v) de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em função do tempo61

Figura 4 – Contagens de log de UFC mL⁻¹ obtidos para cinco linhagens de bactérias testadas na concentração de 0,156% (v/v) de óleo essencial de Orégano (*Origanum vulgare* L.) em função do tempo.....62

CAPÍTULO III – Avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) no revestimento de hambúrguer bovino

Figura 01 – Fluxograma do processamento do hambúrguer bovino.....72

CAPÍTULO IV – Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais na formulação do hambúrguer bovino frente ao *Staphylococcus aureus* e avaliação sensorial

Figura 1 – Esquema utilizado na execução do experimento para verificar a ação dos óleos essenciais frente ao *Staphylococcus aureus* em hambúrguer bovino.....88

Figura 02 – Ação do óleo essencial de capim-limão frente à bactéria *Staphylococcus aureus* no Tempo 0 do armazenamento de hambúrguer bovino.....92

Figura 03 – Ação do óleo essencial de orégano frente à bactéria *Staphylococcus aureus* no Tempo 0 do armazenamento de hambúrguer bovino.....93

Figura 04 – Ação da mistura dos óleos essenciais de capim-limão e orégano frente à bactéria *Staphylococcus aureus* no tempo 0 do armazenamento de hambúrguer bovino.....93

Figura 5 - Efeito dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e MIX (Mistura de orégano e Capim-limão 1:1) na concentração de 0,312%

frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> em hambúrguer bovino durante armazenamento por seis dias.....	94
Figura 6 - Efeito dos óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> (orégano), <i>Cymbopogon citratus</i> (capim-limão) e MIX (Mistura de orégano e Capim-limão 1:1) na concentração de 0,625% frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> em hambúrguer bovino durante armazenamento por seis dias.....	96
Figura 7 - Efeito dos óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> (orégano) e <i>Cymbopogon citratus</i> (capim-limão) na concentração de 1,25% frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> em hambúrguer bovino durante armazenamento por seis dias.	97
Figura 8 - Efeito dos óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> (orégano) e <i>Cymbopogon citratus</i> (capim-limão) na concentração de 2,5% frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> em hambúrguer bovino durante armazenamento por seis dias.....	98
Figura 09 –Valores médios atribuídos no teste sensorial para o atributo “aparência” do hambúrguer bovino com óleos essenciais.....	100
Figura 10 – Valores médios atribuídos no teste sensorial para o atributo “aroma” do hambúrguer bovino com óleos essenciais.....	101
Figura 11 – Valores médios atribuídos no teste sensorial para o atributo “textura” do hambúrguer bovino com óleos essenciais.....	102
Figura 12 – Valores médios atribuídos no teste sensorial para o atributo “sabor” do hambúrguer bovino com óleos essenciais.....	103
Figura 13 – Valores médios atribuídos no teste sensorial para o atributo “aceitação global” do hambúrguer bovino com óleos essenciais.....	104
Figura 14 – Valores médios atribuídos na intenção de compra do hambúrguer bovino com óleos essenciais.....	105

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 Carne bovina	23
3.2 Hambúrguer bovino	24
3.3 Óleos essenciais como agentes antimicrobianos	26
3.4 Ação antimicrobiana de óleos essenciais <i>in vitro</i> e em alimentos	28
3.5 <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano)	30
3.6 <i>Cymbopogon citratus</i> (capim-limão)	32
3.7 <i>Lippia sidoides</i> (alecrim pimenta)	34
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO II – Extração, Caracterização e Atividade <i>in vitro</i> de óleos essenciais frente a cinco linhagens bacterianas	44
1 INTRODUÇÃO	44
2 METODOLOGIA	45
2.1 Plantas e obtenção dos respectivos óleos	45
2.2 Caracterização dos óleos essenciais (Espectrometria de massas - EM)	46
2.3 Linhagens bacterianas testadas	46
2.4 Testes de sensibilidade	47
2.4.1 Teste de difusão em disco	47
2.4.2 Efeito bactericida	47
2.5 Delineamento experimental e análise estatística	48
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1 Alecrim pimenta (<i>Lippia sidoides</i>)	48
3.1.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial das folhas secas de <i>Lippia sidoides</i>	48
3.1.2 Teste de difusão e atividade bactericida <i>in vitro</i> da <i>Lippia sidoides</i> frente a bactérias	50
3.2 Capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)	53

3.2.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial das folhas secas de <i>Cymbopogon citratus</i>	53
3.2.2 Teste de difusão e atividade bactericida <i>in vitro</i> do <i>Cymbopogon citratus</i> frente a bactérias	55
3.3 Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	57
3.3.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial das folhas secas de <i>Origanum vulgare</i>	57
3.3.2 Teste de difusão e atividade bactericida <i>in vitro</i> da <i>Origanum vulgare</i> frente a bactérias	59
4 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
CAPÍTULO III – Avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.) no revestimento de hambúrguer bovino	70
1 INTRODUÇÃO	70
2 METODOLOGIA	71
2.1 Extração do óleo essencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	71
2.2 Ação antimicrobiana de óleo essencial de orégano em revestimento comestível de hambúrguer bovino frente à microbiota normal	72
2.2.1 Elaboração do revestimento comestível	72
2.2.2 Elaboração do hambúrguer bovino	72
2.2.3 Avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial frente à microbiota normal do hambúrguer bovino revestido armazenado sob refrigeração	73
2.3 Composição centesimal	73
2.4 Delineamento experimental e análise estatística	74
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
3.1 Ação antimicrobiana de óleo essencial de orégano em revestimento comestível de hambúrguer bovino frente à microbiota normal	74
3.1.1 Bactérias Aeróbias Mesófilas	74
3.1.2 Coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i>	76
3.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	79
3.1.4 <i>Salmonella</i>	80
3.2 Composição centesimal do hambúrguer revestido	81
4 CONCLUSÃO	83
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

CAPÍTULO IV – Análise sensorial de hambúrguer bovino e avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais frente à <i>Staphylococcus aureus</i>	87
1 INTRODUÇÃO	87
2 METODOLOGIA	88
2.1 Plantas e obtenção dos respectivos óleos	88
2.2 Avaliação do efeito antimicrobiano dos óleos essenciais frente à <i>Staphylococcus aureus</i> em hambúrguer bovino	88
2.2.1 Modelo alimentar e preparo das amostras	88
2.2.2 Contagem da <i>Staphylococcus aureus</i>	90
2.3 Análise Sensorial	90
2.4 Delineamento experimental e análise estatística	91
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
3.1 Hambúrguer com óleo essencial frente à <i>Staphylococcus aureus</i>	91
4 CONCLUSÃO	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
CAPÍTULO V - CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	109
ANEXOS	110
ANEXO I	111
ANEXO II	114
ANEXO III	117
ANEXO IV – TESTE DE ACEITAÇÃO	1243

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A partir do desenvolvimento dos produtos industrializados e modernos, os consumidores, necessitando de praticidade, passaram a utilizar cada vez mais alimentos processados e os produtos cárneos passaram a fazer parte do hábito alimentar, visto que possuem facilidade na sua obtenção e preparo e se apresentam como produtos de baixo custo.

Os especialistas da área de alimentos estão cada vez mais preocupados com o controle higiênico-sanitário na produção de alimentos, principalmente em decorrência das exigências dos consumidores que a cada ano é crescente. Mediante a fácil contaminação dos alimentos, se faz necessária a aplicação de aditivos para auxiliar na conservação dos produtos elaborados, com o propósito de inibir a ação dos microrganismos. Nos produtos cárneos, os conservantes utilizados são os sais de cura como nitratos e nitrito de sódio e potássio. Segundo Martins e Mídio (2000), a dieta alimentar rica em nitrato pode estar associada com o câncer de estômago.

Estudos com óleos essenciais (óleos voláteis) têm atraído a atenção de ambos os círculos acadêmico e industrial, devido a um crescente interesse dos consumidores na redução mundial da composição de sal em alimentos (razões de saúde), e a necessidade de técnicas alternativas para garantir a qualidade e segurança dos alimentos perecíveis (BURT, 2004). Utilizados comumente na indústria de alimentos como flavorizantes, os óleos essenciais também possuem propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas (BURT, 2004) e, portanto, podem ser usados em alimentos como agente natural para estender a vida de prateleira de alimentos (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Em geral, os óleos essenciais e suas atividades biológicas são bem documentadas, principalmente no que diz respeito às atividades microbiológicas. Diversos estudos têm sido realizados e relatados, avaliando suas atividades frente a diversos tipos de microrganismos, principalmente deterioradores de alimentos, patógenos e fitopatógenos, revelando o potencial de determinados óleos essenciais no controle de tais microrganismos (BAKKALI; AVERBECK; IDAOMAR, 2008).

Os microrganismos estão ficando cada vez mais resistentes e a perspectiva para o uso de drogas antimicrobianas no futuro é ainda indecisa. Portanto, pesquisas devem ser realizadas para reduzir esse problema, como, por exemplo, desenvolver pesquisas para a melhor compreensão do mecanismo genético de resistência, e continuar estudos para desenvolver novas drogas, sintéticas ou naturais (PRASHAR et al., 2003).

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode se comportar de modo diferente entre as bactérias Gram positivas e Gram negativas, sendo explicada por alguns autores, pela diferença na parede celular, em que as bactérias Gram negativas possuem uma camada de lipopolissacarídeo e ausência nas Gram positivas, o que permite ou não a entrada de substâncias na bactéria. Além disso, alguns óleos essenciais podem conter substâncias que penetram mais facilmente por essa camada lipídica, ocorrendo a sensibilidade ou não dessas bactérias a essas substâncias (BERTINI et al., 2005). Mediante isto, foram escolhidas quatro bactérias Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*) e uma bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) para estudo da ação antimicrobiana dos óleos essenciais.

Klebsiella pneumoniae foi incluída na identificação de perigos categoria "B" pela FAO e pela OMS sobre os microrganismos, na fórmula infantil em pó, que são considerados um problema de saúde pública emergente (FAO-OMS, 2014). Em comparação com outras Enterobacteriaceae na categoria "B", de *K. pneumoniae* foi o agente mais importante devido à sua morbidade e mortalidade grave (VERNET et al., 1995). A maior parte das infecções provocadas por *Klebsiella* são devido ao consumo de alimentos contaminados, tais como peixes, água, carnes e hortaliças (MENDES et al., 2007, HARYANI et al., 2007, KANKI et al., 2002 e PODSCHUN et al., 2001). Cerca de 22 cepas de *Klebsiella pneumoniae* foram isoladas de carne de frango e 25 foram isoladas de hortaliças minimamente processadas, possuindo as de carne maior resistência a antimicrobianos do que as isoladas de vegetais, sendo 100% dessas cepas resistentes a ampicilina (MENDES et al., 2007).

Em temperaturas acima de 5 °C, enterobactérias geralmente predominam sobre as *Pseudomonas* spp. e são responsáveis pela deterioração. *Enterobacter* e *Klebsiella* estão entre os principais gêneros da família Enterobacteriaceae apontados como deteriorantes de carne e produtos cárneos (BRENNER, 1992). A presença de enterobactérias é frequentemente usada como indicador para possível contaminação fecal decorrente de inadequado processamento ou contaminação pós-processamento (TORNADIJO et al., 2001). Felipe (2008) isolou 23 cepas da *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella* spp. em carne bovina embaladas a vácuo e mantidas sob refrigeração que apresentavam deterioração. Souza (2007) isolou 19 cepas de *Enterobacter aerogenes* de 80 amostras analisadas de carnes de frango resfriadas em que apresentaram uma alta percentagem de resistência aos antimicrobianos, sendo a ampicilina o que a *E. aerogenes* apresentou a maior resistência (89,4%) seguida da Doxiciclina (52,6%). Junqueira et al. (2008) obteve 20% de frequência de isolamento da cepa de *Enterobacter aerogenes* em saladas.

Souza et al. (2006) classifica em *Staphylococcus aureus* como clássico patógeno Gram-positivo, *Salmonella* spp. como clássico patógeno Gram-negativo. As *Pseudomonas* são importantes em alimentos devido a sua intensa atividade metabólica, sendo capazes de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos (FRANCO; LANDGRAF, 2006), caracterizando-se por alterar muitos alimentos ricos em proteínas. *P. aeruginosa* é o organismo patogênico oportunista mais importante em humanos (MASSAGUER, 2006). Adicionalmente, não se deve esquecer a possibilidade de erro no manuseio e/ou manutenção dos produtos de origem animal nos estabelecimentos de comercialização, nos quais, muitas vezes, os critérios de boas práticas não são plenamente atendidos (MAIA et al., 2009). Alcantara, Gatto e Andreani (2012) isolaram *Pseudomonas aeruginosa* em 28 (70%) das amostras de salsicha comercializadas a granel e a determinação quantitativa variou de $> 3,3 \times 10^3$ a $3,2 \times 10^6$ UFC g⁻¹.

Pesquisas sobre o uso de produtos naturais em alimentos têm impulsionado estudos sobre esse tema. Mendonça (2004) ressalta o interesse atual e a tendência do mercado em utilizar produtos naturais, entre eles destacam-se os agentes antimicrobianos naturais, extraídos de plantas como óleos essenciais. Compostos naturais presentes nas plantas e condimentos têm apresentado ação antimicrobiana contra diversos microrganismos patogênicos. Além disso, as pesquisas com plantas despertam interesse por conta da grande diversidade molecular dos produtos naturais, que é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, e possível ação antimicrobiana (ANDRADE, 2010). Dessa forma, essas propriedades apresentam potencialidade para uso na indústria alimentícia, onde os riscos de contaminação são grandes, demonstrando uma maneira para o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de microrganismos causadores de grandes prejuízos às indústrias (PEREIRA et al., 2008).

O uso dos óleos essenciais no controle de bactérias patogênicas na indústria de alimentos requer, como etapa inicial, estudo da atividade antimicrobiana *in vitro*. Nesse contexto, alguns fatores devem ser considerados e avaliados conjuntamente, como rendimento de óleo essencial da espécie vegetal utilizada, importante do ponto de vista econômico; composição química do óleo essencial, que irá influenciar diretamente na atividade biológica; concentração do óleo essencial a ser utilizada; efeito bactericida e ou bacteriostático do óleo essencial, bem como o tempo necessário para que estes ocorram e possível ação sinérgica da combinação de óleos essenciais de espécies vegetais distintas (OLIVEIRA et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* e ação bactericida de óleos essenciais de alecrim pimenta, capim-limão e orégano, frente a cinco linhagens bacterianas, o efeito do óleo essencial de orégano em revestimento de hambúrguer e ação bactericida dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) frente à *Staphylococcus aureus* inoculada em hambúrguer bovino armazenado sob refrigeração.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição química dos óleos essenciais de alecrim pimenta, capim-limão e orégano;
- Avaliar o efeito antimicrobiano e bactericida *in vitro* dos óleos essenciais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e orégano (*Origanum vulgare*) frente a cinco linhagens bacterianas;
- Verificar a ação do óleo essencial de orégano, frente à microbiota normal, no revestimento de hambúrguer bovino durante o armazenamento por 08 dias sob refrigeração;
- Avaliar a composição centesimal do hambúrguer bovino revestido de óleo essencial de orégano;
- Verificar a ação antimicrobiana de óleo essencial de orégano, capim-limão e a mistura dos dois óleos, em diferentes concentrações, frente à *Staphylococcus aureus* em hambúrguer bovino sob refrigeração durante o armazenamento nos tempos 0, 1, 2, 4 e 6 dias;
- Verificar a aceitação sensorial do hambúrguer bovino com óleo essencial de orégano, capim-limão e a mistura destes em sua formulação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Carne bovina

A carne bovina é amplamente consumida e por isso é de extrema importância oferecer ao consumidor um produto com qualidade microbiológica adequada, já que este pode ser responsável por ocasionar doenças para a população que dela faz uso (MARCHI, 2006). A qualidade dessa carne vai depender da tecnologia empregada na produção dos animais, das condições higiênico-sanitárias do abate, processamento, armazenamento, distribuição, transporte e das condições de comercialização (JAY, 2005).

A contaminação microbiológica de alimentos tem sido motivo de estudos e constantes mudanças nos procedimentos de controle higiênico-sanitário nas indústrias. Há muitos anos os profissionais da área de alimentos têm se preocupado com o estudo das doenças de origem alimentar, principalmente com as ocorrências clínicas decorrentes da ingestão de alimentos contaminados com toxinas bacterianas (SILVA JÚNIOR, 2005).

A carne bovina em cortes e moída "in natura", quando manipulada incorretamente, tem sido relatada como fonte primária de infecção, ocasionando graves consequências à saúde dos seres humanos, tanto para os próprios manipuladores como para os consumidores. Vários pesquisadores relatam que obtiveram resultados preocupantes quanto ao nível de contaminação das carnes, dos utensílios, dos equipamentos, dos manipuladores, assim como pela adoção de práticas inadequadas de manipulação de alimentos (ALMEIDA et al., 2010).

Entre as diversas causas de contaminação, destacam-se: falta de controle higiênico-sanitário durante o abate animal, no transporte do produto, estocagem nos estabelecimentos de comercialização, controle do tempo e temperatura, higienização dos equipamentos e utensílios, falta de higiene dos manipuladores, além do excesso de manipulação (LUNDGREN et al., 2009).

Estudos desenvolvidos em várias cidades e regiões do país revelam os altos índices de contaminação microbiológica em cortes cárneos bovinos, com presença de vários microrganismos patogênicos (GELLI et al., 2005; OLIVIERA et al., 2003; SHIONARA et al., 2003; SIGARIN et al., 2003; COUTINHO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2002) e em carne bovina moída, em que a superfície de contato é ainda maior e por isso uma maior atenção devem ser dadas a estes (TANURE et al., 2006; FRITZEN et al., 2006; FERREIRA; SOBRINHO, 2003; PIGATTO; BARROS, 2003). Todos os autores relatam as precárias condições deste produto que está sendo ofertado ao consumidor. Além disso, condições precárias nos

equipamentos e utensílios de unidades que comercializam essas carnes também têm sido relatadas na literatura (GELLI et al., 2005).

A ocorrência de diferentes microrganismos encontrados na carne fresca é muito variada, principalmente porque o pré-abate, bem como as fontes de contaminação, incluindo facas, mesas de corte, couro e material fecal afetam profundamente a microbiota inicial da carne. Produtos à base de carne bovina sob condições higiênicas possuem uma microbiota predominantemente composta por bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Pseudomonas* e por Gram-positivas dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus*. As bactérias patogênicas ou potencialmente mais comuns nestes alimentos são *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e ocasionalmente, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*. Após a lavagem superficial, a superfície da carcaça bovina pode ter entre 10^2 e 10^4 UFC/cm² e, após a desossa, os cortes de carne para embalagem devem ter, provavelmente, um número de microrganismos contaminantes consideravelmente maior. Durante a estocagem aeróbia da carne, a limosidade pode tornar-se visível quando o número de bactérias atingir 10^8 UFC/cm², e odores estranhos podem ser sentidos quando o número atingir 10^9 UFC/cm² (SILVA; RAMALHO; FIGUEIREDO, 2004; JAY, 2005; PINTO NETO, 2005).

3.2 Hambúrguer bovino

O mercado de embutidos cárneos vem apresentando significativa expansão e alta competitividade, pois tais produtos fazem parte do hábito alimentar de uma grande parcela de consumidores brasileiros. Com a industrialização da carne, surgiram alternativas para o aproveitamento dos cortes menos nobres, aumentando assim o lucro dos abatedouros. A diversificação da oferta inclui um grande número de produtos como almôndegas, empanados, hambúrgues, linguças, mortadelas, salames, entre outros. Desde anos atrás, atenção tem sido dada a alimentos com curto tempo de preparo para o consumidor, de preço acessível, sabor agradável, de boa qualidade e segurança do alimento (COSTA, 2004; DIAS et al., 2006).

De acordo com Portaria CVS-6/99, de 10.03.1999, do Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, os produtos industrializados refrigerados devem conter em sua embalagem original informações sobre seus critérios de consumo, fornecidos pelo fabricante. As carnes bovina, suína, aves, dentre outras e seus produtos manipulados crus possuem uma vida de prateleira de até 72 horas, quando armazenados em temperatura de até 4°C (BRASIL, 1999).

Hambúrguer é definido como o produto cárneo industrializado, obtido de carne moída dos animais de açougue, podendo ser adicionado ou não de tecido adiposo e de outros ingredientes, moldado e submetido a processo tecnológico adequado. Tem como ingrediente obrigatório a carne e como ingredientes opcionais a gordura animal ou vegetal, sal, água, proteínas de origem animal e/ou vegetal, açúcares, leite em pó, maltodextrina, aditivos intencionais, condimentos, aromas e especiarias dentre outros. Trata-se de produto cru, cozido, semi-frito, frito, resfriado ou congelado de acordo com sua classificação (BRASIL, 2000).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Hambúrguer do Ministério da Agricultura e Abastecimento, os hambúrgueres devem atender aos seguintes requisitos físico-químicos: gordura (máxima) 23,0%; proteína (mínima) 15,0%; carboidratos totais 3,0%; teor de cálcio de 0,1% (máximo base seca) em produto cru e 0,45% em produto cozido. As características sensoriais são definidas de acordo com o processo de obtenção e a textura, cor, sabor e odor devem ser característico do alimento. Ademais, o hambúrguer pode ser adicionado de proteína de soja hidratada, 1% de sal, 0,2% de glutamato monossódico e especiarias. Porém, de acordo com os requisitos de composição do Ministério da Agricultura e Abastecimento, só é permitida a adição máxima de 4,0% de proteína não cárnica na forma agregada (BRASIL, 2000).

Segundo Hautrive et al. (2008) o hambúrguer se tornou popular pela sua praticidade, pois a sua elaboração é rápida e possui nutrientes que alimentam e saciam a fome rapidamente, o que combina com o estilo de vida de quem possui pouco tempo disponível, como moradores de centros urbanos. Devido a não ter outra proteção eficiente além do frio e por possuir também grande superfície exposta, esse produto está sujeito aos mesmos problemas de altos níveis de contaminação microbiana da carne moída (BARBOSA, 2010). Na comercialização, o produto será designado de hambúrguer (ou hambúrguer) seguido do nome da espécie do animal acrescido ou não de recheio, seguido das expressões que este se enquadrar. É considerado um produto reestruturado, pois a peça cárnea é parcialmente ou completamente cominuída em trituração grosseira, condimentados e novamente reconstituídos e moldados (BRASIL, 2000).

A temperatura logo após a moagem deve ser no máximo 7°C e em seguida devem ser submetidos imediatamente ao congelamento (-18°C). Na exposição à venda, os hambúrgueres devem ser mantidos congelados. No caso do consumo em curto prazo esse produto pode ser armazenado em refrigeração de 4°C por até 72 horas. No caso da cocção, segue-se a Portaria nº 1428/MS (BRASIL, 1993), que preconiza como temperatura ideal para a cocção de 74°C por

15 segundos, embora também seja aceito o cozimento a 70°C por 2 minutos ou 65°C por 15 minutos (SILVA JÚNIOR, 1995).

3.3 Óleos essenciais como agentes antimicrobianos

A preocupação com o aumento da incidência de doenças de origem alimentar tem sido alvo de muitos debates por tornarem relevantes questões de saúde pública (OUSSALAH et al., 2007). Apesar de os avanços nas técnicas de saneamento e inspeção de serviços, a contaminação dos alimentos com microrganismos indesejáveis durante o processamento dos alimentos, industrialização, armazenamento, distribuição e comercialização é um risco potencial, tanto nos países em desenvolvimento, como nos desenvolvidos (RUNYORO et al., 2010). Como agentes patogênicos resistentes a conservantes clássicos, têm sido detectados agentes antimicrobianos alternativos os quais precisam ser urgentemente encontrados (MILITELLO et al., 2011).

Os antimicrobianos naturais, substâncias com capacidade de inibição do crescimento microbiano, incluindo bactérias, vírus e fungos, constituem cada vez mais uma nova forma de garantir uma alimentação segura, mantendo a qualidade dos alimentos inalterada. As especiarias e as ervas aromáticas, além de conferir aroma e sabor, têm ação antimicrobiana. A indústria alimentícia utiliza as especiarias e os óleos essenciais como agentes de conservação de forma a aumentar o tempo de vida dos alimentos, uma vez que possuem ação antimicrobiana, reduzindo ou eliminando as bactérias patogênicas (FIB, 2010).

Durante os últimos anos, a utilização de conservantes de alimentos naturais tem sido amplamente aceita pelos consumidores, que buscam cada vez mais produtos naturais e saudáveis, que contenham aditivos menos sintéticos. Os consumidores estão habituados à presença de especiarias em alimentos, produtos que são usados principalmente para melhorar o gosto e o sabor e, portanto, óleos essenciais derivados dessas especiarias, aplicado como conservantes de alimentos naturais, não devem causar qualquer rejeição (MILITELLO et al., 2011).

As propriedades antimicrobianas de óleos essenciais têm despertado interesse pela possibilidade de constituírem uma alternativa para as exigências dos consumidores quanto à utilização de aditivos naturais em alimentos (KOTZEKIDOU et al., 2008). Entretanto, o uso para tal finalidade implica em concentrações maiores do que aquelas usadas para o realce de aroma e sabor dos alimentos sendo necessário um equilíbrio entre as concentrações para que o óleo exerça, ao mesmo tempo, ação antimicrobiana e aromática (SOARES, 2010).

Os óleos essenciais (OEs) de forma geral são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas geralmente odoríferas e líquidas. Sua principal diferença dos óleos fixos (mistura de substâncias lipídicas obtidos geralmente de sementes) é a sua volatilidade. Podem estar estocados em certos órgãos, tais como nas flores, folhas, cascas dos caules, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes. Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição varia segundo a sua localização (ANDRADE, 2010). Os óleos essenciais pertencem ao metabolismo secundário das plantas e constituem um dos mais importantes grupos de matéria-prima para a indústria alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e afins. São misturas com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídas, em sua maioria, por moléculas de natureza terpênica (MORAIS, 2009) e por outras propriedades químicas (GOMES; NEGRELLE; DIMAS FILHO, 2007).

A definição precisa sobre o que são óleos essenciais ainda é bastante discutida. Santurio et al. (2007) definiu como óleo essencial misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos, álcoois simples, cetonas, ésteres, fenóis, ácidos orgânicos fixos etc, em diferentes concentrações, nos quais existe um composto ativo majoritário. Baldoni e Czepak (2008) definem óleos essenciais como uma parte do metabolismo vegetal em que se compõe por terpenos, que estão associados ou não a outros componentes, sendo a maioria voláteis e em conjunto geram aroma característico do próprio vegetal. Óleos essenciais também podem ser definidos como os produtos obtidos de partes de plantas pelo método de destilação por arraste com vapor de água segundo a International Standard Organization (ISO). De forma geral, são definidos como sendo misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, odoríferas e líquidas (SANTOS, 2007).

São geralmente incolores ou amarelados, poucos são os óleos que apresentam cor. Outra característica importante é o aroma intenso e agradável da maioria dos óleos essenciais, e sua solubilidade em solventes orgânicos apolares, que apresentam solubilidade limitada em água, porém suficiente para aromatizar as soluções aquosas, denominadas hidrolatos (SIMÕES et al., 2007).

Aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes, em especial nas indústrias de alimentos, agrônômica, sanitária, farmacêutica, de cosméticos e perfumaria (BAKKALI; AVERBECK; IDAOMAR, 2008).

A concentração e composição dos óleos podem variar dentro de uma mesma espécie, podendo ser afetadas por fatores exteriores como a temperatura em que a planta está exposta, a umidade relativa do ambiente, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos, afetando

principalmente as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleo essencial na superfície (SALGADO, 2005). Segundo Castro et al., (2006), as plantas ricas em óleos essenciais devem ser coletadas pela manhã ou à noite, pois as temperaturas mais elevadas podem provocar uma perda quantitativa importante do óleo existente no vegetal. Portanto, não se pode estabelecer um único padrão, pois cada espécie reage de forma diferenciada.

3.4 Ação antimicrobiana de óleos essenciais *in vitro* e em alimentos

A utilização de óleos essenciais em alimentos vem ganhando grande importância por apresentar componentes naturais, evitando-se o uso de aditivos sintéticos, deteriorações, oxidações e o ataque de microrganismos, apresentando eficiência nas funções antioxidantes, antirradicais e antimicrobianas em alimentos (OUSSALAH et al., 2006; SACCHETTI et al., 2005).

Burt (2004) relata que o mecanismo de ação dos óleos essenciais sobre as bactérias está relacionado com a modificação da membrana citoplasmática, que causa danos a vários sistemas enzimáticos, interrupção da força próton motriz, do fluxo de elétrons, do transporte ativo e da coagulação dos conteúdos celulares. Alguns pesquisadores corroboram com ele, ao afirmarem que a permeabilização da membrana citoplasmática está associada com a dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do pool de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e à perda de metabólitos e íons, como íons potássio e fosfato, levando assim a danos estruturais à membrana citoplasmática, comprometendo suas funções como barreira seletiva, local de ação enzimática e geração de energia (BAKKALI; AVERBECK; IDAOMAR, 2008; GILL; HOLLEY, 2006; LAMBERT et al., 2001).

Os óleos essenciais de plantas são geralmente misturas de diversos compostos, e alguns destes podem exercer efeito antimicrobiano. As plantas que se têm mais relatos sobre a atividade antimicrobiana são canela, sálvia, cravo, alho, orégano, capim-limão, coentro, alecrim e salsa (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Diversos estudos têm avaliado esse efeito antimicrobiano *in vitro* frente aos microrganismos deteriorantes e patogênicos, sendo alguns trabalhos descritos a seguir (SOARES, 2010).

Silveira et al. (2012), utilizando método de difusão em meio sólido, verificaram que óleo essenciais de capim-limão, orégano e Basil inibiram fortemente todas as bactérias Gram-positivas testadas, e o capim-limão apresentou maior inibição em *Staphylococcus aureus* em comparação com a ampicilina. Entre as bactérias Gram-negativas, apresentou forte inibição

da *Salmonella Typhimurium*, *Yersenia enterocolitica* e *Proteus vulgaris*, e inibiu moderadamente a *Escherichia coli*.

Castilho et al. (2012), avaliando óleos essenciais e os extratos de n-hexano de quatro espécies de *Origanum*, verificaram atividade antimicrobiana contra 4 bactérias Gram-positivas, duas bactérias Gram-negativas e 3 leveduras, dentre as bactérias, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. A atividade antimicrobiana dos compostos timol, carvacrol, metil-carvacrol, p-cimeno e g -Terpineno presente na constituição dos óleos essenciais também foi avaliada. Todos os óleos essenciais, extratos de n-hexano e os compostos isolados mostraram moderadamente atividade quando comparada com o padrão antibióticos, demonstrando halos entre 13 -18 mm.

Trajano et al. (2009), utilizando o método de difusão em meio sólido, testaram a atividade antimicrobiana de onze óleos essenciais frente a dez linhagens bacterianas de importância para segurança alimentar. Observaram que os óleos de *Eugenia caryophyllata* (cravo) e da *Cinnamomum zeylanicum* (canela) mostraram eficiência na inibição de todas as bacterianas ensaiadas, entre elas uma cepa de *Salmonella enterica*, e os outros óleos produziram atividade antibacteriana, porém com menor espectro de ação. Oussalah et al. (2006), estudando a atividade antimicrobiana *in vitro* de 60 óleos essenciais sobre *Pseudomonas putida*, verificaram que todos os óleos foram efetivos, com destaque para o óleo de *Corydothymus capitatus* (orégano espanhol), que inibiu a bactéria a uma menor concentração de óleo. Esses autores atribuíram a maior atividade antimicrobiana desse óleo ao seu composto majoritário, o carvacrol (75,53%), além de possíveis interações sinérgicas entre os outros componentes do óleo. Santurio et al. (2007) observaram a alta efetividade do óleo de orégano (*Origanum vulgare*) quando estudaram a ação desse óleo frente a 20 sorovares de *Salmonella enterica* pelo método de microdiluição em caldo.

Soares (2010) verificou que concentrações de 0,39% p/v de óleo de capim-limão ou de 0,78% p/v de óleo de orégano já eram suficientes para garantir a segurança alimentar da carne bovina moída, a qual foi inoculada cerca de 10^5 UFC/g de *Salmonella*, levando em conta possíveis alterações organolépticas indesejáveis na carne devido a essas concentrações de óleo, tendo em vista que a *Salmonella* sempre está associada a uma microbiota acompanhante, geralmente deteriorativa, e que dificilmente contagens tão altas de *Salmonella* ($>10^5$ UFC/g) estariam presentes em produtos cárneos sem que antes a carne desenvolva aspecto deteriorado.

Barbosa (2010), avaliando hambúrguer bovino com adição de óleo essencial de orégano inoculado de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*, verificou sensibilidade dessas

bactérias com adição de 1,2% de óleo na formulação do hambúrguer, atribuindo essa capacidade de inibição ao timol presente no tomilho e no orégano, com a capacidade de desintegrar a membrana externa de bactérias gram-negativas, liberando lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática para o ATP. Skandamis e Nychas (2001) observaram que a adição de óleo essencial de orégano em carne picada e estocada sob atmosfera modificada retardou o crescimento microbiano.

Busatta et al. (2007) verificaram o uso de óleo essencial de orégano como agente antimicrobiano contra várias bactérias e também em linguiça frescal. Os resultados obtidos mostraram que um bom desempenho é conseguido com concentrações relativamente baixas de óleo essencial do *Origanum vulgare*, levando assim a produtos de longa conservação com uma ligeira alteração dos atributos sabor original desejado.

Emiroglu et al. (2010), estudando a atividade antimicrobiana de filmes comestíveis contendo 5% (v/v) de óleo essencial de orégano (*Origanum heracleoticum* L.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e a associação destes aplicados em carne moída fresca sob refrigeração, verificaram redução da população de *Pseudomonas* spp. e coliformes. Salomakos et al. (2008) aplicando 0,6% de óleo essencial de tomilho em carne bovina picada constataram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* O157:H7 durante estocagem à temperatura de 10°C.

Há também trabalhos com outros alimentos. Mendonça (2004), aplicando 3 diferentes óleos essenciais em ricota, verificou que o cravo apresentou a maior inibição frente à bactéria *Staphylococcus aureus* (4,27 ciclos logaritmos), seguido do manjerição (4,05 ciclos logaritmos) e do orégano (3,08 ciclos logaritmos). Raybaudi-Massilia et al. (2008), trabalhando com filmes comestíveis contendo capim-limão (*Cymbopogon citratus*), palmarosa (*Cymbopogon martini*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*), observaram efetividade destes contra *Salmonella Enteritidis* inoculadas em melões. Pode-se citar ainda estudos com peixes (MAHMOUD et al., 2006), queijos (MENON; GARG, 2001; SMITHPALMER et al., 2001), iogurte (PENNEY et al., 2004), banana (RANASINGHE et al., 2005), verduras (SINGH et al., 2002) e chocolate (KOTZEKIDOU et al., 2008), dentre outros.

3.5 *Origanum vulgare* L. (orégano)

O estudo da atividade antibacteriana do orégano (*Origanum vulgare*), do seus diferentes extratos e óleo essencial tem sido executado sobre bactérias e fungos patogênicos e deteriorantes. Em um estudo para avaliar a efetividade antibacteriana do extrato metanólico e do óleo essencial de orégano sobre uma série de bactérias de interesse em alimentos, verificou-

se que o óleo essencial foi efetivo na inibição da grande maioria das bactérias ensaiadas, a citar *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, *B. meganertium*, *Clavibacter michiganense*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (SAHIN et al., 2004).

Na literatura, existem muitos relatórios relativos à composição química e às propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de várias espécies *Origanum* e à sua aplicação em diversas preparações comerciais, como agentes antimicrobianos e antioxidantes (BAYDAR et al., 2004). Estudos anteriores têm demonstrado a capacidade de óleo de *Origanum* para retardar e para inibir o crescimento de vários organismos que deterioram alimentos incluindo as espécies de *Aspergillus* e leveduras industriais. O óleo *Origanum* inibe completamente o crescimento de *Candida albicans* a 0,25 mg/mL, sendo o mais potente dos óleos essenciais testados e provaram ser bactericida na cultura de duas cepas de *Staphylococcus aureus* em 0,25 mg/mL (SALGUEIRO et al., 2003).

De acordo com Chorianopoulos et al. (2004), a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare* depende muito da composição química em carvacrol e timol. A tendência atual adotada pela produção de alimentos, escritórios legislativos e os consumidores exigiu uma retirada progressiva dos produtos químicos aditivos em sistemas de conservação de alimentos, buscando alternativas de substâncias, a fim de conservar os produtos finais da deterioração dos alimentos e doenças causadas por microorganismos e oxidação.

Em estudo realizado por Souza et al., (2006), verificou-se efeito antibacteriano do óleo essencial de *Origanum vulgare* em *Staphylococcus aureus* (clássico patógeno Gram-positivo), *Bacillus cereus* (patógeno formador de esporos), *Salmonella enterica* (clássico patógeno Gram-negativo), *Yersinia enterocolitica* (patógeno emergente), *Escherichia coli* (indicador de contaminação fecal), *Serratia marcescens* (deterioração de alimentos).

Devido a sua ampla variedade de características químicas e de aroma, *O. vulgare* tem sido amplamente utilizado como insumo na indústria farmacêutica e cosmética, como erva culinária, flavorizante de alimentos, em bebidas alcoólicas e perfumaria na obtenção de fragrâncias picantes (SIVROPOULOU et al., 1996; NOVAK et al., 2003). Além disso, seu óleo essencial, rico em carvacrol e timol, é considerado como potente bactericida e fungicida reconhecido cientificamente (CUNHA et al., 2003; CASTRO et al., 2006).

Estudos têm mostrado que as propriedades biológicas de espécies de *Origanum* podem variar de acordo com a técnica de cultivo, origem, estágio vegetativo e estação de coleta do material vegetal (MILOS, 2000).

As folhas secas e o óleo essencial de *Origanum vulgare* são empregados medicinalmente por vários séculos em diferentes partes do mundo devido às suas propriedades terapêuticas (anti-inflamatória, antisséptica, antiespasmódica, carminativa e tônica), de forma que o seu efeito positivo sobre a saúde humana tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes na erva e consequentemente em seus derivados (CERVATO et al., 2000; SAHIN et al., 2004).

3.6 *Cymbopogon citratus* (capim-limão)

O gênero *Cymbopogon* possui mais de 100 espécies nos países tropicais, inclusive no Brasil, dentre as quais, aproximadamente 56 são aromáticas. Dentro desse gênero encontram-se *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (capim-limão), originário da Índia, conhecido por fornecer óleo essencial rico em citral e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (capim-citronela), originário do Ceilão, conhecido pelo poder repelente do óleo essencial rico em citronelal (LORENZI; MATOS, 2002; OLIVEIRA et al., 2011).

Tendo em vista as suas proeminentes propriedades antimicrobianas, tornam-se viáveis de serem utilizados em sistemas de conservação de alimentos. Sendo assim, esses metabólitos apresentam potencialidade para uso na indústria alimentícia, onde os riscos de contaminação são grandes, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de microrganismos causadores de grandes prejuízos às indústrias (ANDRADE, 2010).

A maior importância econômica do *C. citratus* é a produção do óleo essencial que é largamente utilizado na indústria de alimentos, cosmética e química (COSTA et al., 2005). O citral é matéria-prima de importantes compostos químicos denominados iononas, utilizados na perfumaria e na síntese da vitamina A (MARTINS et al., 2004). Esse composto pode estar presente na planta em concentrações que variam de 65-85%, sendo, portanto, a substância majoritária do óleo essencial, podendo ter ainda pequenas quantidades 2- undecanona, linalol, mirceno, geraniol, (E)- β -ocimeno e (Z)- β -ocimeno (OLIVEIRA et al., 2010; SADDIQ; KHAYYAT, 2010). Possui atividade antibacteriana, atua na diminuição da atividade motora e no aumento do período de sono; é anticonvulsante, antiespasmódico e analgésico (LORENZI; MATOS, 2002).

As folhas de capim-limão possuem de 0,4% a 0,6% de óleo essencial na massa fresca e o citral é considerado como o principal componente (70 a 80%) do óleo essencial, sendo o responsável pelo odor de limão característico da planta. O processo de extração por hidrodestilação é empregado com o uso de aparelho tipo Clevenger. Possuem aparência oleosa

à temperatura ambiente, aroma agradável e intenso, solubilidade em solventes orgânicos apolares limitada em água. Sua principal característica é a volatilidade, sendo geralmente incolores ou ligeiramente amarelados e em geral são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (SANTOS et al., 2014).

A espécie *Cymbopogon citratus* é uma planta aromática e medicinal pertencente à família *Poaceae*, originária do sudoeste asiático e distribuída atualmente nas regiões tropicais e subtropicais (GOMES; NEGRELLE, 2003). É uma planta herbácea, cespitosa, estolonífera, perene, que cresce cerca de 1,0m em altura, forma touceiras de perfilhos ao nível do solo e apresenta rizomas semissubterrâneos. As folhas são amplexicaule, linear-lanceoladas, ásperas nas duas faces, paralelinérveas, bordo liso, cortante, nervura central grossa e caniculada, são recobertas por uma fina camada de cera e apresenta textura áspera, o florescimento é raro e as flores são estéreis (SILVA JÚNIOR; VERONA, 1997).

No Brasil, é conhecida como capim-limão, capim-cidrô, capim santo, capim cheiroso, capim-catinga, capim-cidrão, capim cidrilho, capim-ciri e capim-cidreira (BRAGA, 1976; COSTA et al., 2005), e a sua produção no país ocorre destacadamente nas regiões sul e sudeste (GOMES; NEGRELLE; DIMAS FILHO, 2007). Sua maior importância econômica consiste na produção de seu óleo essencial, conhecido internacionalmente como óleo essencial de lemongrass (COSTA et al., 2005), rico em citral, uma mistura isomérica de geranial e neral, aldeídos monoterpênicos acíclicos (OLIVEIRA et al., 2010; SADDIQ; KHAYYAT, 2010). O citral tem efeito antiespasmódico, tanto no tecido uterino como no intestinal, atividade antibacteriana e analgésica, combate o histerismo e outras afecções nervosas (SILVA JÚNIOR; VERONA, 1997; TESKE; TRENTINI, 1997).

Silveira et al. (2012) verificou forte atividade antibacteriana do óleo essencial de capim-limão com os menores valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) ($1,25 \text{ mg mL}^{-1}$) contra várias bactérias testadas. Ele foi o mais eficiente dos óleos essenciais avaliados, especialmente contra *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. typhimurium*, que são cepas de patógenos importantes e indicadores de qualidade em alimentos. No estudo realizado por eles, os óleos essenciais de capim-limão, manjerição, orégano, folha de canela e louro apresentaram, em ordem decrescente, o maior potencial de utilização como agentes antimicrobianos naturais em alimentos. Portanto a seleção do óleo essencial a ser aplicado deve levar em consideração os patógenos e / ou a deterioração microbiota associados ao produto alimentar específico.

3.7 *Lippia sidoides* (Alecrim pimenta)

O gênero *Lippia* (*Verbenaceae*) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e de árvores de pequeno porte (SILVA et al., 2013). É conhecido por apresentar, principalmente, atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e larvicida (BATISTA et al., 2013).

O alecrim pimenta (*Lippia sidoides*), pertencente à família botânica *Verbenaceae*, é um arbusto, encontrado no sertão nordestino, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. A exemplo de outras plantas do gênero, *L. sidoides* é uma planta aromática, de uso medicinal popular, principalmente como antisséptico. Seu óleo essencial, rico em timol e carvacrol, apresentaram propriedades bactericida e fungicida, enquanto o hidrolato revelou atividade moluscicida e larvicida (BATISTA et al., 2013).

A espécie *Lippia sidoides* Cham. (*Verbenaceae*), conhecida popularmente como “alecrim pimenta”, é uma planta aromática encontrada na região de Caatinga do Nordeste brasileiro (CAVALCANTI et al., 2010) e tem mostrado diversas atividades biológicas, o que a tem tornado uma fonte potencial de compostos biologicamente ativos. Estudos recentes têm relatado diversas propriedades biológicas para seu óleo essencial, como as inseticidas, contra *Tenebrio molitor* (LIMA et al., 2011), sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (CAVALCANTI et al., 2004) e antibacteriana perante as bactérias de alimentos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (BERTINI et al., 2005) e também contra bactérias do gênero *Streptococcus* e o fungo *Candida albicans* (BOTELHO et al., 2007).

A síntese e o acúmulo dos óleos essenciais estão geralmente associados com a presença de estruturas secretoras especializadas. Segundo Svoboda e Greenaway (2003), essas estruturas são divididas em estruturas de secreção internas (cavidades e canais secretores) e externas (tricomas glandulares). O conhecimento sobre a anatomia foliar de plantas medicinais é uma valiosa contribuição para a correta identificação das espécies estudadas, sendo pesquisas dessa natureza essenciais para o manejo e conservação das espécies nativas medicinais bem como para a compreensão das relações dessas espécies com o ambiente (NASCIMENTO SILVA; PAIVA, 2007).

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, M. A.; GATTO, I. R. H.; ANDREANI, D. I. K. Avaliação do perfil microbiológico de salsichas tipo “hot dog” comercializadas em embalagens a vácuo e a granel. **Veterinária em Foco**, v.10, n.1, p. 68-79, 2012.
- ALMEIDA, A. C.; SOUZA, R. M.; PINHO, L.; SBRINHO, E. M.; SILVA, B. C. M. Determinação de perigos microbiológicos em carnes bovinas resfriadas provenientes de

abates clandestinos e comércio ilegal. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 4, p. 278-285, 2010.

ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* e *Zingiber officinale*: caracterização química, atividade antioxidante e antibacteriana**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2010.

BAKKALI, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: UFES, 2008. 623 p.

BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação**. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Instituto de Biociências), Botucatu. 2010.

BATISTA, R. S. A.; SILVA, G. S.; MACHADO, S. E. F.; VIEIRA, K. V. M. Atividade antifúngica de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre *Candida* spp. **Revista AGROTEC**, v. 34, n. 1, p. 40-49, 2013.

BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; OZKAN, G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 169-172, 2004.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Revista Infarma**, v. 17, n. 314, p. 80-3, 2005.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N.A.; BASTOS, G.M.; FONSECA, S.G.; LEMOS, T.L.; MATOS, F.J.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V.S.; BRITO, G.A. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: UFC, 1976. 540 p.

BRASIL. Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde. Portaria CVS-6/99, de 10 de março de 1999. Dispõe sobre o regulamento técnico, atributos e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. **CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**, SP, mar. 1999.

BRASIL. Instrução Normativa no 20, de 31 de julho de 2000. Dispõe sobre os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de hambúrguer. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília-DF**, jul. 2000.

BRASIL. Portaria nº 1428, de 26 de novembro de 1993. Aprova, na forma dos textos anexos, o "Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos". Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 02 de dezembro de 1993.

BRENNER, D.J. Introduction to the family *Enterobacteriaceae*, in the Prokaryotes. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Ed.). **A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria**. 2 ed. New York: Springer Verlag, 1992. p. 2673-95.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n.3, p. 223-253, 2004.

BUSATTA, C.; MOSSI, A. J.; RODRIGUES, M. R. A.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. DE. Evaluation of *origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n. 4, p.610-616, 2007.

CASTILHO, P. C.; SAVLUCHINSKE-FEIO, S.; WEINHOLD, T. S.; GOUVEIA, S. C. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 552-558, jan. 2012.

CASTRO, D. P.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; SANTOS, N. M.; BALIZA, D. P. Não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera:Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 27-32, 2006.

CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A.; SANTANA, E. W. Larvicidal activity of essential oils from brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 541-544, 2004.

CAVALCANTI, S. C.; NICULAU EDOS, S.; BLANK, A. F.; CÂMARA, C. A.; ARAÚJO, I. N.; ALVES, P. B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 829-832, 2010.

CERVATO, C.; CARABELLI, M.; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CAZZOLA, R. CESTARO, B. Antioxidant proprieties of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extrats. **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, n. 6, p. 453-465, 2000.

CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; MITAKU, S.; NYCHAS, G. J.; HAROUTONIAN, S. Essential oils of Satureja, Origanum, and Thymus species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8261-8267, 2004.

COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R.M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 956-959, 2005.

COSTA, L. O. **Processamento e diminuição do reprocesso do hambúrguer bovino (HBV)**. 2004. 127 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos). Universidade Católica de Goiás, Goiânia-GO, 2004.

COUTINHO, L. C.; MANO, S.; SILVA, C. D. M. Controle de qualidade de cortes de carne bovina resfriados comercializados na cidade do Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, p. 49-50, 2005.

CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

DIAS, R. P.; DUARTE, T. F.; GARRUTI, D. S.; ZAPATA, J. E. F.; SANTOS, C. F. Aproveitamento da Carne Caprina de Animais Velhos, de Descarte, na Produção de Linguiça Frescal sem Adição de Gordura Suína. **Circular técnica 33**. Embrapa Caprinos. Sobral – CE, 2006.

EMIROĞLU, Z. K.; YEMİŞB, G. P.; COŞKUNC, B.K.; KEZBAN, C. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties, **Meat Science**, v. 86, p. 283-288, 2010.

FAO-WHO, 2014. **Joint FAO/WHO workshop on Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula**. Geneva, p. 2–5 Feb, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/en/report.pdf>. Acesso em: 02.09.15.

FELIPE, L. M. **Associação de bactérias da família enterobacteriaceae e clostridium estertheticum com a deterioração “blown pack” em cortes cárneos embalados a vácuo**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Jaboticabal – SP, 2008.

FERREIRA, M. G. A. B.; SOBRINHO, A. J. C. Avaliação da qualidade bacteriológica das carnes bovina moída e suína (pernil) “in natura” e/ou refrigerada, em supermercados, frigoríficos e feiras livres do município de São Luís, MA. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p. 87-93, 2003.

FIB - FOODS INGREDIENTS BRASIL. **Agentes Antimicrobianos Químicos e Naturais**. São Paulo - SP, 2010, 7 p.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDAGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2006, 182p.

FRITZEN, A. Análise Microbiológica de Carne Moída de Açougues Pertencentes a 9º Regional de Saúde do Paraná. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 144, p. 81-83, 2006.

GELLI, I. A.; SILVA, V. A.; SANTOS, J. B. F.; ROSSI, D. A. Condições higiênico-sanitárias no pré-preparo de carne bovina em restaurante universitário de Uberlândia, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, p. 27-30, 2005.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 1-9, 2006.

- GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B. *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 137- 144, 2003.
- GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B.; DIMAS FILHO, L. Caracterização da produção de capim-limão no estado do Paraná, Brasil. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 4, p. 385-390, 2007.
- HARYANI, Y.; NOORZALEHA, A. S.; FATIMAH, A. B.; NOORJAHAN, B. A.; PATRICK, G. B.; SHAMSINAR, A. T.; LAILA, R. A. S.; SON, R. Incidence of *Klebsiella pneumoniae* in street foods sold in Malaysia and their characterization by antibiotic resistance, plasmid profiling, and RAPD-PCR analysis. **Food Control**. v. 18, p. 847-853, 2007.
- HAUTRIVE, T. P., OLIVEIRA, V. R., SILVA, A. R. D., TERRA, N. N., CAMPAGNOL, P. C. B. Análise físico-química e sensorial de hambúrguer elaborado com carne de avestruz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 95-101, 2008.
- JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- JUNQUEIRA, A. R.; SAMPAIO, L. S.; FLEMING, L. R.; NASCIMENTO, J. R. Diversidade e perfil de resistência a antibióticos de coliformes isolados de saladas comercializadas em restaurantes self-service. **Estudos de Biologia**, v. 30, n. 70/72, p. 55-62, 2008.
- KANKI, M., YODA, T., TSUKAMOTO, T., SHIBATA, T. *Klebsiella pneumoniae* produces no Histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers. **Journal Applied Environmental Microbiology**. v. 68, n. 7, p. 3462-3466, 2002.
- KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 119-127, 2008.
- LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.
- LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; CARVALHO, S. M.; RODRIGUES, V. G.; GUIMARÃES, L. G. L. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência & Agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 664-671, 2011.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 544 p.
- LUNDGREN, P. U.; SILVA, J. A.; MACIEL, J. F.; FERNANDES, T. M. Perfil da qualidade higiênico-sanitária da carne bovina comercializada em feiras livres e mercados públicos em João Pessoa/PB-Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 113-9, 2009.
- MAHMOUD, B. S. M.; YAMAZAKIB, K.; MIYASHITAA, K.; SHINC, I. I. SUZUKID, T. A new technology for fish preservation by combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds. **Food Chemistry**, v. 99, p. 656-662, 2006.

MAIA, A.; CANTISANI, M. L.; ESPOSTO, E. M., SILVA, W. C. P.; RODRIGUES, E. C. P; RODRIGUES, D. P; LÁZARO, N. S. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.1, p.114-119, 2009.

MARCHI, P.G.F. **Estudo comparativo do estado de conservação de carne moída através de métodos microbiológicos e físico-químicos**. 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –Unesp), Campus de Jaboticabal, 2006.

MARTINS, D. I.; MÍDIO, A. F. **Toxicologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2000.

MARTINS, M. B. G.; MARTINS, A. R.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J. Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae) e perfil químico do óleo essencial. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 6, n. 3, p. 20-29. 2004.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, 2006. 258p.

MENDES, L.G.; NASCIMENTO, K.M.; CUNHA, F.A.; SOUSA, G.C.; SOARES, K.P.; LIMA NETO, J.G.; AMORIM L.N.; MENEZES, E.A. Perfil de sensibilidade de cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de alimentos comercializados na cidade de Fortaleza. In: 47º Congresso Brasileiro de Química. **Anais...** 2007.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 72p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MENON, K. V.; GARG, S. R. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. **Food Microbiology**, v.18, n. 6, p. 647-650, 2001.

MILITELLO, M.; SETTANNI, L.; ALEO, A.; MAMMINA, C.; MOSCHETTI, G.; GIAMMANCO, G. M.; BLÀZQUEZ, M. A.; CARRUBBA, A. Chemical composition and antibacterial potential of *Artemisia arborescens* L. essential oil. **Current Microbiology**, v.62, n. 4, p.1274-1281, 2011.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; LERKIVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from orégano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 79-83, 2000.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2006.

NOVAK, J.; ZÁMBORI NEMETH, E.; HORVATH, H.; SEREGÉLY, Z. S.; KAFFKA, K. Study of essential oil components in different *Origanum* species by GC and sensory analysis. **Acta Alimentaria**, v. 32, n. 2, p. 141-150, 2003.

OLIVEIRA, A. M.; GONÇALES, M. O.; SHINOHARA, N. K. S.; STAMFORD, T. L. M. Manipuladores de alimentos um fator de risco. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 114/115, p. 12-18, 2003.

- OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. Essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 549-553, 2010.
- OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; PICCOLI, R. H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.1, p.8-16, 2011.
- OLIVEIRA, N. M. S.; NASCIMENTO, L. C.; FIORINI, J. E. Isolamento e identificação de bactérias facultativas mesófilas em carnes frescas bovinas e suínas. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n. 94, p.68-74, 2002.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v. 73, p. 236-244, 2006.
- OUSSALAH, M.; CAILLETA, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.
- PENNEY, V.; HENDERSON, G.; BLUMB, C.; JOHNSON-GREEN, P. The potential of phytopreservatives and nisin to control microbial spoilage of minimally processed fruit yogurts. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 3, p. 369-375, 2004.
- PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARAES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 887-93, 2008.
- PIGATTO, C. P.; BARROS, A. R. Qualidade da carne moída bovina resfriada comercializada em açougues da região de Curitiba. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 108, p. 53- 57, 2003.
- PINTO NETO, M. Embalagem da carne vermelha. **Revista Nacional da Carne**, n. 318. 2003.
- PODSCHUN, R.; PIETSCH, S.; HÖLLER, C.; ULLMANN, U. Incidence of *Klebsiella* species in surface Waters and their expression - Of virulence factors. **Journal Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p.3325–3327, 2001.
- PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R. G.; EVANS, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 569–575, 2003.
- RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. An integrated strategy to control post-harvest decay of Embul banana by combining essential oils with modified atmosphere packaging. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 97-103, 2005.

- RAYBAUDI MASSILIA, R. M.; MOSQUEDA MELGAR, J.; MARTINBELLOSO, O. Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 3, p. 313-327, 2008.
- RUNYORO, D.; NGASSAPAA, O.; VAGIONASB, K.; ALIGIANNISB, N.; GRAIKOUB, K.; CHINOUE, I. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p.311-316, 2010.
- SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of diferente origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.
- SADDIQ, A. A.; KHAYYAT, S. A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: citral. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 98, n. 1, p. 89-93, 2010.
- SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M. *In vitro* antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3309–3312, 2004.
- SALGADO, A. P. S. **Efeito da luz na planta e no óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**. 2005. 49 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- SALGUEIRO, L. R.; CAVALEIRO, C.; PINTO, E.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G.; PALMEIRA, A.; TAVARES, C.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; GONÇALVES, M. J.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 69, n. 9, p. 871–874, 2003.
- SANTOS, M. S.; SOUSA, K. A. P.; MENEZES, L. C.; VALE, R. C; VASCONCELOS, A. F. Extração e caracterização físico-química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Anais...** 54º Congresso Brasileiro de Química (CBQ), 2014.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2007. 1102 p.
- SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; MORAES, P. P. C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.
- SHINOHARA, N. K. S.; PIRES, E. F.; ANDRADE S. C. Qualidade microbiológica de coxão mole bovino comercializado em mercados públicos da cidade do Recife/ PE. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, p. 182-183, 2003.
- SIGARINI, C. O.; ALMEIDA FILHO, E. S. Análise bacteriológica de carne bovina comercializada em feiras livres no município de Cuiabá, MT. **Higiene Alimentar**, v. 17, p. 104-105, 2003.

SILVA JÚNIOR, A. A.; VERONA, M. L. F. **Plantas medicinais e aromáticas**. Itajaí: Ministério do Meio Ambiente, Fundo Nacional do Meio Ambiente, 1997. 456 p.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação**. 6. ed. São Paulo: Varela, 2005. 624 p.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviço de alimentação**. São Paulo: Livraria Varela, 1995, 223p.

SILVA, M. C. D.; RAMALHO L. S. FIGUEIREDO, E. T. Salmonella sp em ovos e carcaças de frango in natura comercializadas em Maceió, AL. **Higiene Alimentar**, v. 18, n.121, p. 80-84, 2004.

SILVA, O. N.; PAIVA, J. G. A. Estudos morfológicos e anatômicos em folhas adultas de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae Lindley). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 6, n. 2, p. 36-43, 2007.

SILVA, V. M.; CARVALHO, R. R. C.; REGO, T. J. S.; FONTES, M. G.; BLANK, A. F.; LARANJEIRA, D. Efeito de óleos essenciais de *Lippia* na inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani*. **Anais...** In: CONAC - Congresso Nacional de Feijão-Caupi, Recife - PE, 2013.

SILVEIRA, S. M.; CUNHA JUNIOR, A.; SCHEUERMANN, G. N.; SECCHI, F. L.; VIEIRA, C. R.W. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1300-1306, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: editora UFRGS, 2007. 1104p.

SINGH, N.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K.; STROSHINE, R. L. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil of sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 35, n. 8, p. 720-729, 2002.

SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAU, C.; KIKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum vulgare* essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 5, p. 1202-1205, 1996.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 6, p. 1011-1022, 2001.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food microbiology**, v. 18, n. 4, p. 463-470, 2001.

SOARES, R. A. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente à *Salmonella enterica* Enteritidis inoculada em carne moída bovina**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

SOLOMAKOS, N.; GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; BOTSOGLOU, N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 80, n. 2, p. 159–166, 2008.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum Vulgare* L. (lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n. 4, p.527-532, 2006.

SOUZA, G.C. **Detecção de betalactamases de espectro expandido (ESBL) em cepas de coliformes isoladas de carne de frango comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará.** Dissertação (Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2007.

TAJKARIMI M. M.; IBRAHIM S. A.; CLIVER D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1199–1218, 2010.

TANURE, M. C.; COELHO, D. A.; VEIGA, S. M. O. Avaliação da qualidade microbiológica de massas de quibes de carne bovina recém preparadas, comercializadas em açougues do município de Alfenas, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 145, p. 81-83, 2006.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. 3. ed. Curitiba: Herbarium, 1997. 317 p.

TORNADIJO, M.E.; GARCÍA, M.C.; FRESNO, J.M.; CARBALLO, J. Study of *Enterobacteriaceae* during the manufacture and ripening of San Simon cheese. **Food Microbiology**, v.18, p. 499–509, 2001.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Antibacterial property of spice essential oils on food contaminating bacteria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

VERNET, V.; PHILIPPON, A.; MADOULET, C.; VISTELLE, R.; JAUSSAUD, R.; CHIPPAUX, C. Virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* blood culture isolates. **FEMS. Microbiol Lett.** v. 130, p.51–57, 1995.

CAPÍTULO II – Extração, Caracterização e Atividade *in vitro* de óleos essenciais frente a cinco linhagens bacterianas

RESUMO: Os óleos essenciais de plantas são geralmente misturas de diversos compostos que têm apresentado grande importância em determinadas pesquisas, e alguns destes podem exercer efeito antimicrobiano. Objetivou-se com este trabalho avaliar a composição, o efeito antimicrobiano *in vitro* e a atividade bactericida dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citratus* e *Origanum vulgare* coletados na cidade de Limoeiro do Norte – CE. Para composição dos óleos essenciais foram determinados os espectros de massas dos óleos essenciais obtidos em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa. Foi utilizado teste de difusão em disco baseado na determinação do halo formado e atividade bactericida no tempo de 24 horas. O óleo essencial de alecrim pimenta apresentou como constituinte majoritário o timol (83,53%), o de capim-limão apresentou os constituintes α -Citral (56,17%) e β -Citral (35,77%) e o óleo essencial de orégano apresentou o Terpinen-4-ol (25,62%), γ -Terpineno (16,18%) e Carvacrol (12,84%) como compostos majoritários. Os resultados apontam atividade antimicrobiana dos óleos essenciais demonstrando sensibilidade das bactérias aos óleos em várias concentrações e atividade bactericida desde o tempo de três horas em concentração de 1% para alecrim pimenta, 0,312% para capim-limão e 0,312 e 0,156% para óleo essencial de orégano. Conclui-se que os óleos essenciais apresentaram atividade bactericida *in vitro* frente a várias cepas bacterianas de interesse em alimentos, mesmo em baixas concentrações, demonstrando um grande potencial para utilização em indústrias alimentícias, farmacêuticas dentre outros.

Palavras-chave: Antimicrobianos naturais; *Cymbopogon citratus*; *Lippia sidoides*; *Origanum vulgare*.

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais, definidos como constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância de muitas plantas, são compostos que têm apresentado grande importância em determinadas pesquisas, principalmente na área de alimentos, por serem potencialmente úteis no controle fitossanitário, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram diminuir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e microrganismos que causam prejuízos nas indústrias alimentícias e na agricultura (BAKKALI; AVERBECK; IDAOMAR, 2008).

Os óleos essenciais de plantas são geralmente misturas de diversos compostos, e alguns destes podem exercer efeito antimicrobiano. As plantas que se têm mais relatos sobre a atividade antimicrobiana são canela, sálvia, cravo, alho, orégano, capim-limão, coentro, alecrim e salsa (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Diversos estudos têm avaliado esse efeito antimicrobiano *in vitro* frente aos microrganismos deteriorantes e patogênicos utilizando óleos essenciais e verificado que estes possuem ação mesmo associados a baixas concentrações

(TRAJANO et al., 2009; SOARES et al., 2010; BARBOSA, 2010; CASTILHO et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012).

As atividades dos óleos essenciais englobam ação fitoterápica, antiviral, antisséptica, nutricional, antifúngica, entre outras. A atividade bacteriostática e/ou bactericida de óleos essenciais é exercida principalmente por compostos terpenóides (BURT, 2004). Porém, a composição, concentração e atividades dos óleos podem variar dentro de uma mesma espécie, podendo ser afetadas por fatores exteriores, como a temperatura em que a planta está exposta, a umidade relativa do ambiente, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos, afetando principalmente as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleo essencial na superfície (SALGADO, 2005; SILVA et al., 2011).

O uso dos óleos essenciais no controle de bactérias patogênicas na indústria de alimentos requer, como etapa inicial, o estudo da atividade antimicrobiana *in vitro*. Neste contexto, alguns fatores devem ser considerados e avaliados conjuntamente, como rendimento de óleo essencial da espécie vegetal utilizada, importante do ponto de vista econômico; composição química do óleo essencial, que irá influenciar diretamente na atividade biológica; concentração do óleo essencial a ser utilizada; efeito bactericida e ou bacteriostático do óleo essencial, bem como o tempo necessário para que estes ocorram e possível ação sinérgica da combinação de óleos essenciais de espécies vegetais distintas (OLIVEIRA et al., 2011).

Mediante o exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar a composição, o efeito antimicrobiano *in vitro* e a atividade bactericida dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citratus* e *Origanum vulgare* coletados na cidade de Limoeiro do Norte – CE.

2 METODOLOGIA

2.1 Plantas e obtenção dos respectivos óleos

Foram extraídos óleos essenciais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*), orégano (*Origanum vulgare*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*). As folhas e flores do alecrim pimenta foram obtidas da Unidade de Estudo Pesquisa e Extensão (UEPE) do IFCE – Campus Limoeiro do Norte e foram secas em estufa à temperatura de 60°C por aproximadamente 6 horas. O capim-limão foi obtido de produções de pequena escala em hortas particulares da região e secas em estufa à temperatura de 60°C por aproximadamente 6 horas e as folhas secas de orégano foram obtidas do comércio local de Limoeiro do Norte - CE. Todos os óleos foram extraídos no laboratório de Química de alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), Campus Limoeiro do Norte, utilizando o método hidrodestilação,

que consiste em evaporar uma mistura de vapor-d'água e componentes voláteis presentes na matéria-prima vegetal, em aparelho denominado Clevenger (MECHKOVSKI; AKERELE, 1992). A água foi removida por decantação e o óleo essencial foi armazenado à temperatura de 4°C, protegido da luz para evitar a alteração da sua composição. Foi calculado rendimento dos óleos essenciais a cada extração de 90 minutos.

2.2 Caracterização dos óleos essenciais (Espectrometria de massas - EM)

Os espectros apresentados neste trabalho foram obtidos em equipamentos da Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (DQOI/UFC).

Os espectros de massas dos óleos essenciais foram obtidos em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM SHIMADZU, modelo QP2010), com injetor automático AOC-20i, coluna capilar RTX-5MS (5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano, 30m x 0,25mm, 0,25µm) e tendo o hélio (He) como gás de arraste, com vazão de 1,0 mL/min para os óleos essenciais.

Para análise dos óleos essenciais a temperatura do forno foi programada de 40°C-180°C a uma taxa de 4°C/min, depois de 180°C-280°C a uma taxa de 20°C/min e mantida a 280°C durante 10 min. A temperatura do injetor e do detector (ou interface) foi de 250°C e 300°C, respectivamente.

A identificação dos compostos foi feita através de comparação de seus espectros de massas com os da biblioteca NIST08, índices de retenção e dados publicados (ADAMS, 2007). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir das áreas dos picos do cromatograma e dispostas por ordem de eluição. Os espectros de massas das substâncias isoladas foram obtidos em espectrômetro de massa modelo QP2010 da SHIMADZU, operando em impacto eletrônico de 70 eV.

2.3 Linhagens bacterianas testadas

Foram utilizadas cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028 obtidas do departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, CE.

2.4 Testes de sensibilidade

Foram utilizados dois métodos de testes de sensibilidade bacteriana ao óleo, sendo o teste de difusão em disco baseado na determinação do halo formado (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2004) e outro para a verificação da curva de crescimento bacteriano e efeito bactericida na presença do óleo essencial em função do tempo (SFORCIN et al., 2000).

2.4.1 Teste de difusão em disco

As linhagens bacterianas foram inoculadas em Brain Heart Infusion (BHI) a 35°C/18 horas e foram padronizadas na escala 0,5 da escala MacFarland em solução fisiológica estéril, obtendo valores de 10^7 a 10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) mL⁻¹ e em seguida foram distribuídas uniformemente, com auxílio de swab estéril, em placas contendo ágar Mueller-Hinton. O swab foi umedecido na solução contendo a bactéria e em seguida foi estriado em 4 direções na placa.

Discos de papel branco estéreis de 6mm de diâmetro foram embebidos nas soluções contendo óleo essencial de Alecrim pimenta com concentrações de 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16% e para os óleos de orégano e capim-limão foram utilizadas concentrações de 0; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5% (v/v), e dispostas na placa contendo as bactérias inoculadas, a fim de realizar a medição do halo de inibição formado. As placas foram colocadas em estufa a 37°C/24 h e depois, com auxílio de um paquímetro, foi realizada a medição dos halos de inibição formados. O teste foi realizado em quintuplicata.

2.4.2 Efeito bactericida

Foram preparadas soluções com concentrações de 1% de óleo essencial de Alecrim pimenta, 0,312% de capim-limão, 0,312 e 0,156% de óleo essencial de orégano, além de um controle para cada microrganismo e óleo (Controle SA – *S. aureus*; Controle SC – *S. choleraesius*; Controle KP – *K. pneumoniae*; Controle EA – *E. aerogenes*; Controle PA – *P. aeruginosa*), seguindo as metodologias utilizadas por Silva et al. (2009) e Oliveira et al. (2011) adaptado, em que se utilizou 3mL da solução (Água estéril + óleo essencial + 0,2% Tween 80) e controle (Água estéril + 0,2% Tween 80), inoculadas com 500µL de caldo BHI contendo cerca de $1,5 \times 10^8$ de bactérias já padronizadas na escala 0,5 de MacFarland e foram incubadas em estufa à temperatura de 35 °C/24h. Foram retiradas alíquotas de 0,1mL nos tempos 0, 3, 6, 9, 22, 24h, espalhadas em Ágar Mueller-Hinton com auxílio de uma Alça Drigalski e incubadas

à temperatura de 35°C/18 a 24h. Após as 24 horas foi realizada a contagem das UFC mL⁻¹ de cada bactéria e realizados seus respectivos logaritmos.

2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Foi aplicado delineamento inteiramente casualizado para os testes de sensibilidade. Os resultados foram demonstrados em média, desvio-padrão e gráficos, sem aplicação de testes de média. Para determinação da concentração mínima inibitória, os óleos essenciais foram avaliados independentes e tomado como base o tamanho do halo formado e redução das contagens de log UFC mL⁻¹ das bactérias com até 24 horas de contato.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Alecrim pimenta (*Lippia sidoides*)

3.1.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial das folhas secas de *Lippia sidoides*

O óleo essencial das folhas secas de *Lippia sidoides* foram obtidos pelo processo de hidrodestilação, os constituintes foram identificados pelas técnicas de CG-EM. Sua composição seguida pelos tempos de retenção e os teores expressos em porcentagem para cada constituinte encontram-se na Tabela 1.

Tabela 2 – Constituintes do óleo essencial das folhas secas de *Lippia sidoides*.

Constituintes	TR (min)	Área (%)
β-Mirceno	09,548	1,00
α-Terpineno	10,416	0,79
p-Cimeno	10,715	5,92
γ-Terpineno	11,953	3,27
Metil-éter-timol	18,410	1,18
Timol	20,805	83,53
Cariofileno	24,860	4,31
Total		100,00

TR: tempo de retenção.

Fonte: Elaborada pela autora.

O rendimento do óleo essencial, expresso em porcentagem p/p, das plantas de *L. sidoides* foi de 3,63 ± 0,27%, foram semelhantes aos valores encontrados por Chaves et al. (2008), que obtiveram rendimentos de 4,33%, 3,50% e 3,47% para óleos extraídos nas cidades de Manaus, Fortaleza e Botucatu respectivamente, e superiores aos encontrados por Guimarães et al. (2014), que encontraram valores de 0,873 ± 0,23% para óleo extraído de plantas nativas de Minas Gerais utilizando o mesmo método de extração.

Foram identificados sete constituintes, representando 100% da composição total do óleo. O óleo essencial de lecrim pimenta apresentou como constituinte majoritário o timol (83,53%), seguido dos constituintes p-Cimeno (5,92%), Cariofileno (4,31%), γ -Terpineno (3,27%), Metil-éter-timol (1,18%), β -Mirceno (1,00%) e α -Terpineno (0,79%) (Tabela 1). O cromatograma e os espectros de massas dos constituintes identificados estão dispostos no Anexo I.

Cavalcanti et al. (2010), em estudo com óleo essencial obtido da cidade de Limoeiro do Norte-CE, identificaram também como composto majoritário o Timol (70,36%) seguido do p-Cimeno (8,36%), β -Cariofileno (8,01%), γ -Terpineno (2,69%), Mirceno (1,40%) e α -Terpineno (1,05%).

Guimarães et al. (2014) ressaltam que grande parte dos estudos realizados com plantas da espécie da *L. sidoides* nativa da região nordeste do Brasil demonstram a presença do timol (isômero do carvacrol) como constituinte majoritário de seus óleos essenciais, enquanto em pesquisa realizada por eles, verificaram como constituintes majoritários o carvacrol (26,44%) e o 1,8- Cineol (22,63%) em plantas nativas de Minas Gerais. Cavalcanti et al. (2004) também encontraram o timol (80,8%) como constituinte majoritário do óleo essencial de plantas dessa espécie, coletadas na região nordeste.

Soares e Dias (2013) afirmam que, em geral, geranial (= citral, ou 3,7-dimetil-2,6-octadienal ou lemonal), carvona, carvacrol (= cimofenol) e timol são os constituintes majoritários dos óleos essenciais de *Lippia* spp. e que há uma variação no teor e na composição química dos óleos essenciais de diferentes espécies, no que se refere aos constituintes majoritários.

Esses resultados são similares àqueles encontrados por Botelho et al. (2007), que identificaram como constituintes majoritários do óleo essencial de plantas, também do Nordeste, o timol (56,7%) e carvacrol (16,7%), seguidos pelo d-cimeno (7,13%) e timol metil éter (5,06%), e por Lima et al. (2013) que, analisando o óleo essencial dessa espécie coletada no município de Horizonte/CE, encontraram timol (83,24%), trans-cariofileno (5,77%) e p-cimeno (4,46%). Fontenelle et al. (2007), analisando o óleo essencial do mesmo município (Horizonte-CE), encontraram o timol (59,65%) e o (E)-cariofileno (10,60%) como constituintes majoritários.

Segundo Guimarães et al. (2014) estas variações podem ser justificadas por fatores genéticos, edafoclimáticos e também pelo ciclo vegetativo. De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), a produção de metabólitos secundários pode ser influenciada por diversos fatores ambientais, como sazonalidade, índice pluviométrico, ritmo circadiano, altitude, temperatura, ciclo vegetativo da planta, tipo de solo, entre outros. Barros et al. (2009) afirmam que as

condições climáticas podem influenciar as atividades enzimáticas em determinada espécie vegetal e, consequentemente, interferir na biossíntese de determinados metabólitos secundários, incluindo compostos terpênicos.

3.1.2 Teste de difusão e atividade bactericida *in vitro* da *Lippia sidoides* frente a bactérias

A média dos halos de inibição formados do óleo essencial de *Lippia sidoides* frente as cinco linhagens bacterianas testadas (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae*) estão descritas na Tabela 2. Os resultados demonstram atividade antimicrobiana do óleo essencial em variadas magnitudes, demonstrando sensibilidade das bactérias ao óleo em várias concentrações.

O óleo essencial de *Lippia sidoides* apresentou ação inibitória para todas as bactérias testadas, com o maior halo formado para *Staphylococcus aureus* na maior concentração testada (16%), porém nas menores concentrações ($\geq 1\%$) já apresentaram inibição fraca para as bactérias testadas.

Tabela 2 – Médias e desvio padrão do óleo essencial de *Lippia sidoides* frente a cinco espécies de bactérias.

Concentrações (%)	Bactérias				
	Halos de inibição (mm)				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. choleraesius</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>K.pneumoniae</i>
0,00	00,0 $\pm$ 0,00	00,0 $\pm$ 0,00	00,0 $\pm$ 0,00	00,0 $\pm$ 0,00	00,0 $\pm$ 0,00
0,125	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
0,25	7,30 $\pm$ 0,30	7,90 $\pm$ 0,83	8,20 $\pm$ 0,80	7,20 $\pm$ 0,80	6,70 $\pm$ 1,00
0,50	8,60 $\pm$ 0,40	8,20 $\pm$ 0,81	9,70 $\pm$ 0,32	8,50 $\pm$ 0,50	9,10 $\pm$ 0,50
1,00	10,2 $\pm$ 0,83	11,8 $\pm$ 0,45	10,3 $\pm$ 0,73	11,7 $\pm$ 0,31	10,6 $\pm$ 0,40
2,00	15,4 $\pm$ 0,35	14,3 $\pm$ 1,19	14,1 $\pm$ 0,22	13,0 $\pm$ 0,50	14,2 $\pm$ 0,54
4,00	18,4 $\pm$ 1,14	16,4 $\pm$ 1,14	15,3 $\pm$ 0,6	14,5 $\pm$ 0,67	16,3 $\pm$ 0,50
8,00	22,2 $\pm$ 2,58	19,8 $\pm$ 2,48	16,0 $\pm$ 0,70	15,0 $\pm$ 1,0	17,0 $\pm$ 2,12
16,0	26,6 $\pm$ 6,20	24,8 $\pm$ 2,94	21,4 $\pm$ 1,67	20,6 $\pm$ 1,51	19,4 $\pm$ 0,54

Fonte: Elaborada pela autora.

Segundo Carovic-Stanko et al. (2010), as zonas de inibição podem ser classificadas como fraca (10,0-13,9mm), moderada (14-18mm) ou forte (> 18 mm). Tomando isso como base, o óleo essencial da *L. sidoides* apresentou zona de inibição considerada significativa para todas as bactérias testadas a partir da concentração de 1%.

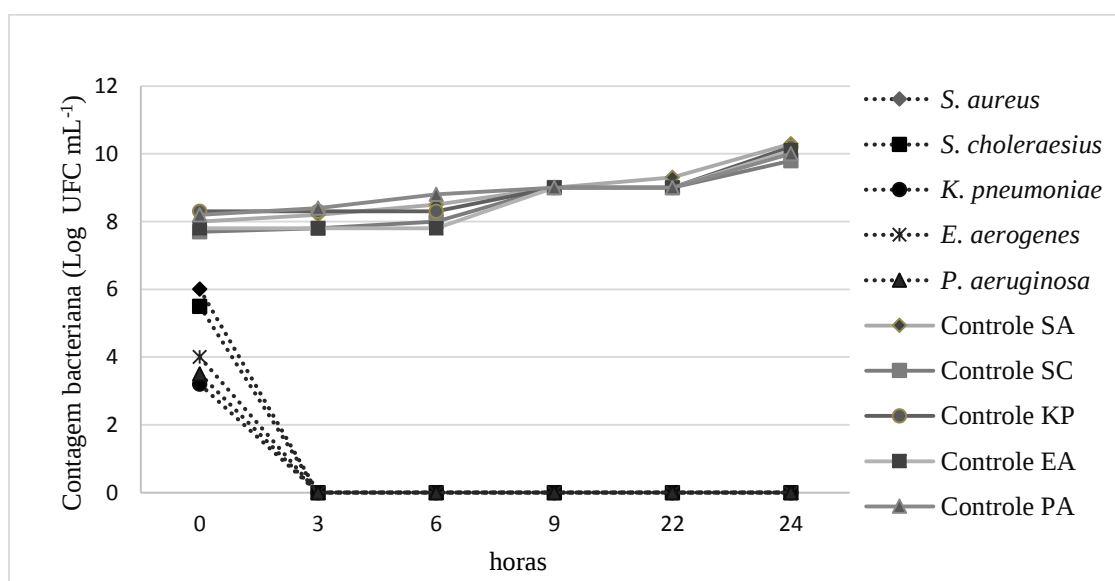
Na concentração de 0,125%, o óleo essencial não apresentou inibição para as bactérias e apresentou sensibilidade a partir da concentração de 0,25%, com halos variando de 6,70 a 8,20mm. Na concentração de 0,5%, os halos variaram de 8,20 a 9,70mm.

Em trabalho realizado por Costa et al. (2011), foi verificada a formação de zona de inibição para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 somente na concentração 16% com halo de 8,2mm, e para *S. aureus* isolado do leite cru com concentração de 32%, enquanto em estudo realizado por Feitosa et al. (2005), foi verificada a formação de halo de inibição de 35mm do óleo essencial de *L. sidoides* frente à *S. aureus* ATCC 29737 e nenhuma ação inibitória e formação de halo contra *P. aeruginosa* utilizando uma concentração de 20% de óleo essencial de *L. sidoides*.

Segundo Leal et al. (2002), o óleo essencial obtido das folhas do *L. sidoides* é um dos produtos naturais que possui uma ampla diversidade química, possuindo o timol como principal constituinte (cerca de 34,2 a 95,1%) e carvacrol, além de p-cimeno, o-terpineno e o-cariofileno são encontrados. Portanto, nesse estudo, pode-se afirmar que a sensibilidade das bactérias ao óleo está ligada à presença do timol na composição do óleo essencial, presente em uma quantidade de 83,53% em relação à composição total do óleo.

A ação bactericida do óleo em função do tempo, estão descritas na Figura 1. Observa-se que o óleo de alecrim pimenta demonstrou ação bactericida para todas as bactérias testadas, na concentração de 1%.

Figura 1 – Contagens de log de UFC mL⁻¹ para cinco linhagens de bactérias na concentração de 1% (v/v) de óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) em função do tempo.



Fonte: Elaborada pela autora.

A partir do tempo de três horas, todas as bactérias testadas foram sensíveis ao óleo essencial de alecrim pimenta na concentração de 1%, sendo reduzidas de 4-6 log UFC mL⁻¹ para 0 log UFC mL⁻¹, enquanto os controles de todas as bactérias apresentaram aproximadamente 8log UFC mL⁻¹. Todas as bactérias analisadas (*S. aureus*, *S. choleraesius*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* e *P. aeruginosa*) apresentaram contagens de 0,0log UFC mL⁻¹ em todos os tempos analisados (3, 6, 9, 22 e 24 horas) exceto tempo 0, demonstrando efeito bactericida do óleo essencial de *Lippia sidoides* para todas as bactérias testadas na concentração de 1% (v/v).

Castro et al. (2011) verificaram concentração inibitória mínima de óleo essencial de *L. sidoides* de 1,3% (com formação de halo de 8mm) para *S. aureus* e concentração bactericida mínima de 2,5% (com formação de halo de 11,5mm) para inibição total de *S. aureus* no tempo de 24 horas.

Em estudo realizado por Bertini et al. (2005), a *P. aeruginosa* foi resistente ao *L. sidoides* utilizando concentração de 5%, enquanto as bactérias *S. aureus* e *Escherichia coli* apresentaram-se sensíveis a essa concentração. Em trabalho realizado por Guimarães et al. (2007), também foi verificada sensibilidade das bactérias *S. aureus* e *E. coli* utilizando também concentração de 5% do óleo essencial de *L. sidoides*.

Vários trabalhos relatam que bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis à atividade de óleos essenciais que bactérias Gram-negativas. A alta atividade apresentada pelo óleo de *L. sidoides* deve-se à presença do timol em sua constituição e muitos trabalhos relatam as atividades antimicrobianas desse composto e de seu isômero carvacrol. Porém Guimarães et al. (2012) relatam que esses compostos não apresentam uma seletividade diante das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, e que isso está associado a uma ampla atividade bacteriana e fungicida, podendo atingir inúmeras espécies e áreas, estando associadas até a uma ação anti-inflamatória do óleo essencial de *L. sidoides* e seu constituinte majoritário, o timol; em investigação feita por Veras et al. (2013), os pesquisadores verificaram essa ação em edema agudo da orelha de ratos e afirmaram que houve ação anti-inflamatória desse óleo provavelmente devido à abundância de timol, pois não houve diferença significativa entre os resultados de ambas as substâncias e o uso crônico dessa substância causou efeito pró-inflamatório.

Castro et al. (2011) afirmam que o uso de óleo essencial de *Lippia sidoides* pode ser utilizado como componente em produtos saneantes para indústria de alimentos ou há qualidade

higiênico-sanitária, podendo ser uma alternativa econômica e eficiente para a limpeza de superfícies de equipamentos e utensílios e que uma alternativa para reduzir a perda de propriedades sanitárias da *Lippia sidoides* durante o processamento, armazenamento e comercialização seria a utilização de tecnologias de encapsulamento combinada com bioativos e embalagem biodegradáveis, de modo que os componentes ativos possam ser liberados durante o consumo.

3.2 Capim-limão (*Cymbopogon citratus*)

3.2.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial das folhas secas de *Cymbopogon citratus*

O óleo essencial das folhas secas de *Cymbopogon citratus* foram obtidos pelo processo de hidrodestilação, os constituintes foram identificados pelas técnicas de CG-EM. Sua constituição química, seguida pelos tempos de retenção e os teores expressos em porcentagem para cada constituinte encontram-se na Tabela 3.

O rendimento do óleo essencial, expresso em porcentagem p/p, das plantas de *Cymbopogon citratus* foi de $0,83 \pm 0,19\%$, valores semelhantes aos encontrados por Matasyoh et al. (2011) que encontraram rendimento de 0,80% e superior aos encontrados por Silva et al. (2014), de 0,54%, utilizando o método de hidrodestilação, e 0,44%, utilizando método por arraste de vapor.

Tabela 3 – Constituintes do óleo essencial das folhas secas de *Cymbopogon citratus*

Constituintes	TR (min)	Área (%)
β -Mirceno	9,557	3,16
Linalol	13,471	00,55
α -Ciclocitral	16,515	00,92
β -Citral	18,765	35,77
Geraniol	19,220	02,75
α -Citral	19,885	56,17
Ácido Nerólico	39,688	00,68
Total		100,00

TR: tempo de retenção

Fonte: Elaborada pela autora.

Do óleo essencial foram identificados sete constituintes, representando 100% da composição total do óleo. O óleo essencial de Capim-limão apresentou como constituinte majoritário o α -Citral (56,17%), seguido dos constituintes β -Citral (35,77%), β -Mirceno

(3,16%), Geraniol (2,75%), α -Cyclocitral (0,92%), Ácido Nerólico (0,68%) e Linalol (0,55%) (Tabela 2). O cromatograma e os espectros de massas dos constituintes identificados encontram-se no Anexo II.

Silva et al. (2014) também encontraram o α -Citral (20,63% e 44,69%) e β -Citral (14,50% e 32,42%) pelos métodos de hidrodestilação e arraste a vapor respectivamente, como compostos majoritários, analisando a composição do óleo essencial de capim-limão extraído por dois métodos, além destes também foi verificada a presença de compostos como o β -Mirceno (10,72%) e ácido nerólico (1,80%) na composição do óleo.

Esses resultados também corroboram com outros autores como Oliveira et al. (2010), que encontraram, como constituintes do óleo essencial de *C. citratus*, α -Citral (42,91%), β -Citral (30,90%), linalol (1,51%) e mirceno (1,36%); e Valeriano et al. (2012), que também verificaram presença do α -Citral (38,43%) e β -Citral (31,12%) como constituintes majoritários do óleo essencial do *C. citratus*, além destes, também possuía na composição compostos como linalol (4,21%) mirceno (2,53), geraniol (1,33%) e outros.

Essas variações de quantidades de compostos e constituintes do óleo essencial da mesma espécie, ocorrem por diversos fatores, desde o cultivo, época e horário da coleta, local de produção, e até mesmo o método da extração, pois, segundo Simões (1999), na hidrodestilação ocorre o contato direto do material vegetal com a água em ebulição, ou seja, um meio com uma mistura complexa de substâncias submetidas à alta temperatura, condições que propiciam várias reações, podendo formar vários artefatos (produtos que não estão presentes no óleo *in natura*, mas que são formados durante o processo de extração).

A diferença encontrada entre a quantidade e qualidade da composição química dos óleos essenciais desse estudo e a composição química dos óleos essenciais de alguns trabalhos já realizados pode ser atribuída ao fato de que os óleos essenciais são um grupo heterogêneo de misturas de substâncias orgânicas nas quais os constituintes e as concentrações relativas não dependem somente da espécie da planta. Entre outros fatores que influenciam a composição química, os mais importantes são a origem da planta, a parte utilizada, o estágio de desenvolvimento, as condições climáticas e de crescimento, como temperatura, solo e fertilizantes e as condições de destilação e estocagem (OZCAN; ERKMEN, 2001; OLADIMEJI et al., 2001, VALERIANO et al., 2012).

3.2.2 Teste de difusão e atividade bactericida *in vitro* do *Cymbopogon citratus* frente a bactérias

A média dos halos de inibição formados do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* frente às bactérias testadas (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae*) estão descritas na tabela 4. Os resultados demonstram sensibilidade das bactérias ao óleo essencial desde a menor concentração testada (0,156%) e apresentou halos de inibição acima de 10mm para as bactérias *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, e *K. pneumoniae* desde a concentração de 0,312%, enquanto as bactérias *S. aureus* e *S. choleraesius* apresentaram halos acima de 10mm na concentração de 0,625%.

Tabela 4 - Médias e desvio padrão do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* frente a cinco espécies de bactérias.

Concen trações (%)	Bactérias Halos de inibição (mm)				
	<i>S. aureus</i>	<i>S.choleraesius</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i>
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
0,156	8,60 ± 0,54	8,00 ± 1,58	9,60 ± 0,54	9,40 ± 0,55	11,0 ± 0,70
0,312	9,60 ± 0,89	8,6 ± 1,14	10,8 ± 1,09	10,2 ± 1,30	10,4 ± 0,89
0,625	10,8 ± 0,84	10,2 ± 0,84	10,0 ± 1,00	10,8 ± 1,30	10,0 ± 0,70
1,25	12,6 ± 1,81	10,4 ± 0,55	10,2 ± 0,44	10,0 ± 0,01	10,6 ± 0,55
2,5	11,4 ± 0,55	10,7 ± 0,83	10,2 ± 0,84	10,8 ± 1,09	10,8 ± 1,10
5	15,6 ± 0,40	11,4 ± 0,89	10,4 ± 0,54	11,1 ± 1,30	11,2 ± 0,45

Fonte: Elabora pela autora.

Santos et al. (2009), verificando atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em função de sazonalidade e consorciamento, encontraram valores de concentração inibitória mínima 0,08 e 1,25 % respectivamente para *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Valor abaixo do encontrado no presente trabalho para *S. aureus* e acima para *P. aeruginosa*.

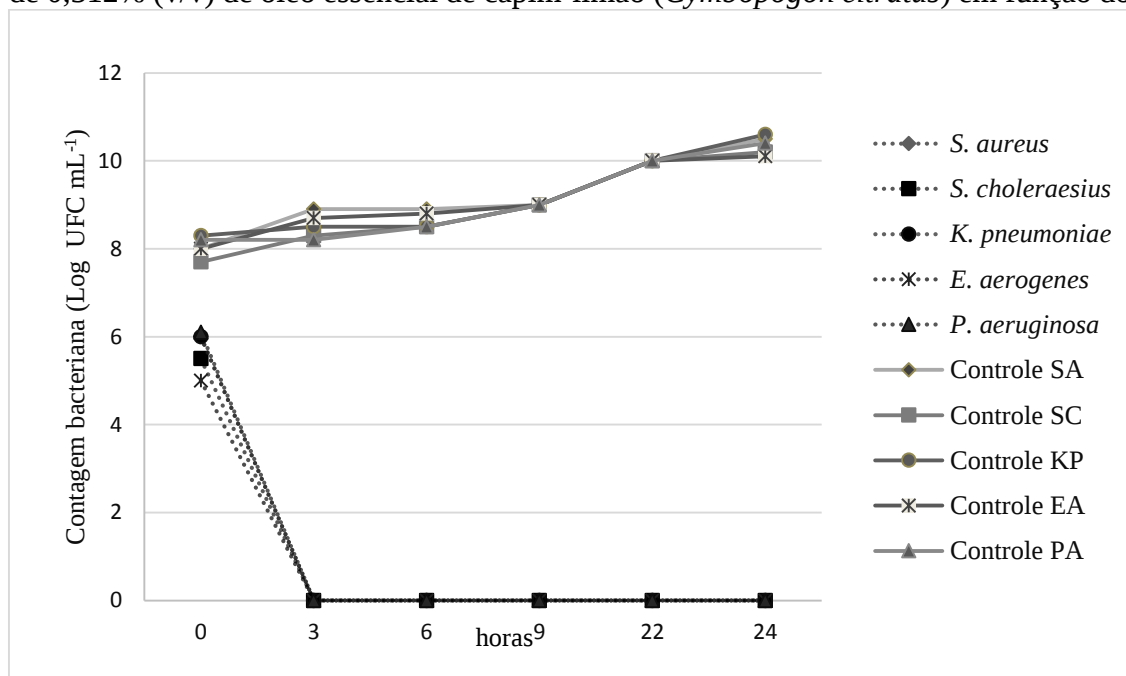
Bertini et al. (2005) encontraram valores de 16,5 e 11mm de halos formados para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* respectivamente na concentração de 1% do óleo essencial de *C. citratus* e para 2% foi encontrado valores de 19,5 e 11mm respectivamente às mesmas, utilizando plantas do Nordeste do Brasil.

Em avaliação feita por Valeriano et al. (2012), o óleo essencial de *C. citratus* apresentou, na constituição, 69,55% de geranial e neral, que são estereoisômeros e a mistura constitui o

citral, o qual é o principal composto que age contra os microrganismos. Onawunmi (1984), ao avaliar a atividade de citral frente a bactérias e fungos, constatou que a mínima concentração inibitória obtida para *S. aureus*, *E. coli*, *Candida albicans* e *Microsporium gypseum* foi de 0,05% (v/v). Perini (2013) encontrou concentração inibitória mínima de 0,156% para óleo essencial de *C. citratus* frente a *Staphylococcus aureus*, estudando as cepas isoladas da mastite bovina.

Os resultados para verificar a ação bactericida do óleo essencial de capim-limão em função do tempo estão descritos na figura 2, em que o óleo demonstrou ação bactericida para todas as bactérias testadas, na concentração de 0,312 %.

Figura 2 – Contagens de log de UFC mL⁻¹ para cinco linhagens de bactérias na concentração de 0,312% (v/v) de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) em função do tempo



Fonte: Elaborada pela autora.

Todas as bactérias foram sensíveis ao óleo essencial no período de 3 horas, reduzindo de aproximadamente 6 – 8log UFC mL⁻¹ para 0 log UFC mL⁻¹, nas primeiras três horas de contato, enquanto os controles de todas as bactérias apresentaram aumento no valor para mais de 8log de UFC mL⁻¹.

O óleo essencial na concentração de 0,312% apresentou efeito bactericida para todas as bactérias testadas, reduzindo a 0log UFC mL⁻¹ no tempo de 3 horas de contato, e mantendo essa contagem em todos os tempos analisados (6, 9, 22 e 24 horas). Permite-se, dessa forma, observar o efeito do óleo essencial contra as bactérias, visto que, quando são comparadas com

os controles, demonstram o grande potencial inibidor do óleo, pois todos os controles, ao fim das 24 horas, apresentaram-se com quantidades acima de $10 \log \text{ UFC mL}^{-1}$.

Silva et al. (2009) também observaram a redução para $0 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ de *S. aureus* nas primeiras três horas de contato com o óleo, porém os referidos autores utilizaram uma concentração ainda menor do que a utilizada nesse estudo, sendo esta igual a 0,1% do óleo essencial do capim-limão.

Pereira et al. (2004), avaliando a atividade do óleo essencial frente a bactérias isoladas, verificaram que 85,7% das cepas de *K. pneumoniae*, 50% de *E. aerogenes* e 0% da *P. aeruginosa* foram inibidas utilizando o óleo puro do capim-limão, demonstrando sensibilidade de algumas bactérias para esse óleo. Resultado diferente do encontrado no presente trabalho, em que se verificou sensibilidade da *P. aeruginosa* para o óleo essencial utilizado.

3.3 Orégano (*Origanum vulgare*)

3.3.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial das folhas secas de *Origanum vulgare*

A constituição química do óleo essencial de *Origanum vulgare*, seguida pelos tempos de retenção e os teores expressos em porcentagem para cada constituinte, encontram-se na Tabela 5.

O rendimento do óleo essencial, expresso em porcentagem p/p, das folhas de *Origanum vulgare* foi de $0,53 \pm 0,13\%$, valores acima dos encontrados por Bernardi Filho (2007), os quais variaram de 0,16 a 0,22% para óleo essencial de orégano obtidos de plantas com diferentes lâminas de irrigação e abaixo do encontrado por Busatta et al. (2007), que foi de 1,33% de óleo essencial de orégano, utilizando o mesmo método de extração.

Do óleo essencial de *Origanum vulgare* foram identificados 25 (vinte e cinco) constituintes, representando 100% da composição total do óleo. O óleo essencial de Orégano apresentou como constituinte majoritário o Terpinen-4-ol (25,62%), seguido dos constituintes γ -Terpineno (16,18%), Carvacrol (12,84%), α -Terpineno (8,29%), Terpineol (3,54%) o-Cimeno (3,30%), 3-Metoxi-p-cimeno (2,89%), Linalol acetato (2,86%), α -Terpineol (2,76%), Terpinoleno (2,74%), β -Phellandrene (2,59%), Linalol (2,44%), β -Pineno (1,99%), Cariofileno (1,87%), Timol metil éter (1,36%), β -Mirceno (1,31%), trans- β -Ocimeno (1,24%), Germacrene B (1,22%), (E)- β -terpineol (1,18%), cis-2-Mentenol (0,82%), Timol (0,77%), β -Terpineol (0,67%), Espatulenol (0,63%), α -Thujene (0,53%) e α -Pineno (0,37%) (Tabela 5). O cromatograma e os espectros de massas dos constituintes identificados encontram-se no Anexo III.

Tabela 5 – Constituintes do óleo essencial das folhas secas de *Origanum vulgare*

Constituintes	TR (min)	Área (%)
α -Thujene	7,433	0,53
α -Pineno	7,636	0,37
β -Phellandrene	8,943	2,59
β -Mirceno	9,553	1,31
α -Terpineno	10,451	8,29
o-Cimeno	10,719	3,30
β -Pineno	10,867	1,99
trans- β -Ocimeno	11,212	1,24
γ -Terpineno	12,017	16,18
β -Terpineol	12,258	0,67
Terpinoleno	13,040	2,74
Terpineol	13,417	3,54
Linalol	13,490	2,44
(E)- β -terpineol	14,255	1,18
cis-2-Mentenol	14,935	0,82
Terpinen-4-ol	16,458	25,62
α -Terpineol	16,859	2,76
Timol metil éter	18,418	1,36
3-Metoxi-p-cimeno	18,755	2,89
Linalol acetato	19,156	2,86
Carvacrol	20,650	12,84
Timol	20,910	0,77
Cariofileno	24,849	1,87
Germacrene B	27,364	1,22
Espatuleno	29,896	0,63
Total		100,00

TR: tempo de retenção

Fonte: Elaborada pela autora.

Os compostos majoritários Terpinen-4-ol, γ -terpineno e Carvacrol também foram identificados por Busatta et al. (2007), que verificaram quantidades de terpinen-4-ol (21,43%); γ -terpinene (12,32%), Carvacrol (11,67%) além de outros constituintes semelhantes aos

encontrados nesse trabalho, como Timol (9,45%), α -terpineno (5,58%), Linalol (3,47%), α -terpineol (3,17%), p-cimeno (2,99%), β -cariofileno (2,24%), Terpinoleno (1,97%), α -pineno (1,88%), Mirceno (1,18%), Metil éter timol (0,86%), cis\trans- β -ocimeno (0,81%), Espatulenol (0,51%), α -thujene (0,45%), α -phellandrene (0,39%), Linalol acetato (0,36%) e β -pineno (0,19%).

Souza et al. (2008) encontraram carvacrol (68,06%) e p-cimeno (15,91%) como compostos majoritários do óleo essencial de orégano, além de mais 12 constituintes com quantidades variando de 0,29% a 2,56%, e Silveira et al. (2012) encontraram γ -Terpineno (31,68%), (Z)- β -Ocimeno (16,03%), (E)- β -Ocimeno (11,68%) e o-Cimeno (11,43%) como compostos majoritários do óleo essencial de orégano.

Silva et al. (2010) verificaram também a presença de carvacrol como componente majoritário em óleo essencial de orégano obtido de cinco diferentes marcas (A-74,45%, B-67,73%, C-72,61%, D-93,42%, E-61,66%), além de outros componentes como o timol em 3 deles (A-14,79%, B-23,85%, C-1,88%), p-Cimeno em dois dos óleos (C-0,63%, E- 15,95%) e γ -Terpineno em um deles (E- 6,90%). Além dos fatores já mencionados que interferem na composição dos óleos essenciais, alguns autores ressaltam que o óleo colhido em uma mesma região varia em relação à época do ano (CHORIANOPOULOS et al., 2004, SILVA et al., 2010).

3.3.2 Teste de difusão e atividade bactericida *in vitro* da *Origanum vulgare* frente a bactérias

De acordo com Katzung (2003), os métodos de difusão de disco são satisfatórios para determinar a sensibilidade de diversos microrganismos contra muitas substâncias farmacêuticas, e são suficientes quando o mecanismo de resistência é devido a degradação do agente antimicrobiano pelo microrganismo.

A medida dos halos de inibição formados do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente as cinco linhagens bacterianas testadas (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae*) estão descritas na tabela 6. Os resultados demonstram atividade antimicrobiana do óleo essencial em várias concentrações, sendo as bactérias sensíveis ao óleo desde a menor concentração testada (0,156%).

Souza et al. (2008) determinam a Concentração Inibitória Mínima (CIM) a partir de zonas de inibição com diâmetros iguais ou maiores do que 10mm. Partindo desse pressuposto, verifica-se que para todas as bactérias, a menor concentração inibitória foi 0,625%.

Tabela 6 – Médias e desvio padrão de halos de inibição do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a cinco espécies de bactérias

Concentrações (%)	Bactérias				
	Halos de inibição (mm)				
	<i>S.aureus</i>	<i>S.choleraesius</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i>
0,000	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
0,156	8,01 ± 0,00	8,20 ± 2,68	7,6 ± 0,54	8,40 ± 0,44	8,90 ± 0,70
0,312	8,80 ± 1,30	9,20 ± 1,30	8,0 ± 0,54	9,20 ± 1,30	9,40 ± 0,89
0,625	10,0 ± 0,84	10,6 ± 0,54	10,1 ± 0,83	10,2 ± 2,04	10,0 ± 0,55
1,250	11,6 ± 1,81	11,8 ± 1,70	10,8 ± 0,84	11,8 ± 2,49	10,2 ± 0,83
2,500	14,4 ± 1,92	13,0 ± 2,44	14,8 ± 2,86	14,2 ± 2,86	12,6 ± 1,67
5,000	16,6 ± 3,20	12,8 ± 1,48	16,8 ± 2,07	15,8 ± 2,16	17,8 ± 3,27

Fonte: Elaborada pela autora.

As concentrações de 0,625 e 1,25% são consideradas com efeito inibitório fraco enquanto, a partir da concentração de 2,5 %, todas as bactérias apresentaram sensibilidade considerada moderada ao óleo essencial de orégano. Busatta et al. (2007) encontraram CIM de 0,46% para *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraesius* e 0,23% para *Staphylococcus aureus* enquanto Souza et al. (2008) encontraram valores de 20µL/mL ou 2% para *S. aureus* e para *Salmonella enterica*.

Silveira et al. (2012) encontraram valores de 22,9, 11,4 e 12,7mm de halos de inibição formados para as respectivas bactérias *S. aureus*, *E. aerogenes* e *P. aeruginosa* frente ao óleo essencial de orégano puro, sendo que no presente estudo verificou-se halo de 11,8mm para *E. aerogenes* na concentração de 1,25% e halo de 14,8mm para *P. aeruginosa* na concentração de 2,5%, considerando sensibilidade maior das bactérias em concentrações menores de óleo essencial de orégano.

Busatta et al. (2007), avaliando a atividade antimicrobiana do óleo essencial puro de orégano, encontraram tamanho dos halos de inibição de 26,8mm para *Staphylococcus aureus*, 19,5mm para *Klebsiella pneumoniae*, 29mm ± 0,08 para *Salmonella choleraesius* e não encontraram formação de halo para *Pseudomonas aeruginosa*.

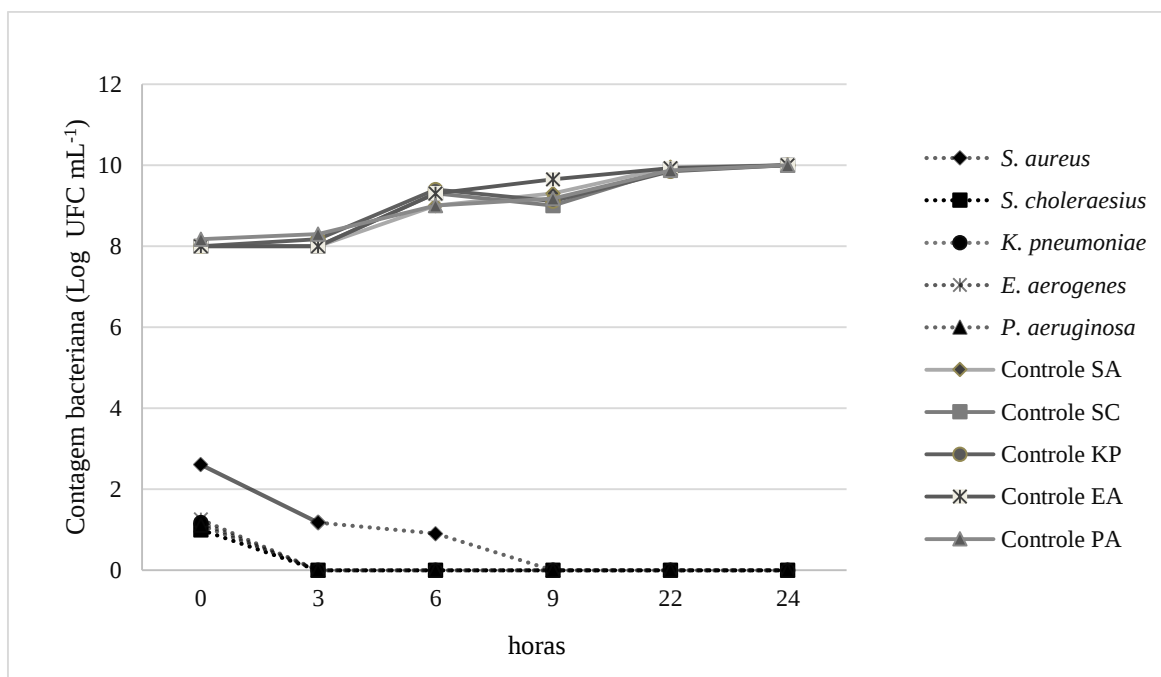
Essas diferenças de sensibilidade dos microrganismos ao mesmo tipo de óleo essencial podem ser explicadas pelo fato de todos os óleos serem diferentes um do outro, pois a composição do óleo depende da sua planta de obtenção, que sofre influências diretas da temperatura do ambiente, clima, qualidade do solo, velocidade do vento entre outros fatores.

Um aspecto interessante relacionado com a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é que o risco de desenvolvimento de resistência de microrganismos é muito baixo, porque estes produtos contêm uma mistura de diferentes substâncias antimicrobianas, que apresentam diferentes modos de ação (BAKKALI; AVERBECK; IDAOMAR, 2008; RAHMAN; KANG, 2009). Essa é uma característica benéfica dos produtos derivados das plantas em comparação com os agentes antimicrobianos sintéticos, como também da sua aplicação em produtos alimentícios em que podem fornecer melhor segurança alimentar e vida útil mais longa (SILVEIRA et al., 2012).

Os resultados da ação bactericida ou bacteriostática do óleo essencial de orégano em função do tempo demonstram que houve ação bactericida para todas as bactérias testadas na concentração de 0,312% (Figura 3) e para as bactérias *Salmonella choleraesius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae* na concentração de 0,156% (Figura 4).

No tempo 0 horas de contato, o óleo essencial de orégano já apresentou um efeito antibacteriano para as bactérias testadas, em que *S. aureus* apresentou log de 2,60 UFC mL⁻¹, enquanto seu controle apresentou 8log UFC mL⁻¹, e para as demais bactérias a redução foi maior, variando de contagens 0,69log UFC mL⁻¹ para a *P. aeruginosa* a 1,17log UFC mL⁻¹ para *E. aerogenes*, enquanto seus controles apresentaram também cerca de 8log UFC mL⁻¹.

Figura 3 – Contagens de log de UFC mL⁻¹ obtidos para cinco linhagens de bactérias testadas na concentração de 0,312% (v/v) de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em função do tempo



Fonte: Elaborada pela autora.

No tempo de 3 horas, as bactérias *S. choleraesius*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* e *P. aeruginosa* foram reduzidas a 0log UFC mL⁻¹ para a concentração de 0,312% enquanto seus controles apresentaram elevação para contagens acima de 8log UFC mL⁻¹.

A bactéria *S. aureus* apresentou contagens nos tempos 3 e 6 horas respectivamente de 1,17 e 0,90log UFC mL⁻¹, sendo reduzidas a 0log UFC mL⁻¹ no tempo de 9 horas de contato, e mantidas a essa contagem até as 24 horas de contato, demonstrando atividade bactericida para essa bactéria.

Todas as bactérias em todos tempos de contato (>0 horas) foram reduzidas a 0log UFC mL⁻¹, demonstrando o efeito bactericida para todas essas bactérias testadas na concentração de 0,312% de óleo essencial de orégano.

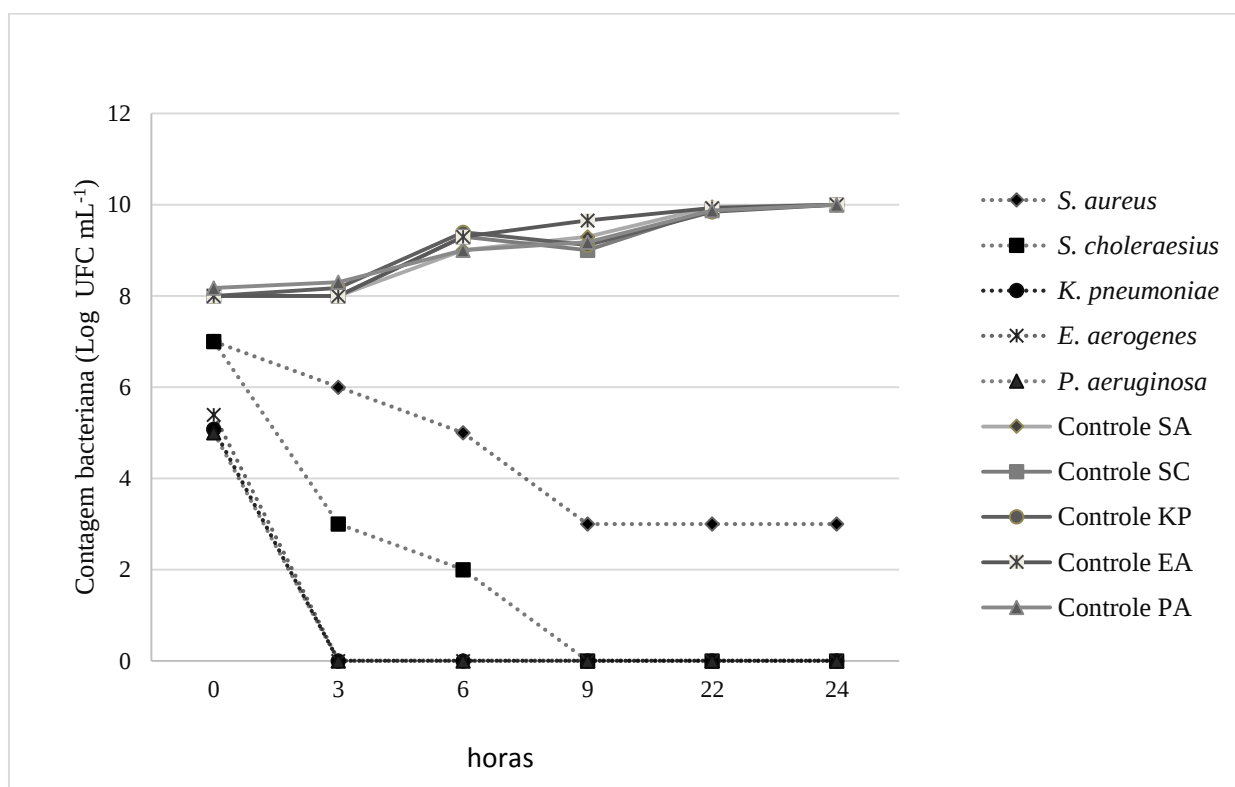
Souza et al. (2006) encontraram ação bacteriostática do óleo essencial de orégano contra a bactéria *S. aureus* com aproximadamente 4log UFC mL⁻¹ no tempo de 12 horas com acréscimo para aproximadamente 6,1log UFC mL⁻¹ no tempo de 24 horas, aplicando uma concentração de 20μL.mL⁻¹, valores diferentes dos encontrados no presente estudo, o qual, aplicando uma concentração bem menor 0,312%, encontrou redução de 0log UFC mL⁻¹ no tempo de 9 horas, e contagem de 3log UFC mL⁻¹ no tempo de 24 horas utilizando concentração de 0,156% (Figura 4).

Para concentração de 0,156% de orégano ocorreu efeito bacteriostático para a bactéria *S. aureus* com contagem de 3,0log UFC mL⁻¹ com 24 horas de contato, efeito bactericida para a bactéria *S. choleraesius* com 9 horas de contato e para as bactérias *E. aerogenes*, *P.*

aeruginosa e *Klebsiella pneumoniae* ocorreu efeito bactericida com 3 horas de contato. Magalhães et al. (2011) encontraram halos de inibição de 44 e 32mm da *S. aureus* respectivamente para concentração de 20 e 10µL mL⁻¹. Busatta et al. (2007), em estudo da ação antibacteriana do óleo puro de orégano, observaram sua efetividade contra *S. aureus*, *S. choleraesius* e *E. coli*.

No tempo de 3 horas, as bactérias *P. aeruginosa*, *E. aerogenes* e *K. pneumoniae* foram reduzidas de cerca de 5log UFC mL⁻¹ para 0log UFC mL⁻¹ e foram mantidas essas contagens até as 24 horas de contato apresentando efeito bactericida desse óleo na concentração de 0,156%.

Figura 4 – Contagens de log de UFC mL⁻¹ obtidos para cinco linhagens de bactérias testadas na concentração de 0,156% (v/v) de óleo essencial de Orégano (*Origanum vulgare* L.) em função do tempo



Fonte: Elaborada pela autora.

A *K. pneumoniae*, a *E. aerogenes* e a *P. aeruginosa* reduziram de aproximadamente 5,07log UFC mL⁻¹ para 0log UFC mL⁻¹ no tempo de 3 horas de contato, mantendo essa inibição até as 24 horas de contato. Souza et al. (2006) encontraram valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 4% para *K. pneumoniae* e maiores zonas de inibição do óleo essencial de orégano contra a *E. aerogenes*, com diâmetros de 36mm utilizando concentração de 4%.

A *S. choleraesius* só apresentou redução para 0log UFC mL⁻¹ no tempo de 9 horas, nos demais tempos (0, 3 e 6 horas) apresentou contagem variando de 7,01 a 2log UFC mL⁻¹. Magalhães et al. (2011), avaliando efeito do óleo essencial de orégano, encontraram halos de inibição de 45 e 35mm da *S. choleraesius* respectivamente para concentração de 2 e 1%, e Souza et al. (2006) encontraram concentração inibitória mínima para essa bactéria de 8%.

Segundo Bertini et al. (2005), uma possível explicação para as diferenças observadas quanto à sensibilidade bacteriana aos óleos, pode ser a existência de diferenças na estrutura da parede bacteriana, como por exemplo a presença de lipopolissacarídeo nas bactérias Gram-negativas e ausência nas Gram-positivas, o que permite ou não a entrada de substâncias na bactéria. Além disso, alguns óleos essenciais podem conter substâncias que penetram mais facilmente por essa camada lipídica, ocorrendo a sensibilidade ou não dessas bactérias a essas substâncias.

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial de alecrim pimenta apresentou como constituinte majoritário o timol (83,53%), o de capim-limão apresentou os constituintes α -Citral (56,17%) e β -Citral (35,77%) e o óleo essencial de orégano apresentou o Terpinen-4-ol (25,62%), γ -Terpineno (16,18%) e Carvacrol (12,84%) como compostos majoritários.

Os óleos essenciais de alecrim pimenta, capim-limão e orégano apresentaram atividade bactericida *in vitro* frente a várias cepas bacterianas de interesse em alimentos, mesmo em baixas concentrações, demonstrando um grande potencial para utilização em indústrias alimentícias, farmacêuticas, dentre outras.

A atividade bactericida dos óleos em concentrações relativamente baixas pode demonstrar uma técnica viável para uso desse óleo no aumento da vida de prateleira dos alimentos, como na conservação destes, sendo necessária a realização de estudos para verificar concentrações e condições ideais.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured Pub. Corp., 2007. 803 p.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação.** 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Instituto de Biociências), Botucatu. 2010.

BARROS, E. M. C.; ZAMBARBA, E. O.; HEINZMANN, B.; MALLMANN, C. A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia Alba* (Mill) N. E. Brown (verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

BERNARDI FILHO, L. **Produção de massa e rendimento de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em função de diferentes lâminas de irrigação.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente – SP, 2007.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Revista Infarma**, v. 17, n. 314, p. 80-93, 2005.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G.; LEMOS, T. L.; MATOS, F. J.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BUSATTA, C.; MOSSI, A. J.; RODRIGUES, M. R. A.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. Evaluation of origanum vulgare essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p.610-616, 2007.

CAROVIC-STANKO, K.; ORLIC, S.; POLITEO, O.; STRIKIC, F.; KOLAK, I.; MILOS, M.; SATOVIC, Z. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum*. **Química de Alimentos**, v. 119, n. 2, p. 196-201, 2010.

CASTILHO, P. C.; SAVLUCHINSKE-FEIO, S.; WEINHOLD, T. S.; GOUVEIA, S. C. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 552-558, 2012.

CASTRO, C. E.; RIBEIRO, J. M.; DINIZ, T. T.; ALMEIDA, A. C.; FERREIRA, L. C.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R. Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 3, p. 293-297, 2011.

CAVALCANTI, E. S. B., MORAIS, S. M.; LIMA, M. A.; SANTANA, E. W. Larvicidal activity of essential oils from brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 541-544, 2004.

CAVALCANTI, S. C. H.; NICULAU, E. S.; BLANK, A. F.; CAMARA, C. A.; ARAÚJO, I. N.; ALVES, P. B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against

two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 829-832, 2010.

CHAVES, F. C. M.; MATTANA, R. S.; GONÇALVES, M. A.; MATOS, F. J. A.; FREIRE, A. M. R.; BIZZO, H. R.; ANGELO, P. C. S.; MING, L. C.; BOTELHO, J. B. L. R. Teor de óleo essencial e seus constituintes em alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) de três regiões geográficas distintas. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 1462-1465, 2008.

CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; MITAKU, S.; NYCHAS, G.J.; HAROUTONIAN, S. Óleos Essenciais de Satureja, Origanum e Thymus Espécies: Composição química e Atividade antibacteriana contra patógenos de origem alimentar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 8261-8267, 2004.

COSTA, J. P. R.; ALMEIDA, A. C. A.; MARTINS, E. R.; RODRIGUES, M. N.; SANTOS, C. A.; MENEZES, I. R. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. **Biotemas**, v. 24, n. 4, p. 1-6, 2011.

FEITOSA, J. G. R.; ALVES, P. B.; CARDOSO, G. C.; RIBEIRO, A. O.; SANTOS, R. B.; BLANK, A. F. Avaliação antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia sidoides* realizada pelo método de difusão em placa. **Anais...** In: Sociedade Brasileira de Química (SBQ) -28a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas – MG, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUIMARÃES, A. G.; GOMES, S. V. F.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; FERREIRA, A. G.; BLANK, A. F.; SANTOS, A. D. C.; VIANA, M. D.; SILVA, G. H.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Phytochemical characterization and antinociceptive effect of *Lippia gracilis* Schauer. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 1, p. 428-434, 2012.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, R. M.; ZACARONI, A. B.; SANTOS, G. R. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: Composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 2, p. 267-275, 2014.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; FREIRE, J. M.; ANDRADE, M. A.; BATISTA, L. R.; SOUZA, S. P. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Anais...** XVI CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, Lavras –MG, 2007.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica & Clínica**. Guanabara Koogan, 8. ed., Rio de Janeiro, RJ. 2003.

LEAL, L. K. A. M.; OLIVEIRA, V. M.; ARARUANA, S. M.; MIRANDA, M. C. C.; OLIVEIRA, F. M. A. Análise do Timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (Alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Revista Brasileira de Farmacognosta**, v.12, suplemento, p. 66-67, 2002.

MAGALHÃES, R. M. F.; GERALDINE, R. M.; SILVEIRA, M. F. A; TORRES, M. C. L. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos veiculados por alimentos. **Anais...** In: 63º Reunião Anual da SBPC. Goiânia, GO, 2011.

MATASYOH, J. C.; WAGARA I. N.; NAKAVUMA J. L.; KIBURAI, A. M. Chemical composition of *Cymbopogon citrates* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 3, p. 138-142, 2011.

MECHKOVSKI, A.; AKERELE, C. O. **Quality, control methods for medicinal plant materials**. WHO/PHARM/92.559. Switzerlan: World Health Organization, 1992.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically**: Approved Standard M7.A6. 7..ed. Pennsylvania: Wayne, 2004.

OLADIMEJI, F.A. et al. Effect of autoxidation on the composition and antimicrobial activity of essential oil of *Lippia multiflora*. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v. 11, n. 2, p. 64-7, 2001.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 549- 53, 2010.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; PICCOLI, R. H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.

ONAWUNMI, G. O.; YISAK, W. A.; OGUNLANA, E. O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Journal of Ethnopharmacol**, v.12, n. 3, p. 279-286, 1984.

OZCAN, M.; ERKMEN, O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. **European Food Research and Technology**, v. 212, n. 6, p. 658-60, 2001.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLANB, M. B.; JORGE, A. O. C.; UENOD, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 326-328, 2004.

PERINI, S. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2013.

RAHMAN, T. A., KANG, S. C. In vitro control of foodborne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica*. **Food Chemistry**. v. 116, n. 3, p. 670–675, 2009.

SALGADO, A. P. S. **Efeito da luz na planta e no óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**. 2005. 49 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

- SANTOS, A; PADUAN, R. H.; GAZIN, Z. C.; JACOMASSI, E.; OLIVEIRA, P. S.; CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. L. R. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 436-441, 2009.
- SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A. J.; LOPES, C. A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n. 1-2, p. 243-9, 2000.
- SILVA, F.; FERREIRA, S.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 1479-1486, 2011.
- SILVA, F. F. M.; MOURA, L. F.; BARBOSA, P. T.; FERNANDES, A. B. D.; BERTINI, L. M.; ALVES, L. A. Análise da composição química do óleo essencial de capim santo (*Cymbopogon citratus*) obtido através de extrator por arraste com vapor d'água construído com matérias de fácil aquisição e baixo custo. **Holos**, v. 4, n. 30, p. 114-152, 2014.
- SILVA, J. P. L.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. G. M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. Supl.1, p. 136-141, 2010.
- SILVA, M. T. N.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; CUNHA, M. L. R. S.; FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 257-262, 2009.
- SILVEIRA, S. M.; CUNHA JUNIOR, A.; SCHEUERMANNI, G. N.; SECCHI, F. L.; VIEIRA, C.R.W. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1300-1306, 2012.
- SIMÕES, O. M. C.; SCHENKEL, R. P.; GOSMANN, G.; MELLO, P. C. J.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta medicamento**. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1999.
- SOARES, B. V.; DIAS, M. T. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.
- SOARES, R. A. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente à *Salmonella enterica* Enteritidis inoculada em carne moída bovina**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.
- SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 527-532. 2006.
- SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; BARBOSA FILHO, J. M.; MARQUES, M. O. M. Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of

Origanum vulgare L. (Lamiaceae) essential oil Interferência do aquecimento sobre a atividade antimicrobiana e composição química do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p.418-422, 2008.

TAJKARIMI M. M., IBRAHIM S. A., CLIVER D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v.21, n. 9, p.1199–1218, 2010.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O; SOUZA, E. L. S.; TRAVASSOS, A. E. R. Antibacterial property of spice essential oils on food contaminating bacteria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

VALERIANO, C; PICCOLI, R. H.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 2, p. 179-185, 2013.

CAPÍTULO III – Avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) no revestimento de hambúrguer bovino

RESUMO: Os óleos essenciais e suas atividades biológicas são bem documentadas, principalmente no que diz respeito às atividades microbiológicas. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) no revestimento de hambúrguer bovino e sua composição centesimal. Foram elaborados revestimentos com concentrações de óleo essencial de orégano de 0; 0,15; 0,3 e 0,6% de óleo essencial e aplicados ao hambúrguer bovino, além disso foi elaborado um controle sem revestimento. Os hambúrgueres foram armazenados por 8 dias. Foram realizadas análises microbiológicas nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 dias de armazenamento em temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 2$, e determinada a composição centesimal. O óleo essencial de orégano em revestimento comestível de hambúrguer bovino apresentou bom desempenho como antimicrobiano, mesmo na menor concentração utilizada (0,15%), para algumas bactérias de interesse na área de alimentos, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sem alterar a composição centesimal do alimento. Portanto, os resultados demonstram uma possibilidade da utilização do óleo essencial de orégano como antimicrobiano alternativo em sistemas de conservação de alimentos, mesmo quando associado a baixas concentrações.

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com o aumento da incidência de doenças de origem alimentar tem sido alvo de muitos debates por tornarem relevantes questões de saúde pública (OUSSALAH et al., 2007). Apesar de os avanços nas técnicas de saneamento e inspeção de serviços, a contaminação dos alimentos com microrganismos indesejáveis durante o processamento dos alimentos, industrialização, armazenamento, distribuição e comercialização é um risco potencial, tanto nos países em desenvolvimento, como nos desenvolvidos (RUNYORO et al., 2010). Como agentes patogênicos resistentes a conservantes clássicos têm sido detectados, agentes antimicrobianos alternativos precisam ser urgentemente encontrados (MILITELLO et al., 2011).

Estudos com óleos essenciais (óleos voláteis) têm atraído a atenção de ambos os círculos acadêmico e industrial, devido a um crescente interesse dos consumidores na redução mundial da composição de sal em alimentos (razões de saúde), e a necessidade de técnicas alternativas para garantir a qualidade e segurança dos alimentos perecíveis (BURT, 2004). Mendonça (2004) ressalta o interesse atual e a tendência do mercado em utilizar produtos naturais, entre eles destacam-se os agentes antimicrobianos naturais, extraídos de plantas como óleos essenciais.

Em geral, os óleos essenciais e suas atividades biológicas são bem documentadas, principalmente no que diz respeito às atividades microbiológicas. Diversos estudos têm sido realizados e relatados, avaliando suas atividades frente a diversos tipos de microrganismos,

principalmente deterioradores de alimentos, patógenos e fitopatógenos, revelando o potencial de determinados óleos essenciais no controle de tais microrganismos (BAKKALI; AVERBECK; IDAOMAR, 2008).

Compostos naturais presentes nas plantas e condimentos têm apresentado ação antimicrobiana contra diversos microrganismos patogênicos. Além disso, as pesquisas com plantas despertam interesse por conta da grande diversidade molecular dos produtos naturais, que é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, e possível ação antimicrobiana (ANDRADE, 2010). Dessa forma, essas propriedades apresentam potencialidade para uso na indústria alimentícia, onde os riscos de contaminação são grandes, demonstrando uma alternativa para o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de microrganismos causadores de grandes prejuízos às indústrias (PEREIRA et al., 2008).

O estudo da atividade antibacteriana do orégano (*Origanum vulgare*), do seus diferentes extratos e óleo essencial, tem sido executado sobre bactérias e fungos patogênicos e deteriorantes em alimentos. Vários estudos têm relatado a efetividade antibacteriana do óleo essencial de orégano sobre uma série de bactérias de interesse em alimentos, a citar *Salmonella enterica*, *Bacilos cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* e (SAHIN et al., 2004; SOUZA et al., 2006). Mediante o exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) no revestimento de hambúrguer bovino e sua composição centesimal.

2 METODOLOGIA

2.1 Extração do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)

Folhas secas de orégano foram obtidas do comércio local de Limoeiro do Norte – CE e levadas ao laboratório de Química de alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), Campus Limoeiro do Norte, para extração do óleo essencial (OE) utilizando o método hidrodestilação, que consiste em evaporar uma mistura de vapor-d'água e componentes voláteis presentes na matéria-prima vegetal, em aparelho denominado Clevenger (MECHKOVSKI; AKERELE, 1992). A água foi removida por decantação e o óleo essencial foi armazenado à temperatura de 4°C, protegido de luz para evitar a alteração da sua composição.

2.2 Ação antimicrobiana de óleo essencial de orégano em revestimento comestível de hambúrguer bovino frente à microbiota normal

2.2.1 Elaboração do revestimento comestível

Foram elaborados revestimentos com concentrações de óleo essencial de orégano de 0; 0,15, 0,3 e 0,6% de óleo essencial. O revestimento foi elaborado com gelatina comestível em pó, hidratando-se 20 gramas de gelatina e 1g de glicerol em 100g de água destilada estéril, permanecendo por uma hora em temperatura ambiente para ocorrer o intumescimento. O Tween 80 foi adicionado na proporção de 1% em relação à quantidade de gelatina. O óleo essencial e o Tween 80 foram adicionados na solução sob agitação e aquecida a uma temperatura de 60°C, durante 10 minutos, com o auxílio de um aquecedor-agitador. O revestimento sem o óleo foi realizado da mesma maneira dos demais, porém, sem adição do óleo essencial.

2.2.2 Elaboração do hambúrguer bovino

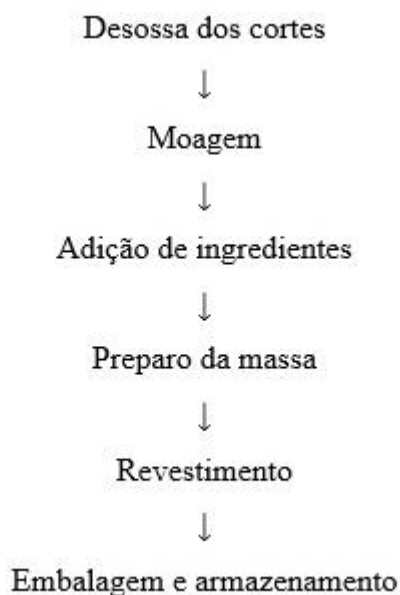
As carnes no ato de sua aquisição foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados e em seguida foram encaminhadas imediatamente a Planta Piloto de processamento de carnes e pescados do IFCE, Campus Limoeiro do Norte, CE, para o processamento dos hambúrgueres bovinos. Foi utilizado a formulação descrita na tabela 1 e o processamento do hambúrguer bovino seguiu o fluxograma descrito na figura 1. Após a elaboração, os hambúrgueres foram revestidos com o revestimento comestível à base de gelatina com adição de óleo essencial de orégano, sendo imersos por 10 segundos na solução, colocados para secar em temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 30 minutos até secagem do revestimento. Em seguida, foram embaladas em filme plástico transparente de PVC e colocados em bandejas de poliestireno, que também foram envoltas em papel filme plástico transparente de PVC, armazenadas em câmara fria de refrigeração à $4^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ para acompanhamento do armazenamento.

Tabela 1. Formulação do hambúrguer bovino

Ingredientes	Quantidades (%)
Carne bovina	67,0
Gordura suína	10,0
Alho desidratado	0,3
Pimenta	0,3
Sal	2,4
Farinha	10,0
Proteína texturizada de soja	10,0

Fonte: Elabora pela autora.

Figura 01 – Fluxograma do processamento do hambúrguer bovino



Fonte: Elabora pela autora.

2.2.3 Avaliação do efeito antimicrobiano do óleo essencial frente à microbiota normal do hambúrguer bovino revestido armazenado sob refrigeração

Os 5 tratamentos de hambúrgueres bovinos (sem revestimento, revestimento sem óleo essencial, revestimento com óleo essencial nas concentrações 0,15; 0,3 e 0,6%) foram armazenados em refrigeração à $4^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ por 8 dias (O tempo de armazenamento foi determinado a partir da Portaria CVS-6/99, que define 72 horas como vida útil de produtos cárneos para consumo) sendo realizadas análises microbiológicas nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 dias de armazenamento. Foram determinados Coliformes termotolerantes com confirmação de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e Bactérias Aeróbias Mesófilas adotando-se a metodologia descrita por Siqueira (1995).

2.3 Composição centesimal

Foram realizadas análises de umidade, cinzas, gordura e proteína, seguindo a metodologia descrita nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Foram analisados os cinco tratamentos dos hambúrgueres (sem revestimento, revestimento sem óleo essencial, revestimento com óleo essencial nas concentrações 0,15, 0,3, e 0,6%) realizadas em 3 repetições em triplicata.

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

Para a ação antimicrobiana de óleo essencial de orégano em revestimento comestível de hambúrguer bovino frente à microbiota normal utilizou-se teste fatorial 5 x 5, em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os 25 tratamentos consistiram de combinações de cinco revestimentos diferentes (sem revestimento, revestimento sem óleo essencial, revestimento com óleo essencial de orégano de concentrações de 0; 0,15; 0,3 e 0,6%) em cinco tempos de armazenamento (0, 2, 4, 6 e 8 dias). Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Os valores obtidos da análise físico-química foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Para isso foi utilizado o software estatístico ASSISTAT 7.7 versão beta (SILVA; AZEVEDO, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ação antimicrobiana de óleo essencial de orégano em revestimento comestível de hambúrguer bovino frente à microbiota normal

Em alimentos, óleos essenciais podem migrar para a estrutura lipídica do alimento, reduzindo assim a sua concentração na fase aquosa e, conseqüentemente, o seu contato com microrganismos localizados nas partes hidrofílicas do produto. Essas interferências requerem concentrações mais altas de óleo essencial no alimento, do que os valores encontrados pela técnica *in vitro* para uma boa atividade antisséptica nos alimentos. Adicionalmente, os componentes funcionais de óleos essenciais também são possíveis de gerar sabores indesejáveis e cheiros desagradáveis e modificar a textura do alimento (ALARCON, 2007).

3.1.1 Bactérias Aeróbias Mesófilas

Para os resultados da contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas (BAM) (Tabela 2), verificou-se que o número de UFC g⁻¹ variou bastante durante o período de armazenamento de 8 dias para todas as concentrações de óleo essencial de *O. vulgare* L. utilizadas no revestimento de hambúrguer bovino. No tempo 0, nenhum tratamento apresentou diferença significativa, com contagens variando de 5,65 a 6,12 log UFC g⁻¹.

Tabela 2 - Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas em hambúrguer bovino revestido com diferentes concentrações de óleo essencial de *O. vulgare* L., durante 8 dias de armazenamento sob refrigeração

Bactérias Aeróbias Mesófilas (log₁₀ UFC g⁻¹)					
Concentração (%)	Tempo de armazenamento (dias)				
	T0	T2	T4	T6	T8
Controle	6,12 aA	4,70 aC	6,21 aA	5,59 aB	6,18 aA
0,00	5,65 aB	5,16 aC	6,12 aA	5,99 aA	6,14 aA
0,15	5,95 aA	3,24 bC	6,1 aA	5,17 bB	5,78 bA
0,30	5,90 aA	4,82 aB	5,5 bA	5,87 aA	5,80 bA
0,60	5,86 aA	4,90 aB	5,76 bA	5,76 aA	5,58 bA

*Médias seguidas da mesma letra (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste de Scott knott ao nível de 5% de significância.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para as contagens de aeróbios mesófilos ocorreu uma redução no tempo 2 para todos os tratamentos. No tempo 4 não ocorreu diferença significativa entre as amostras Controle, 0,00 e 0,15% porém diferiram dos tratamentos 0,3 e 0,6% que apresentaram menor contagem.

No final do armazenamento (8 dias) os tratamentos contendo óleo essencial de orégano apresentaram diferença significativa do controle e 0%, com valores acima de 6log UFC g⁻¹ enquanto as amostras com óleo essencial apresentaram valores variando entre 5,58 a 5,80log UFC g⁻¹. No final do armazenamento, os tratamentos com óleo essencial de orégano em seu revestimento apresentaram redução do seu crescimento inicial (tempo 0), mesmo que não significativa, enquanto o controle e o 0% apresentaram elevação do seu log UFC g⁻¹ inicial.

De modo geral o óleo essencial de orégano no revestimento do hambúrguer bovino não apresenta redução ou atividade bactericida contra as bactérias aeróbias mesófilas totais, porém é capaz de manter seus valores iniciais. A legislação não estabelece padrões de contagens dessas bactérias, visto que a contagem total dessas bactérias não indica necessariamente ocorrência de patógenos. Porém as bactérias aeróbias mesófilas são usadas como indicadores de qualidade microbiológica e de acordo com Cardoso et al. (2005) a presença destas em grande número indica matéria-prima excessivamente contaminada, higiene insuficiente, limpeza e desinfecção das superfícies inadequadas e condições impróprias de tempo e temperatura durante a produção e a conservação dos alimentos.

Barbosa (2010), avaliando efeito antimicrobiano de óleos essenciais sobre a microbiota da carne, verificou que os óleos essenciais testados, inclusive o de orégano, foram ineficazes

sobre os microrganismos mesófilos até a concentração máxima testada de 2,2%, enquanto para os psicrotróficos, os OEs mais eficientes foram o de orégano e tomilho.

Em estudo realizado por Busatta et al. (2007), foram encontrados valores de 4,28log UFC/g de aeróbios mesófilos para tratamento controle, 3,26, 3,30 e 3,26log UFC/g para os tratamentos com concentrações de 0,69mg/g; 1,725mg/g; 3,45mg/g de óleo referentes à CIM mais alta, 2 vezes a CIM mais alta e 5 vezes a CIM mais alta respectivamente, correspondentes a 20 dias de armazenamento de linguiça frescal. Ao longo do armazenamento, ele observou que a única concentração que apresentou ação bactericida foi a correspondente a 5 vezes o maior MIC.

3.1.2 Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

Os resultados de coliformes termotolerantes em hambúrguer bovino com e sem revestimento adicionado de óleo essencial de orégano apresentaram diferença significativa entre si como também ao longo do armazenamento (Tabela 3). Os tratamentos controles (Controle e 0%) apresentaram inicialmente uma contagem $2,4 \times 10$ e $9,6 \times 10$ NMP g⁻¹ (Número Mais Provável) de coliformes termotolerantes diferindo significativamente dos demais no que diz respeito ao tempo de armazenamento, em que no final do armazenamento (8º dia) apresentou contagens de 5,0 NMP g⁻¹.

Tabela 3 - Contagem de Coliformes termotolerantes em hambúrguer bovino revestido com diferentes concentrações de óleo essencial de *O. vulgare* L., durante 8 dias de armazenamento sob refrigeração

Coliformes termotolerantes (NMP g ⁻¹)					
Concentração (%)	Tempo de armazenamento (dias)				
	T0	T2	T4	T6	T8
Controle	2,4 x 10 cA	4,5 aC	1,7 x 10 ² aB	5,0 aC	5,0 aC
0	9,6 x 10 aA	5,0 aB	5,0 Bb	5,0 aB	5,0 aB
0,15	4,6 x 10 bA	4,5 aB	1,5 Cb	1,5 bB	1,5 bB
0,3	2,2 x 10 cA	4,5 aB	1,5 cB	1,5 bB	1,5 bB
0,6	2,2 x 10 cA	4,5 aB	1,5 Cb	1,5 bB	1,5 bB

*Médias seguidas da mesma letra (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste de Scott knott ao nível de 5% de significância.

Fonte: Elaborada pela autora.

No segundo dia de armazenamento, todos os tratamentos reduziram suas contagens expressivamente, e não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$). No quarto dia de

armazenamento, os tratamentos que possuíam óleo essencial em seu revestimento foram reduzidos a valores mínimos de $1,5\text{NMP g}^{-1}$ e sendo mantidos até o final do armazenamento, enquanto as amostras controles (C e 0%) apresentaram contagens respectivas de $1,7 \times 10^2$ e $5,0\text{NMP g}^{-1}$ no tempo 4 e 5NMP g^{-1} no último dia de armazenamento, diferindo significativamente dos tratamentos tratados com óleo essencial em seu revestimento. O óleo essencial de orégano no revestimento do hambúrguer se caracteriza como bactericida para Coliformes termotolerantes, pois desde o 4º dia de armazenamento valores foram reduzidos a mínimos, enquanto os controles apresentaram Coliformes termotolerantes até o final do armazenamento (8 dias).

A legislação brasileira estabelece contagem máxima de $5 \times 10^3 \text{ NMP g}^{-1}$ para coliformes termotolerantes em produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados (BRASIL, 2001), estando todas as amostras de hambúrguer bovina com e sem óleo essencial de orégano dentro dos padrões estabelecidos pela legislação em todos os tempos de armazenamento.

A presença de coliformes termotolerantes em alimentos comercializados tem sido objeto de estudo por diversos autores no Brasil, como os realizados por Salvatori, Bessa e Cardoso (2003), que identificaram a presença dessas bactérias em embutidos frescos; e por Silva, Cavalli e Oliveira (2006) em amostras de queijos, hortaliças e linguiças. Essas bactérias isoladas nesses alimentos, além de caracterizarem produtos impróprios para o consumo, podem provocar surtos de intoxicação alimentar. Nos Estados Unidos, Rangel et al. (2005) observaram que dos 350 surtos de *E. coli* O157 ocorridos entre 1982 e 2002, a transmissão via alimentar foi responsável por 52% desses surtos ocorridos em comunidades, restaurantes, redes de estabelecimentos comerciais de alimentos e escolas. Os produtos cárneos foram os alimentos mais envolvidos naqueles surtos.

Na verificação da ocorrência da bactéria *E. coli* no hambúrguer bovino com revestimento adicionado de óleo essencial de orégano, observou-se que ele foi eficiente na inibição da bactéria durante o armazenamento (Tabela 4). A presença da bactéria foi confirmada para todos os tratamentos no tempo 0 e 2 dias, porém, a partir do 4º dia, verificou-se que os tratamentos com óleo essencial inibiram a presença bacteriológica, mantendo sua eficácia até o final do armazenamento (8º dia). Os tratamentos controle e 0% constataram presença da bactéria *Escherichia coli* em todos os tempos de armazenamento.

Tabela 4 – Incidência da *Escherichia coli* em hambúrguer bovino revestido com diferentes concentrações de óleo essencial de *O. vulgare* L., durante 8 dias de armazenamento sob refrigeração

Confirmação de <i>Escherichia coli</i> (Presença/Ausência)					
Concentração (%)	Tempo de armazenamento (dias)				
	T0	T2	T4	T6	T8
Controle	Presença	Presença	Presença	Presença	Presença
0	Presença	Presença	Presença	Presença	Presença
0,15	Presença	Presença	Ausência	Ausência	Ausência
0,3	Presença	Presença	Ausência	Ausência	Ausência
0,6	Presença	Presença	Ausência	Ausência	Ausência

Fonte: Elaborada pela autora.

Em estudo realizado por Souza et al. (2006), depois de 24 horas de exposição da bactéria com o óleo essencial na concentração de 4% de *O. vulgare* L., os ensaios tratados apresentaram contagens redor 10^6 UFC/mL (6log UFC/mL) (ao lado do inóculo inicial) enquanto os ensaios de controle apresentaram contagens em torno de 10^9 UFC/mL. Estes resultados caracterizam uma propriedade bacteriostática de óleo essencial *O. vulgare* em todas as bactérias testadas e este efeito foi bem marcado com *E. coli* depois 12 horas de exposição. A propriedade bacteriostática é caracterizada quando alguns compostos são capazes de causar a falha em bactérias para crescer em caldo de carne, mas são cultivadas quando o caldo é revestido sobre um ágar adequado (BURT, 2004).

Castilho et al. (2012) verificaram que *E. coli* foi inibida por óleo essencial de orégano e por extratos de *n-hexano*. Os constituintes majoritários timol e carvacrol mostraram atividade bactericida para 100 mg/mL.

Busatta et al. (2007) verificaram um aumento de células bacterianas de *E. coli* nas amostras controle de linguiça que não tinham em sua formulação óleo essencial, chegando a $5,04 \log \text{NMP g}^{-1}$. Para as amostras tratadas com o óleo essencial, não foi detectado aumento nas células para todas as concentrações, o que permite afirmar que o óleo agiu eficientemente. Este efeito inibitório é devido provavelmente à ação do composto principal terpinen-4-ol, que se acredita funcionar inibindo a inalação oxidativa, induzindo a deformação da membrana (dilatação), com consequente alteração na permeabilidade da membrana (COX et al. 2000).

3.1.3 *Staphylococcus aureus*

Na verificação da ocorrência de *Staphylococcus aureus* no hambúrguer bovino com revestimento de óleo essencial de orégano, observou-se que no tempo 0 todos os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si variando de 3,87 a 4,43 log 10 UFC g⁻¹ (Tabela 5), porém, a partir do segundo dia de armazenamento, os tratamentos controle e 0% apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) dos que possuíam óleo essencial em seu revestimento, e essa diferença foi mantida até o final do armazenamento (8º dia).

Para todos os tratamentos que possuíam óleo essencial em seu revestimento, a contagem inicial (tempo 0) foi acima de 4log UFC g⁻¹, e ao final do armazenamento (8º dia) variaram de 1,81 a 1,97log UFC g⁻¹, enquanto as amostras controles (C e 0%) apresentaram no final do armazenamento contagens de 3,37 e 3,27 respectivamente, demonstrando ação antimicrobiana do óleo essencial de orégano frente à bactéria *S. aureus*.

Castilho et al. (2012) relatam que a atividade antibacteriana do óleo essencial de orégano contra o agente patogênico humano, *S. aureus*, parece estar relacionada com a presença de timol e carvacrol, que são substâncias naturais presente no óleo essencial de orégano.

Tabela 5 - Contagem de *Staphylococcus aureus* em hambúrguer bovino revestido com diferentes concentrações de óleo essencial de *O. vulgare* L., durante 8 dias de armazenamento sob refrigeração

<i>Staphylococcus aureus</i> (log 10 UFC g ⁻¹)*					
Concentração (%)	Tempo de armazenamento (dias)				
	T0	T2	T4	T6	T8
Controle	3,87 aA	3,30 aA	3,70 aA	3,29 aA	3,37 aA
0	4,39 aA	3,94 aA	3,12 aB	3,01 aB	3,27 aB
0,15	4,07 aA	2,77 bB	2,41 bB	2,07 bB	1,97 bB
0,3	4,43 aA	2,70 bB	2,44 bB	1,39 bC	1,81 bC
0,6	4,27 aA	2,69 bB	2,42 bB	1,15 bC	1,83 bC

*Médias seguidas da mesma letra (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste de Scott knott ao nível de 5% de significância.

Fonte: Elaborada pela autora.

Algumas pesquisas indicam que a relação da estrutura da célula e a sensibilidade microbiana aos óleos essenciais ainda não está bem estabelecida, ainda assim, propõe que uma menor ou maior atividade inibidora de óleos essenciais em bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas podem estar relacionadas com a particular eficácia dos componentes do óleo essencial

em diferentes microrganismos, ao invés da estrutura da célula microbiana (DORMAN; DEANS, 2000).

A legislação brasileira estabelece contagem máxima de 5×10^3 de UFC/g ou 3,70log UFC/g de estafilococos coagulase positiva em produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados (BRASIL, 2001), estando, assim, todos os tratamentos de hambúrgueres, ao final do armazenamento (8º dia), aptos ao consumo, apesar de os tratamentos controle e 0% estarem com contagens bem próximas ao limite.

Souza et al. (2008) relatam que o óleo essencial mantido à temperatura ambiente e exposto a diferentes tratamentos térmicos (60°C, 80°C, 100°C e 120°C) demonstrou efeito antimicrobiano contra o *S. aureus*, outras bactérias e leveduras.

A manipulação inadequada dos alimentos é uma das maiores causas da contaminação destes por microrganismos patogênicos. O *Staphylococcus aureus* tem como habitat natural as vias aéreas superiores, cabelos, pele e mãos dos seres humanos, isto faz com que o manipulador seja uma fonte de contaminação. A contaminação pode ocorrer de várias formas, seja na produção, a qual requer inúmeras etapas, podendo ocorrer contaminação e proliferação do microrganismo durante o preparo, a manufatura e até mesmo no estoque do produto, visto que muitos refrigeradores são incorretamente ajustados, operando acima da temperatura recomendada, o que pode proporcionar o crescimento de microrganismos patogênicos (SILVA et al., 2013).

3.1.4 Salmonella

Para ocorrência de *Salmonella* constata-se ausência para todas as concentrações (Controle; 0; 0,15; 0,3; 0,6%) em todos os tempos de armazenamento (0, 2, 4, 6, 8 dias). A legislação estabelece ausência de *Salmonella* em 25g do alimento para produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados (BRASIL, 2001), estado assim todas as amostras analisadas dentro dos padrões da legislação. Em estudo realizado por Souza et al. (2006), foi verificado efeito antibacteriano do óleo essencial de *O. vulgare* em *Salmonella enterica* (clássico patógeno Gram-negativo) e outras bactérias de importância para alimentos.

Souza et al. (2008) relatam que o óleo essencial de orégano, mantido à temperatura ambiente e exposto a diferentes tratamentos térmicos (60 °C, 80 °C, 100 °C e 120 °C), demonstrou efeito antimicrobiano contra o *Salmonella enterica* e outras bactérias e leveduras.

Soares (2010), verificando ação antimicrobiana do óleo essencial de orégano em carne moída frente à *Salmonella enterica*, observou que as concentrações 0,39% e 0,78%, em um

primeiro momento tiveram efeito bactericida, e posteriormente efeito bacteriostático. Já para concentrações maiores (1,56% e 3,125%), verificou-se acentuado efeito bacteriostático, chegando a total eliminação da *Salmonella* na carne.

Os resultados referentes a não interferência das temperaturas de aquecimento sobre as propriedades antimicrobianas e composição química de óleo essencial de *O. vulgare* apoiam a sua possível utilização concomitante a altas temperaturas em procedimentos de conservação de alimentos (SOUZA et al., 2008).

3.2 Composição centesimal do hambúrguer revestido

Os hambúrgueres com revestimento contendo óleo essencial não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$) e do controle e 0% para todos os atributos analisados (Tabela 6). Para proteína os valores variaram de 18,86 (C) a 21,93% (0,15%), estando todos dentro dos atributos da legislação que estabelece percentual mínimo de 15% de proteína para hambúrguer (BRASIL, 2000). Valores semelhantes foram citados por Barbosa (2010), de 19,2% de proteína para hambúrguer antes de aplicar óleo essencial de orégano.

Nos alimentos, além da função nutricional, as proteínas têm propriedades organolépticas e de textura, sendo as de origem animal consideradas como proteínas de Alto Valor Biológico (FLORENCIO FILHO et al., 2013). Resultado superior foi encontrado por Almeida (2011), que obteve média de 23,83% de proteína em hambúrguer caprino com adição de 2% de farinha de aveia.

Tabela 6 - Composição Centesimal de hambúrguer bovino revestido com diferentes concentrações de óleo essencial de *O. vulgare* L.

Concentração (%)	Proteína	Umidade	Gordura	Cinzas
Controle	18,86 a	63,77 a	2,64 a	2,71 a
0	21,11 a	65,08 a	2,78 a	2,32 a
0,15	21,93 a	65,02 a	1,99 a	2,61 a
0,3	21,74 a	65,47 a	2,16 a	2,40 a
0,6	20,92 a	64,42 a	2,54 a	2,37 a

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Fonte: Elaborada pela autora.

A água é considerada adulterante universal dos alimentos, por isso sua determinação é de grande importância. A umidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade,

qualidade e composição e pode afetar estocagem, embalagem e processamento (BRASIL; GUIMARÃES, 1998; OLIVEIRA et al., 1999). Por isso a quantidade de umidade irá influenciar de forma direta na qualidade do alimento, pois alimentos com alta umidade irão se deteriorar mais rapidamente do que os que possuem baixa umidade.

A umidade dos hambúrgueres variou de 63,77% (Controle) a 65,48% (0,3%), mas não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$), demonstrando que o revestimento e o óleo não influenciam na umidade do produto cárneo. Barbosa (2010) encontrou valor superior ao encontrado, de 75,6% de umidade para hambúrguer bovino antes da aplicação de óleos essenciais. Apesar da legislação brasileira não estabelecer limite de umidade para hambúrguer, Vieira et al. (2007) ressaltam que a umidade é importante para a suculência e palatabilidade da carne como também dos produtos cárneos e essa umidade não pode ser em excesso, isso porque quanto maior for a umidade de um produto, maior será seu risco de contaminação, pois aumentará a quantidade de água livre disponível para as reações bioquímicas e físico-químicas necessárias para a multiplicação de microrganismos e formação de toxinas.

Os hambúrgueres apresentaram quantidade de gordura variando de 1,99 a 2,78%, não apresentando diferença significativa entre si ($p < 0,05$) (Tabela 6). Esse teor encontra-se dentro dos padrões da legislação, que estabelece máximo de 23% de gordura (BRASIL, 2000). Mesmo com adição de óleos essenciais, a gordura do produto apresentou-se com valores bem abaixo do máximo da legislação, o que melhora o aspecto de qualidade nutricional quanto ao requisito de alimento saudável.

Segundo Seabra et al. (2002), para a indústria moderna a redução de 10% de gordura em um produto é um desafio, já que este deve ter boa aceitação no mercado e concorrer com os tradicionais que possuem aproximadamente 22% de gordura, pois existe uma preferência dos consumidores pela gordura, mesmo sabendo dos riscos do consumo excessivo, isso porque a gordura confere características a carne como: suculência, sabor e aroma.

Médias variando de 2,32 a 2,71 de cinzas foram encontradas para os hambúrgueres bovinos (Tabela 6), e não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$), demonstrando que o óleo essencial de orégano também não influenciou esse atributo. A legislação brasileira não estabelece padrões de cinzas para hambúrguer. Valores aproximados foram encontrados por Almeida (2011), 2,93% de material mineral em hambúrgueres caprinos adicionados de 2% de farinha de aveia; e por Barbosa (2010), que obteve valores de 2% para hambúrguer bovino. As cinzas e o conteúdo mineral em alimentos não podem ser sintetizados pelo organismo e, por isso, devem ser obtidos através da alimentação, pois desempenham diversas funções,

facilitando a transferência de compostos pelas membranas celulares e a composição de tecidos orgânicos (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial de orégano em revestimento comestível de hambúrguer bovino apresenta bom desempenho como antimicrobiano, mesmo na menor concentração utilizada, para algumas bactérias de interesse na área de alimentos, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sem alterar a composição centesimal do alimento.

Portanto, os resultados demonstram uma possibilidade da utilização do óleo essencial de orégano como antimicrobiano alternativo em sistemas de conservação de alimentos, mesmo quando associado a baixas concentrações.

REFERÊNCIAS

- ALARCÓN, M. M. V. **Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em queijo ricota**. 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Microbiologia Agrícola) - Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2007.
- ALMEIDA, R. S. **Processamento de hambúrguer de carne caprina adicionados com diferentes níveis de farinha de aveia**. Itapetinga, 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2011.
- ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* e *Zingiber officinale*: caracterização química, atividade antioxidante e antibacteriana**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2010.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista (Instituto de Biociências), Botucatu, 2010.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003. 238 p.
- BRASIL, I. M.; GUIMARÃES, A. C. L. **Química e bioquímica do processamento**. Brasília: ABEAS, 1998 (Curso de Tecnologia em Processamento de Suco e Polpa Tropicais - Módulo 5).
- BRASIL. Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000. Dispõe sobre os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de hambúrguer. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília-DF**, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 7–E, 2001.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BUSATTA, C.; MOSSI, A. J.; RODRIGUES, M. R. A.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. Evaluation of *origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 610-616, 2007.

CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; TESSARI, E. N. C.; BALDASSI, L.; PINEIRO, E. S. Pesquisa de *Salmonella* spp coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 128, p. 144-150, 2005.

CASTILHO, P. C.; SAVLUCHINSKE-FEIO, S.; WEINHOLD, T. S.; GOUVEIA, S. C. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 552-558, 2012.

COX, S. D.; MANN, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTN, J. R.; WYLLIC, S. G. O modo de ação antimicrobiana do essencial óleo de *Melaleuca alternifolia* (óleo da árvore do chá). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 170-175, 2000.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

FLORENCIO FILHO, D.; LIRA, A. P.; MACEDO, M. S.; BARRETO, P. K. C.; FIGUEIREDO, A. A.; DAMASIO, J. M. A.; SIMIONATO, J. I.; SANTANA, D. A. Comparação físico-química de farinhas feitas da base e da bainha da haste de palmito de pupunha. In: 53º Congresso Brasileiro de Química. **Anais...** Rio de Janeiro – RJ, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

MECHKOVSKI, A.; AKERELE, C. O. **Quality, control methods for medicinal plant materials**. WHO/PHARM/92.559. Switzerland: World Health Organization, 1992.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 72 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MILITELLO, M.; SETTANNI, L.; ALEO, A.; MAMMINA, C.; MOSCHETTI, G.; GIAMMANCO, G. M.; BLÀZQUEZ, M. A.; CARRUBBA, A. Chemical composition and antibacterial potential of *Artemisia arborescens* L. essential oil. **Current Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1274-1281, 2011.

OLIVEIRA, M. E. B.; BASTOS, M. S. R.; FEITOSA, T. Avaliação de atributos de qualidade físico-química de polpa congelada de acerola, caju e caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 326-332, 1999.

OUSSALAH, M.; CAILLETA, S.; SAUCIERC, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PEREIRA, A.A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 887-93, 2008.

RANGEL J. M.; SPARLING P. H.; Crowe, C.; GRIFFIN P. M.; SWERDLOW, D. L.; Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 4, p. 603-609, 2005.

RUNYORO, D.; NGASSAPAA, O.; VAGIONASB, K.; ALIGIANNISB, N.; GRAIKOUB, K.; CHINOU, I. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 311-316, 2010.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M. *In vitro* antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3309–3312, 2004.

SALVATORI R. U.; BESSA, M. C.; CARDOSO, M. R. I. Qualidade sanitária de embutidos coletados no mercado público central de Porto Alegre – RS. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 771-774, 2003.

SEABRA, L. M. J.; ZAPATA, J. F. F.; NOGUEIRA, C. M.; DANTAS, M. A.; ALMEIDA, R. B. Fécula de mandioca e farinha de aveia como substitutos de gordura na formulação de hambúrguer de carne ovina. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 244-248, 2002.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 2, p. 352-9, 2006.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. **ASSISTAT 7.7 Versão Beta** - Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009 (Atualizado, 2014).

SILVA, M. E. T.; MALAGUETA JÚNIOR, F. G.; MONTE, A. L. S.; FREITAS, R. N. S.; FERREIRA, E. O.; FRANCA, L. G.; HOLANDA, N. V.; SILVA, D. E. T. Avaliação microbiológica da linguiça caprina com adição de 5% de fibras. **Higiene Alimentar**, v. 27, p. 921-925, 2013.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Brasília: EMBRAPA-SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1995.

SOARES, R. A. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente à *Salmonella enterica* Enteritidis inoculada em carne moída bovina**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum Vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, n. 4, p.527-532, 2006.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; BARBOSA FILHO, J. M.; MARQUES, M. O. M. Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil Interferência do aquecimento sobre a atividade antimicrobiana e composição química do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n. 2, p.418-422, 2008.

VIEIRA, J. O.; BRESSAN, M. C.; FARIA, P. B.; FERREIRA, M. W.; FERRÃO, S. P. B.; SOUZA, X. R. Efeito dos métodos de cocção na composição centesimal e colesterol do peito de frangos de diferentes linhagens. **Revista Ciência Agrotécnica**, v. 31, n. 1, p. 164-170, 2007.

CAPÍTULO IV – Análise sensorial de hambúrguer bovino e avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais frente ao *Staphylococcus aureus*

RESUMO: As propriedades antimicrobianas de óleos essenciais têm despertado interesse pela possibilidade de constituírem uma alternativa para as exigências dos consumidores quanto à utilização de aditivos naturais em alimentos. Objetivou-se com esse trabalho avaliar a ação antimicrobiana de óleos essenciais de orégano, capim-limão e mix (mistura dos dois) frente à *Staphylococcus aureus* inoculada em hambúrguer bovino refrigerado, e análise sensorial. A bactéria foi inoculada em hambúrguer bovino e os óleos essenciais de orégano e capim-limão foram adicionados na concentração de 0,312, 0,625, 1,25 e 2,5% e o mix nas concentrações de 0,312 e 0,625%. Os hambúrgueres foram armazenados em temperatura de refrigeração e avaliados nos tempos 0, 1, 2, 4 e 6 dias. Foi realizada também análise sensorial de hambúrguer bovino com concentrações de 0,312% dos óleos essenciais. Os óleos essenciais apresentaram ação antimicrobiana contra a bactéria durante o armazenamento mesmo na menor concentração utilizada e apresentaram aceitação sensorial para todos os atributos avaliados. Os resultados demonstram uma possibilidade da utilização dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L., *Cymbopogon citratus* e uma mistura dos dois (Mix) como composto antimicrobiano alternativo em sistemas de conservação de alimentos, mesmo quando associado a baixas concentrações.

1 INTRODUÇÃO

A carne bovina e seus derivados é amplamente consumida e por isso é de extrema importância oferecer ao consumidor um produto com qualidade microbiológica adequada, já que este pode ser responsável por ocasionar doenças para a população que dela faz uso (MARCHI, 2006). Vários estudos e buscas por técnicas alternativas para garantir a qualidade e segurança dos alimentos perecíveis têm sido motivo de debates em centros acadêmicos e industriais, devido a um crescente interesse dos consumidores na redução mundial da quantidade de sal em alimentos (BURT, 2004).

As propriedades antimicrobianas de óleos essenciais têm despertado interesse pela possibilidade de constituírem uma alternativa para as exigências dos consumidores quanto à utilização de aditivos naturais em alimentos (KOTZEKIDOU et al. 2008). Entretanto, o uso para tal finalidade implica em concentrações maiores do que aquelas usadas para o realce de aroma e sabor dos alimentos, sendo necessário um equilíbrio entre as concentrações para que o óleo exerça, ao mesmo tempo, ação antimicrobiana e aromática (SOARES, 2010).

Os óleos essenciais possuem propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas, portanto, podem ser usados em alimentos como agente natural para estender a vida de prateleira de alimentos (BURT, 2004; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

O grupo dos *Staphylococcus aureus* são um dos patógenos mais importantes em alimentos, uma vez que sua presença em alimentos processados indica deficiência no

processamento ou condições higiênicas inadequadas do processo; e suas enterotoxinas, uma vez presentes no alimento, poderão causar intoxicação alimentar (SILVA; GANDRA, 2004). Além disso, a toxina estafilocócica, uma vez produzida, é termoestável e não pode ser inativada por métodos de cocção padrão (FORSYTHE, 2002) nem mesmo por 16 pasteurizações UHT (SILVA; GANDRA, 2004). Mediante o exposto, objetivou-se com esse trabalho avaliar a ação antimicrobiana de óleos essenciais de orégano, capim-limão e mix (mistura dos dois) frente à bactéria *Staphylococcus aureus* inoculada em hambúrguer bovino refrigerado, e avaliar sua aceitação sensorial.

2 METODOLOGIA

2.1 Plantas e obtenção dos respectivos óleos

Foram extraídos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*). O capim-limão foi obtido de produções de pequena escala em hortas particulares da região e as folhas secas em estufa à 60°C por aproximadamente 6 horas, já as folhas secas de orégano foram obtidas do comércio local de Limoeiro do Norte – CE. Todos os óleos foram extraídos no laboratório de Química de alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), *Campus* Limoeiro do Norte, utilizando o método hidrodestilação, que consiste em evaporar uma mistura de vapor-d'água e componentes voláteis presentes na matéria-prima vegetal, em aparelho denominado Clevenger (MECHKOVSKI; AKERELE, 1992). A água foi removida por decantação e os óleos essenciais foram armazenados à temperatura de 4°C, protegidos da luz para evitar a alteração da sua composição.

2.2 Avaliação do efeito antimicrobiano dos óleos essenciais frente à *Staphylococcus aureus* em hambúrguer bovino

2.2.1 Modelo alimentar e preparo das amostras

Para verificação do efeito antimicrobiano dos óleos essenciais no sistema alimentar, foi utilizado a cepa da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Os óleos essenciais utilizados foram de orégano, capim-limão e foi feito um mix (orégano + capim-limão 1:1 v/v). Foram utilizadas 4 concentrações (0,312; 0,625; 1,250 e 2,500 % v/p) para os óleos de orégano e capim-limão, e 2 concentrações para o Mix (0,312 e 0,625 % v/p), além disso foi realizada uma formulação com 0% de óleo, sendo elaboradas, portanto, 11 formulações de hambúrguer bovino (Figura 1).

O corte bovino empregado para a elaboração do hambúrguer foi o coxão mole (*semimembranosus*), adquirido no comércio local de Limoeiro do Norte - CE, a partir do qual se elaborou uma formulação simples de hambúrguer com 97% de carne, 2,4% de sal, 0,3 % de pimenta e 0,3 % de alho desidratado.

Todo o equipamento foi previamente limpo e sanitizado. Foi realizada uma formulação simples do hambúrguer (97% de carne, 2,4% de sal, 0,3% de pimenta e 0,3% de alho desidratado) e foi submetida ao congelamento. No dia posterior, os hambúrgueres foram descongelados e realizada a inoculação artificial das bactérias e adição das diferentes concentrações de óleos essenciais.

Figura 1 – Esquema utilizado na execução do experimento para verificar a ação dos óleos essenciais frente à *Staphylococcus aureus* em hambúrguer bovino

	Controle	Capim Limão				Orégano				Mix	
											
Tempo	0%	0,312%	0,625%	1,25%	2,5%	0,312%	0,625%	1,25%	2,5%	0,312%	0,625%
T0											
T1											
T2											
T4											
T6											

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a formulação total do hambúrguer atingir cerca de 7°C, cerca de 825g de hambúrguer foi levada à Câmara de Fluxo Laminar do Laboratório de Microbiologia, onde foi colocada em bandeja plástica estéril, sendo inoculada com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na concentração de 10^5 UFC/g. Em seguida foi fracionada (75 g) em 11 recipientes plásticos também estéreis, e tratadas com os óleos essenciais nas concentrações 0,312%; 0,625%; 1,25% e 2,5% v/p para os óleos de orégano e capim-limão, e 0,312%; 0,625% para a mistura dos óleos (mix), e uma amostra controle 0%.

Posteriormente, foram novamente fracionadas (5g) em sacos plásticos de polietileno de alta densidade (pead) estéreis, de forma a criar triplicatas para cada concentração de cada óleo essencial, e para cada tempo (Figura 1). O excesso de ar foi retirado do interior da embalagem manualmente. Os hambúrgueres ficaram estocados sob temperatura de refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 2$) e avaliados nos tempos 0, 1, 2, 4 e 6 dias de armazenamento. A análise no tempo 0 (zero) foi realizada 6 horas após a estocagem, pois esse tempo foi suficiente para que a temperatura da carne se igualasse com a temperatura da incubadora ($4^{\circ}\text{C} \pm 2$). Todo o experimento foi realizado em três repetições.

2.2.2 Contagem da *Staphylococcus aureus*

A contagem de *Staphylococcus aureus* foi realizada pela contagem direta em placas de acordo com a metodologia de Siqueira (1995). A quantificação de *S. Aureus* durante o período de estocagem das amostras foi realizada acrescentando-se 45mL de solução salina 0,85% p/v aos sacos plásticos contendo cinco gramas do hambúrguer bovino, seguido pela homogeneização obtendo-se a diluição 10^{-1} . A seguir, foram preparadas diluições decimais até 10^{-5} no tempo zero para todas as amostras, já nos demais tempos a diluição para as formulações com óleo foi de 10^{-1} a 10^{-3} e para 0% diluições de 10^{-3} a 10^{-5} . Alíquotas de 0,1mL de cada diluição foram utilizadas na técnica de semeadura por superfície em ágar Baird Parker e posteriormente incubadas a $35^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. As contagens foram realizadas em contador de colônias, segundo a técnica padrão, em placas com 25 a 250 colônias. A média do número das colônias contadas nas placas em triplicata, multiplicado pelo fator de diluição das placas correspondentes e pelo fator de correção da alíquota (x10), forneceu o número de *S. Aureus* por grama da amostra analisada.

2.3 Análise Sensorial

Foram elaboradas 4 formulações de hambúrguer com concentrações de 0%(A) e 0,312% de óleos essenciais de orégano (B), capim-limão (C) e mix (D). As formulações dos hambúrgueres submetidos à análise sensorial não possuía a bactéria *S. aureus* inoculada. Foi realizada análise microbiológica das amostras antes de submeter os provadores à análise sensorial para verificação da qualidade microbiológica, com a finalidade de não oferecer riscos à saúde do consumidor.

Para análise sensorial, foram utilizados os testes afetivos de aceitação escala hedônica de nove pontos e intenção de compra (DUTCOSKY, 2013), em que os hambúrgueres foram

fritos e servidos aproximadamente uma porção de 10g aos consumidores. Para o teste de aceitação foram analisados os atributos aparência, aroma, textura, sabor e aceitação global. Foram utilizados 120 consumidores de hambúrguer para avaliação com faixa etária entre 16 e 60 anos, todos não treinados. As amostras foram analisadas no Laboratório de Análise Sensorial do IFCE – Campus Limoeiro do Norte, sob iluminação artificial tipo luz do dia em cabines individuais e separadas. A ficha utilizada no teste encontra-se no anexo IV.

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

Para a enumeração de *Staphylococcus aureus* nas amostras de hambúrguer bovino, os tratamentos foram dispostos em um delineamento em blocos incompletos (DBI), em esquema de três tipos de óleo (Capim-limão, orégano, Mix) com cinco concentrações para os óleos de capim-limão e orégano (0; 0,312; 0,625; 1,25 e 2,5% v/p) e três concentrações para o mix (0; 0,312; 0,625%), todos possuindo na subparcela os tempos de 0, 1, 2, 4 e 6 dias de estocagem sob refrigeração. As médias dos dados coletados foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Para a análise sensorial foi utilizado delineamento em blocos ao acaso, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância, além disso foi calculado o índice de aceitabilidade (%). O Índice de Aceitabilidade (IA) foi realizado em relação aos atributos aparência, aroma, textura, sabor e aceitação global, e foi calculado segundo a expressão: $IA(\%) = A \times 100/B$, onde A = nota média obtida para o produto, e B = nota máxima dada ao produto. O IA consistente aceito tem sido considerado $\geq 70\%$ (MONTEIRO, 1984; TEIXEIRA, 1987; DUTCOSKY, 1996).

Para os cálculos estatísticos foi utilizado o software ASSISTAT 7.7 versão beta (SILVA; AZEVEDO, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Hambúrguer com óleo essencial frente à *Staphylococcus aureus*

As concentrações dos óleos essenciais utilizadas no experimento com o hambúrguer frente à *Staphylococcus aureus* foram baseadas nos resultados da CIM *in vitro*. Assim, a menor concentração utilizada foi de 0,312% v/p (CIM) e as demais concentrações (0,625%; 1,25% e 2,5% v/p) foram utilizadas tendo por base o trabalho de Busatta et al. (2007) que, para obterem uma inibição eficiente em linguças, foram necessárias concentrações de óleos essenciais cinco

vezes maior que a CIM. Além disso, concentrações maiores que a CIM *in vitro* são necessárias para uma inibição efetiva de microrganismos em alimentos, devido às várias interações que podem ocorrer entre os componentes dos óleos essenciais e do alimento (BURT, 2004).

Os óleos essenciais de orégano, capim-limão e a mistura dos dois óleos (MIX) apresentaram ação antimicrobiana desde a menor concentração utilizada no tempo 0 (Tabela 1). Os resultados demonstram que na medida em que se aumenta a concentração do óleo, a eficiência contra a bactéria *S. aureus* é melhorada no decorrer do tempo.

Tabela 1 – Efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e MIX (Mistura de orégano e capim-limão 1:1) em diferentes concentrações sobre *Staphylococcus aureus* em hambúrguer bovino durante armazenamento à temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 2$ por seis dias

Óleo essencial	Concentração (%)	<i>Staphylococcus aureus</i> (log 10 UFC/g)				
		Tempo de armazenamento (dias)				
		T0	T1	T2	T4	T6
Controle	0,00	5,31 aB	6,92 aA	5,45 aB	5,70 aB	5,27 aB
	0,312	3,88 bA	4,22 bA	4,16 bA	3,48 bB	2,55 bC
Orégano	0,625	2,48 cB	3,26 cA	2,66 cB	2,42 cB	1,45 cC
	1,250	1,58 dB	2,13 dA	1,66 eB	1,52 eB	1,07 dC
	2,500	1,56 dA	1,71 eA	1,09 eB	1,19 eB	0,50 eC
	0,312	3,67 bA	3,84 bA	3,81bA	3,90 bA	2,82 bB
Capim-limão	0,625	1,85 dA	2,27 dA	2,24 dA	2,26 cA	1,15 dB
	1,250	1,70 dB	2,41 dA	1,41 eB	1,00 eC	1,00 dC
	2,500	0,26 eB	1,00 fA	1,24 eA	0,25 fB	0,00 fB
	0,312	2,18 cB	2,94 cA	2,82 cA	2,39 cB	1,74 cC
Mix	0,312	2,18 cB	2,94 cA	2,82 cA	2,39 cB	1,74 cC
	0,625	2,39 cA	2,52 dA	2,09 dB	1,85 dB	1,15 dC

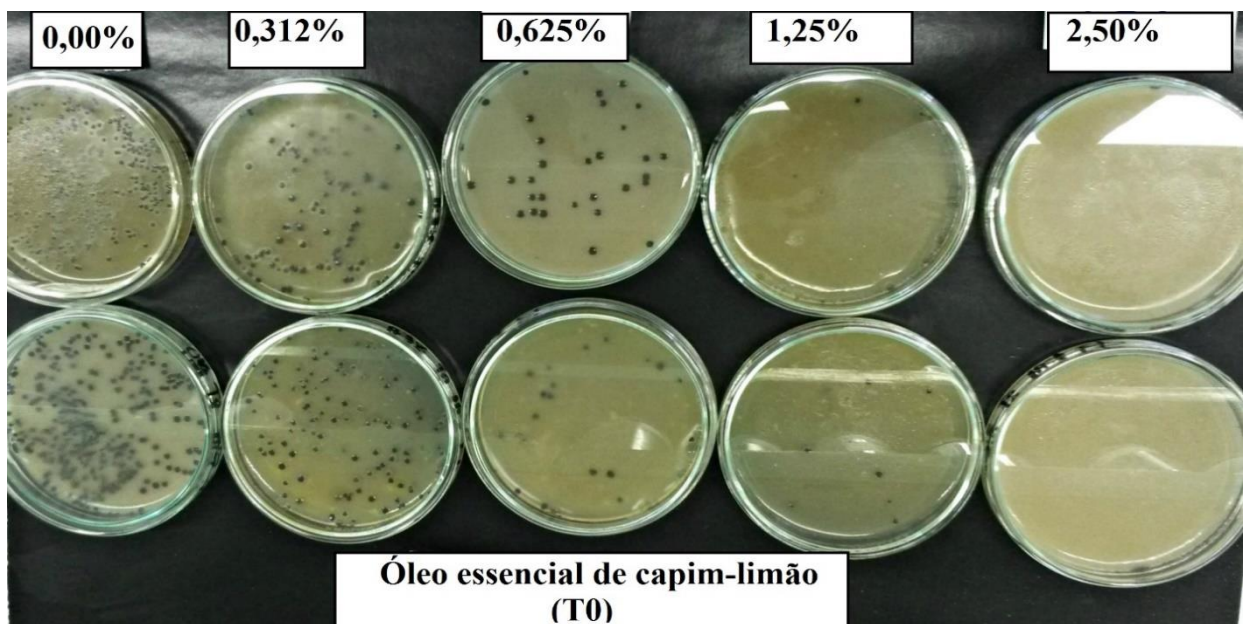
*Médias seguidas da mesma letra (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste de Scott knott ao nível de 5% de significância.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para menor concentração utilizada (0,312%), verifica-se que os óleos já apresentam diferença significativa do controle (0%) desde o tempo 0 de armazenamento, que foi de seis horas de inoculação da bactéria e aplicação dos óleos (Tabela 1). O Mix com concentração de 0,312% apresentou diferença significativa do óleo essencial de orégano e de capim-limão na mesma concentração em todos os tempos de armazenamento, e apresentou-se semelhante ao

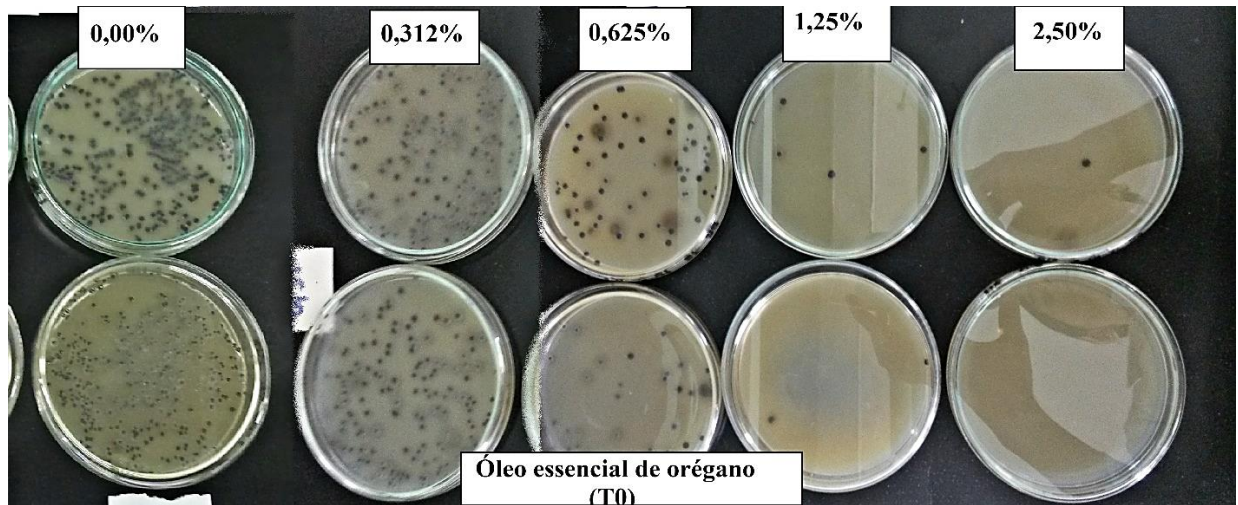
óleo essencial de orégano na concentração de 0,625%, demonstrando que ocorreu uma ação sinérgica dos óleos essenciais de orégano e capim-limão, aumentando a ação antimicrobiana do mix. A ação antimicrobiana dos óleos essenciais frente as bactérias podem ser visualizadas nas figuras 2, 3 e 4, nas quais observa-se que o crescimento da bactéria é inversamente proporcional ao aumento da concentração dos óleos essenciais, ou seja, quanto maior a concentração do óleo utilizada, menor é a contagem da bactéria *S. aureus* no hambúrguer bovino.

Figura 02 – Ação do óleo essencial de capim-limão frente à bactéria *Staphylococcus aureus* no Tempo 0 do armazenamento de hambúrguer bovino



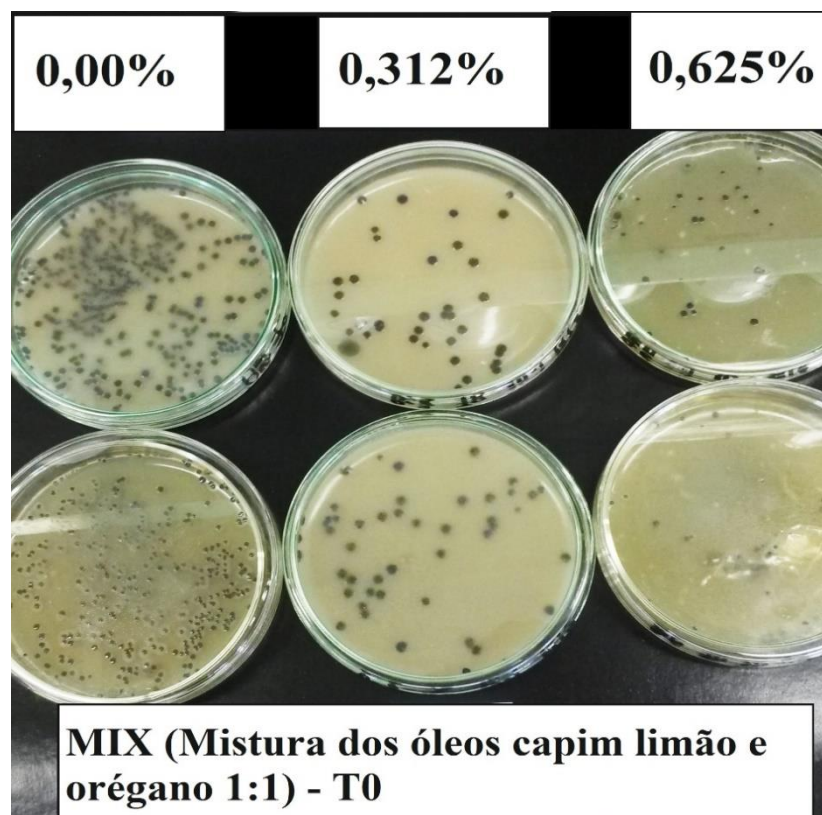
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 03 – Ação do óleo essencial de orégano frente à bactéria *Staphylococcus aureus* no Tempo 0 do armazenamento de hambúrguer bovino



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 04 – Ação da mistura dos óleos essenciais de capim-limão e orégano frente à bactéria *Staphylococcus aureus* no tempo 0 do armazenamento de hambúrguer bovino

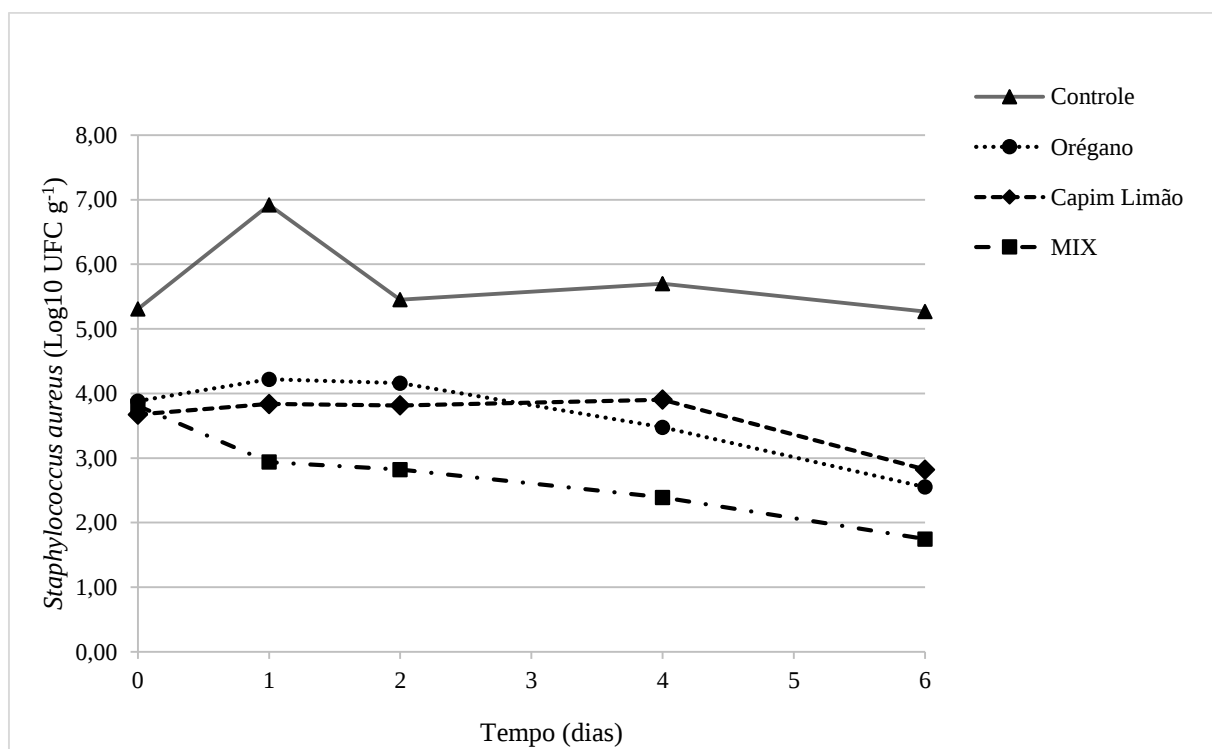


Fonte: Elaborada pela autora.

A combinação de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas pode ser representada como alternativa para potencializar a ação desses óleos (PEREIRA et al., 2008). O termo sinergismo é definido como o aumento da atividade de compostos ou fatores quando aplicados em conjunto, comparada à atividade destes, quando utilizados individualmente (WILLIAMSON, 2001; CEYLAN; FUNG, 2004). Tratando-se de óleos essenciais, vários estudos já realizados *in vitro*, utilizando a combinação de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas, alcançaram resultados promissores (DELAQUIS et al., 2002; GUTIERREZ et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011), o que demonstra que esta é uma alternativa viável a ser utilizada no controle microbiológico em alimentos, principalmente para conservação desses alimentos com maior vida de prateleira.

A ação bacteriana do Mix em relação aos óleos essenciais de capim-limão e orégano na concentração de 0,312% pode ser observada na figura 5, em que todos os pontos se sobrepõem, enquanto o Mix encontra-se abaixo dos óleos e o controle está bem mais elevado do que os outros tratamentos.

Figura 5 - Efeito dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e MIX (Mistura de orégano e capim-limão 1:1) na concentração de 0,312% frente à *Staphylococcus aureus* em hambúrguer bovino durante armazenamento por seis dias



Fonte: Elaborada pela autora.

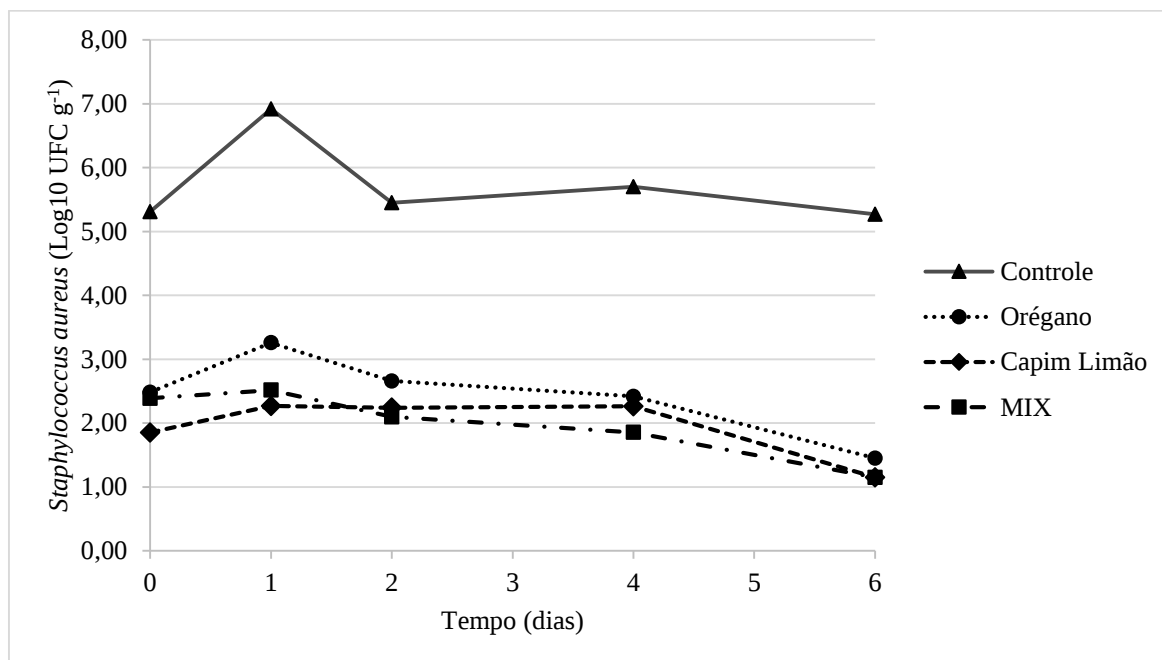
O controle apresentou diferença significativa de todos os tratamentos com óleos em todos os tempos de armazenamento (Tabela 1). A contagem inicial para o controle foi de 5,31log 10UFC/g e no final do armazenamento 5,27log 10UFC/g, com a máxima contagem para o primeiro dia (T1) de armazenamento com 6,92log 10UFC/g, enquanto para os demais tratamentos que continham óleo as contagens variaram de 0 a 4,2log 10UFC/g, de acordo com o tipo de óleo e da concentração aplicada. Essas diferenças de eficiência devem-se à variação da composição do óleo, interação entre eles, os componentes da carne e, principalmente, à sensibilidade da cepa utilizada aos constituintes de cada óleo (SOARES, 2010).

Para a concentração de 0,62%, o óleo essencial de orégano apresentou diferença significativa do óleo essencial de capim-limão nos tempos 0, 1, 2 e 6 dias de armazenamento, sendo, nessa concentração, o óleo essencial de capim-limão mais eficaz. O MIX com 0,62% apresentou atividades semelhantes ao óleo essencial de capim-limão na mesma concentração (Figura 6), em que se observa que os pontos estão quase se sobrepondo em todos os tempos de armazenamento, exceto para o tempo 4. Maior eficiência do óleo essencial de capim-limão em relação ao de orégano também foi encontrada por Soares (2010), analisando a ação desses óleos sobre a *Salmonella enterica* enteritidis.

Pereira et al. (2008), utilizando método de diluição em ágar, estudaram o efeito sinérgico entre os óleos de capim-limão, orégano e cravo-da-índia e observaram que não houve variação significativa entre a combinação e o comportamento individual dos óleos, constatando que não ocorreu sinergismo entre os mesmos.

Apesar das menores concentrações 0,312 e 0,625% apresentarem ação bacteriostática no hambúrguer bovino frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, essa redução foi significativa em relação ao controle apresentando-se dentro dos padrões da legislação em que estabelece máximo de 3,70log UFC/g de estafilococos coagulase positiva em produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados (BRASIL, 2001).

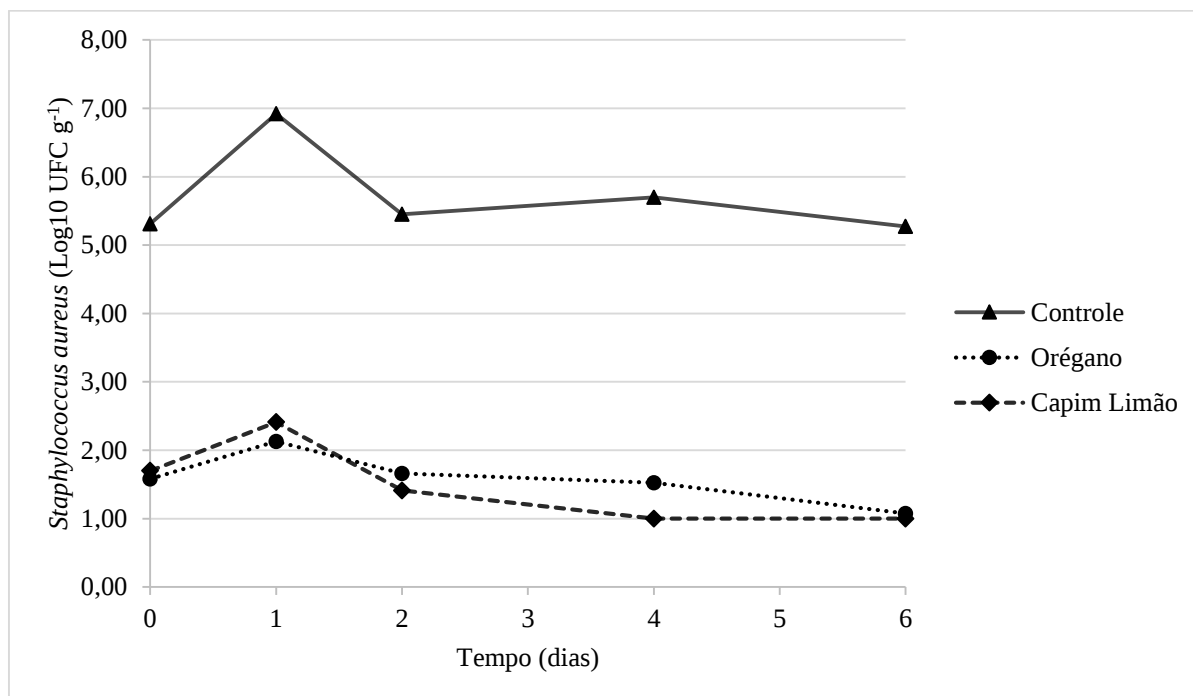
Figura 6 - Efeito dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e MIX (Mistura de orégano e capim-limão 1:1) na concentração de 0,625% frente à *Staphylococcus aureus* em hambúrguer bovino durante armazenamento por seis dias.



Fonte: Elaborada pela autora.

A concentração de 1,25% dos óleos essenciais de orégano e capim-limão apresentou contagens de 1,58 e 1,70log UFC/g respectivamente, de *S. aureus* no tempo zero de armazenamento, apresentando no final do armazenamento contagens de 1,07 e 1,00log UFC/g. Nessa concentração, os óleos não apresentaram diferença significativa entre si, demonstrando ação eficiente dos dois óleos a essa concentração. Na figura 7, pode-se verificar que as contagens da bactéria estão bem abaixo dos valores encontrados para o controle, o qual apresentou contagens acima de 5log UFC/g. Valor semelhante a essa concentração foi observado por Barbosa (2010), que verificou a ação antimicrobiana de óleos essenciais em hambúrguer bovino contaminado artificialmente com *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes*, encontrando concentração bactericida de 1,2% de óleo essencial de orégano, com redução para contagens <10 UFC/g.

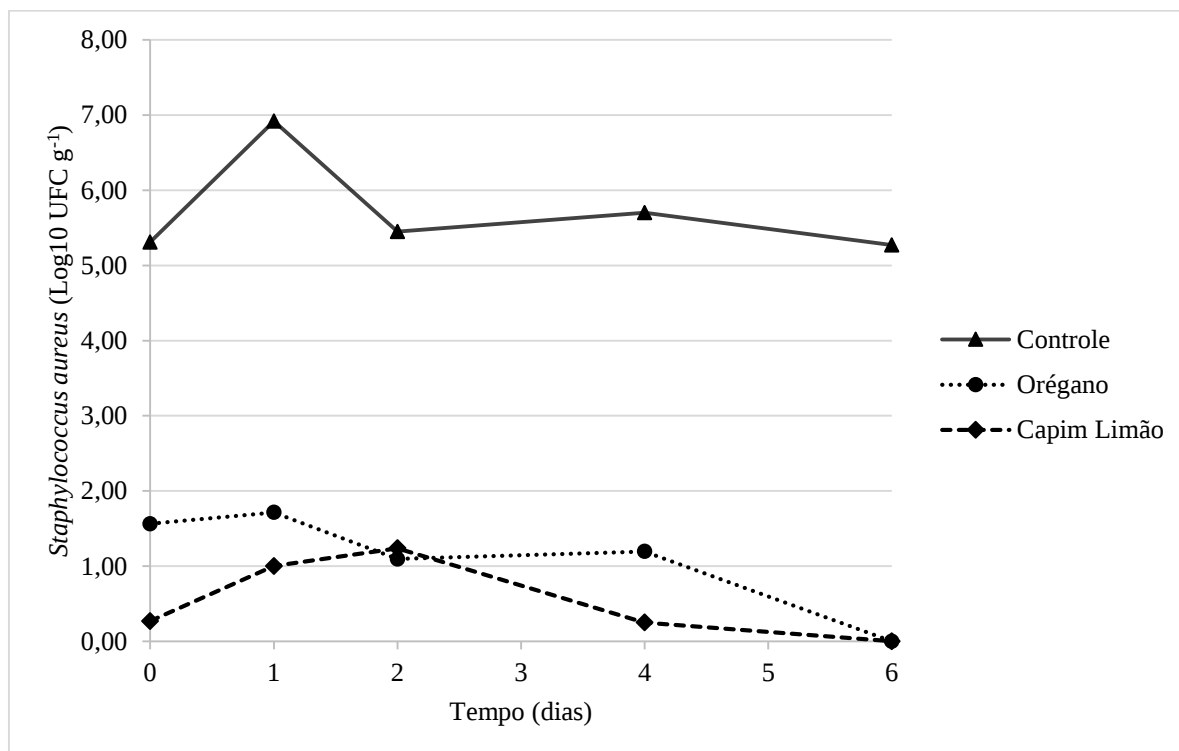
Figura 7 - Efeito dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão) na concentração de 1,25% frente à *Staphylococcus aureus* em hambúrguer bovino durante armazenamento por seis dias



Fonte: Elaborada pela autora.

Para concentração de 2,5% (Figura 8), os óleos essenciais de capim-limão e orégano apresentaram efeito bactericida no tempo de 6 dias de armazenamento, apresentando 100% de inibição da bactéria *S. aureus*, reduzindo suas contagens para 0,0log UFC/g. As propriedades biológicas dos óleos essenciais podem ser o resultado de uma sinergia de todas as moléculas ou apenas das principais moléculas presentes em concentrações mais elevadas. Geralmente, os componentes principais refletem em suas características biofísicas e biológicas e a amplitude dos seus efeitos depende da sua concentração, quando testados isolados ou incluídos em óleos essenciais (BAKKALI; AVERBECK; IDAOMAR, 2008).

Figura 8 - Efeito dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão) na concentração de 2,5% frente à *Staphylococcus aureus* em hambúrguer bovino durante armazenamento por seis dias.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Análise sensorial

Os resultados apontaram que todas as amostras de hambúrguer bovino apresentaram índice de aceitabilidade acima de 70% para todos os atributos avaliados (aparência, aroma, textura, sabor e aceitação global) (Tabela 2), demonstrando assim que a adição de 0,312% de óleos essenciais de orégano, capim-limão e a mistura dos dois no hambúrguer bovino não influenciou em sua aceitação.

O índice de aceitabilidade para os atributos aparência, aroma e textura para todos os tratamentos foi considerado bem elevado, variando de 77,78 a 78,67% para aparência, 82,56 a 83,67% para aroma e 80,37 a 81,48% para textura. Para os atributos sabor e aceitação global, o índice variou de 70,09 a 84,07% e 71,39 a 82,22%, respectivamente, sendo as notas mais altas atribuídas às amostras controle.

Tabela 02 - Índice de Aceitabilidade do hambúrguer bovino com óleos essenciais para cada atributo avaliado.

Amostras	Índice de Aceitabilidade (%)				
	Aparência	Aroma	Textura	Sabor	Aceitação global
Controle (A)	78,67	83,67	80,74	84,07	82,22
Orégano (B)	78,00	83,44	80,37	70,28	72,59
Capim-limão (C)	78,11	82,56	80,83	70,09	71,39
Mix (D)	77,78	83,15	81,48	70,65	73,43

Fonte: Elaborada pela autora.

As médias para todos os atributos das amostras se encontram na tabela 3. As médias para o atributo aparência foram de 7,08 para o controle; 7,02 para o hambúrguer com óleo essencial de orégano na concentração de 0,312%; 7,03 para o hambúrguer com óleo essencial de capim-limão e 7,00 para o tratamento com a mistura dos óleos (Figura 9). Todas as amostras não apresentaram diferença significativa nesse atributo, estando todas próximas a faixa “Gostei moderadamente” e todas foram aceitas pelos consumidores.

Tabela 03 – Médias dos atributos no teste de aceitação e intenção de compra para hambúrguer bovino com adição de óleo essencial.

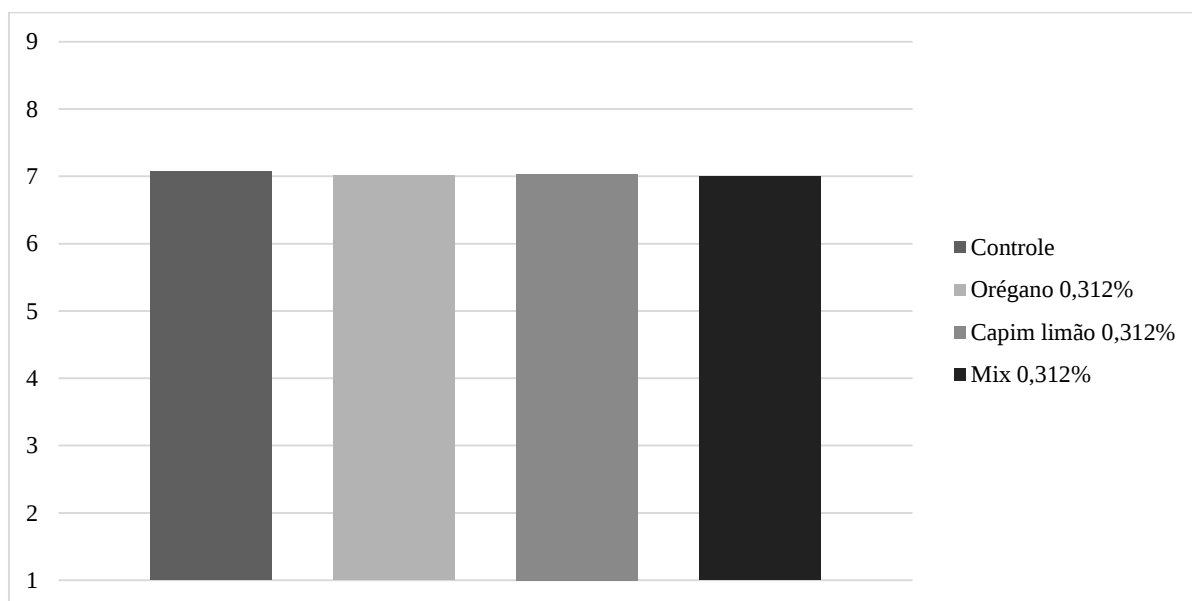
Amostras	Índice de Aceitabilidade (%)					
	Aparência	Aroma	Textura	Sabor	Aceitação global	Intenção de compra
Controle (A)	7,08 a	7,53 a	7,27 a	7,57 a	7,40 a	4,16 a
Orégano (B)	7,02 a	7,51 a	7,23 a	6,33 b	6,53 b	3,51 b
Capim-limão (C)	7,03 a	7,43 a	7,28 a	6,31 b	6,43 b	3,47 b
Mix (D)	7,00 a	7,48 a	7,33 a	6,36 b	6,61 b	3,83 ab

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Fonte: Elaborada pela autora.

Barbosa (2010), avaliando hambúrguer bovino com concentrações de 0,03; 0,05 e 0,08% de óleo essencial de orégano, verificou aceitação sensorial somente nas concentrações 0,03%, e 0,05% com médias de 5,5, e para a concentração de 0,08%, a média foi de 4,5.

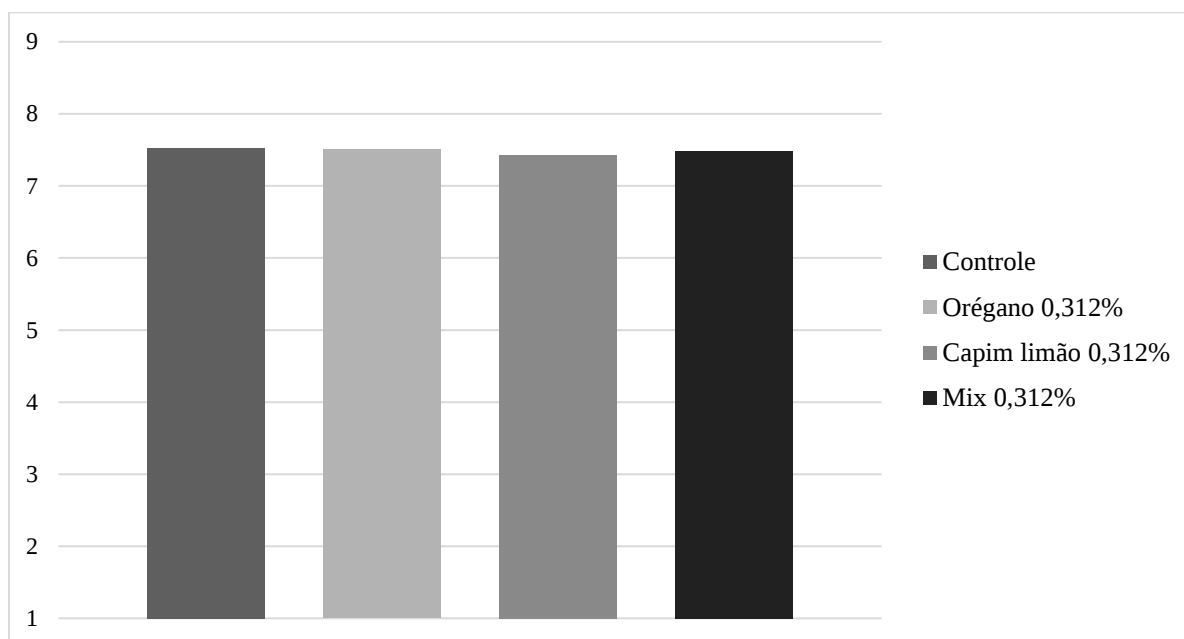
Figura 9 –Valores médios atribuídos no teste sensorial para o atributo “aparência” do hambúrguer bovino com óleos essenciais



Fonte: Elaborada pela autora.

As médias para o atributo aroma dos hambúrgueres bovinos com óleos essenciais foram 7,43 para o tratamento com óleo essencial de capim-limão, 7,48 para o mix, 7,51 para o orégano e 7,53 para a amostra controle (Figura 10). Todos os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si, e todas apresentam-se entre as faixas 7- “Gostei moderadamente” e 8- “Gostei muito” da escala hedônica de 9 pontos, sendo o atributo aroma de todas as amostras bem aceito pelos consumidores. Os óleos essenciais são mundialmente conhecidos por sua capacidade aromatizante e, apesar disso, o aroma forte dos óleos essenciais não influenciaram na aceitação sensorial do hambúrguer bovino.

Figura 10 – Valores médios atribuídos no teste sensorial para o atributo “aroma” do hambúrguer bovino com óleos essenciais

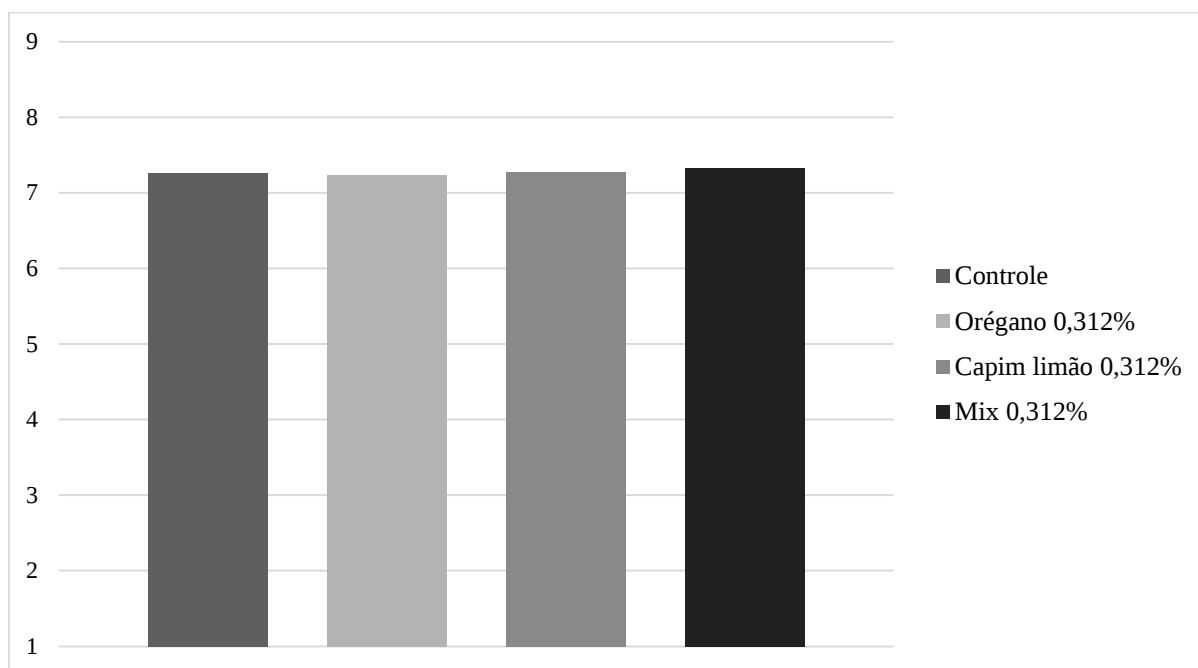


Fonte: Elaborada pela autora.

Busatta et al., (2007), avaliando linguiça com adição de óleo essencial de orégano, encontraram médias de aceitação sensorial de 5,58 para a amostra controle, 4,18 para concentração de 0,345%, 3,08 para concentração de 0,69%, 2,58 para concentração de 1,725% e 1,98 para concentração de 3,45% de óleo essencial de orégano em linguiça, utilizando uma escala hedônica de 9 pontos. Eles concluíram que com o aumento da concentração do óleo essencial, menor eram os valores dados as amostras, sendo maior a rejeição sensorial do produto.

As médias para o atributo textura dos hambúrgueres bovinos com óleos essenciais variaram de 7,23 a 7,33 (Figura 11). Todas os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si, estando todas as amostras entre as faixas 7- “Gostei moderadamente” e 8- “Gostei muito” da escala hedônica de 9 pontos, sendo todas aceitas pelos avaliadores quanto ao atributo textura do produto.

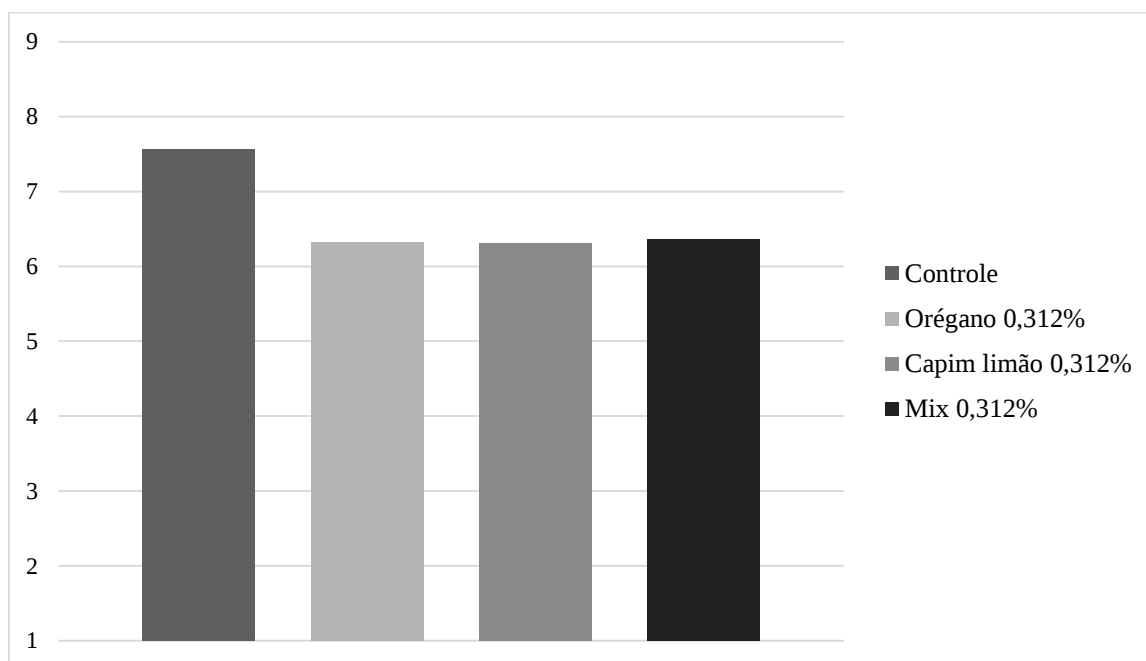
Figura 11 – Valores médios atribuídos no teste sensorial para o atributo “textura” do hambúrguer bovino com óleos essenciais



Fonte: Elaborada pela autora.

Para o atributo sabor do hambúrguer bovino, a amostra controle apresentou diferença significativa dos tratamentos com óleos essenciais, com a média mais alta (7,57), enquanto as amostras que possuíam óleos essenciais em suas formulações apresentaram médias de 6,33 para óleo essencial de orégano, 6,31 para óleo essencial de capim-limão e 6,36 para a mistura dos óleos essenciais (Figura 12). Os tratamentos com óleos essenciais na formulação (0,312%) não apresentaram diferença significativa entre si, e, apesar de possuírem médias mais baixas que o controle, elas também foram aceitas pelos avaliadores, estando entre as faixas 6 – “Gostei ligeiramente” e 7- “Gostei moderadamente”. Os óleos essenciais possuem um sabor forte e muitos trabalhos demonstram a rejeição de alimentos que possuem óleos essenciais na formulação.

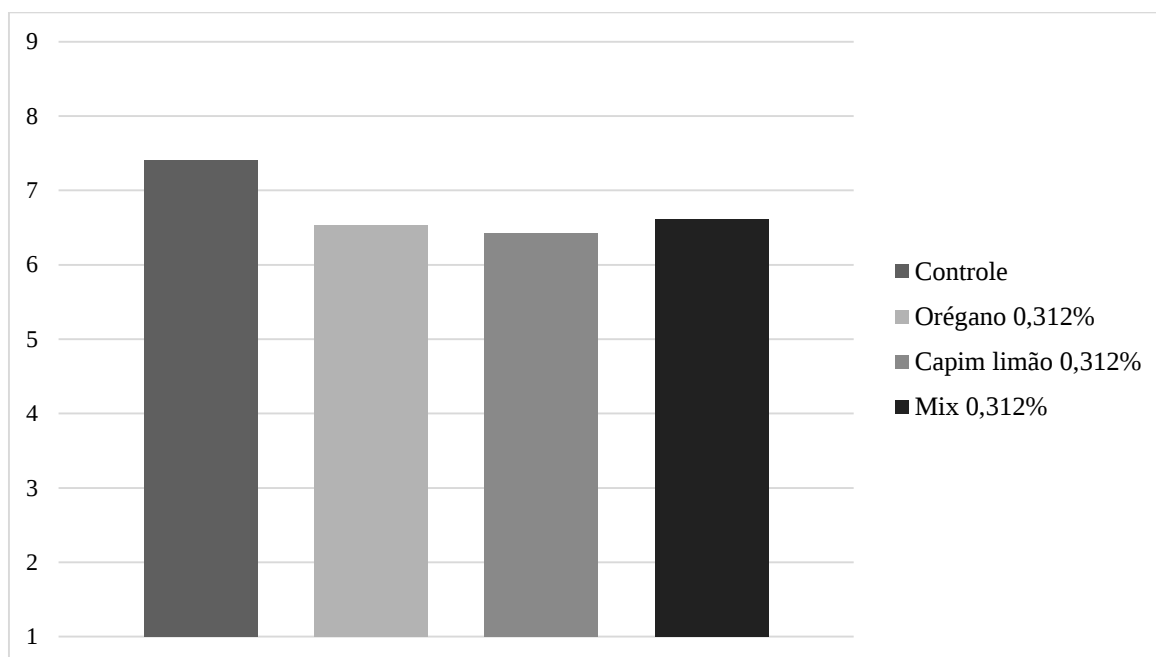
Figura 12 – Valores médios atribuídos no teste sensorial para o atributo “sabor” do hambúrguer bovino com óleos essenciais



Fonte: Elaborada pela autora.

A adição de óleos essenciais também influenciou na aceitação global do hambúrguer bovino, diferindo todos os tratamentos que possuíam óleo na formulação da amostra controle. A amostra controle apresentou maior média, de 7,40, enquanto os tratamentos com óleos essenciais de orégano, capim-limão e a mistura dos óleos (mix) apresentaram médias de 6,53, 6,43 e 6,61 respectivamente (Figura 13), todas sendo também aceitas pelos consumidores, estando entre as faixas 6 – “Gostei ligeiramente” e 7 – “Gostei moderadamente”.

Figura 13 – Valores médios atribuídos no teste sensorial para o atributo “aceitação global” do hambúrguer bovino com óleos essenciais

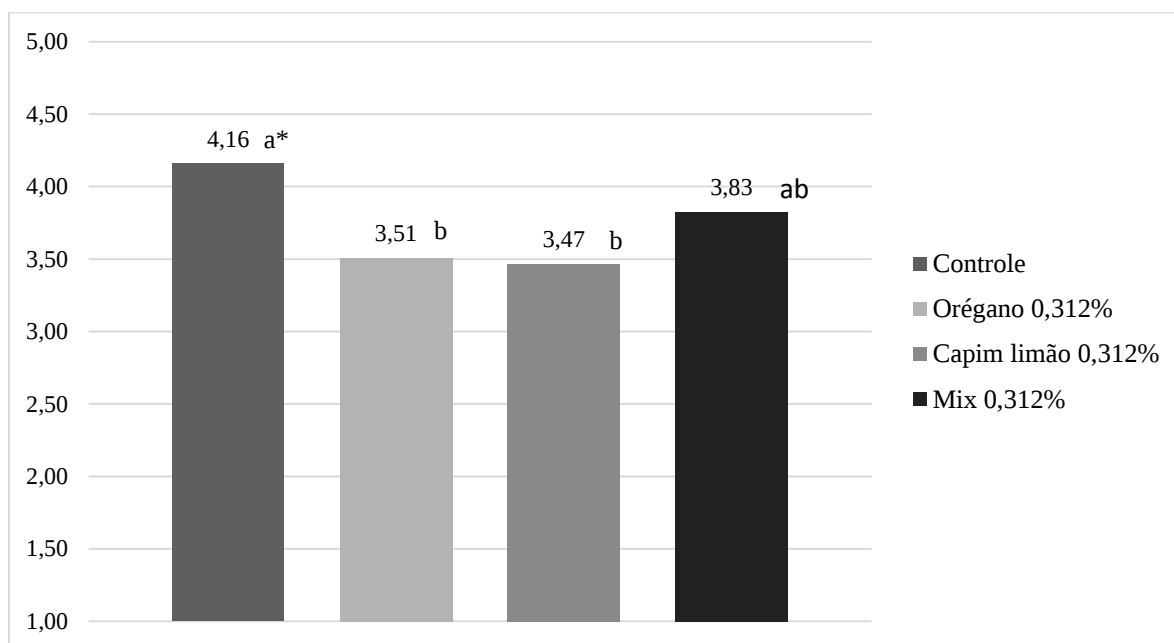


Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto à intenção de compra, o controle (média de 4,16) apresentou diferença significativa dos tratamentos com óleo essencial de orégano (média de 3,51) e capim-limão (média de 3,47), porém não apresentou diferença para a mistura dos óleos (média de 3,83) (Figura 14). A média obtida para o controle corresponde a faixa do 4 – “Provavelmente compraria”, enquanto os tratamentos com óleos essenciais estão entre as faixas do 3 – “Talvez comprasse/talvez não comprasse” e “4 – Provavelmente compraria”.

De acordo com Skandamis e Nychas (2001), a utilização de óleos essenciais pode ser considerada uma barreira adicional no controle de microrganismos em alimentos, uma vez que o seu uso é limitado pelos aspectos sensoriais e pela menor atividade quando comparado aos ensaios microbiológicos *in vitro*. Barbosa (2010) afirma que os resultados dela mostraram o potencial antimicrobiano dos OE e em contrapartida revelaram que os valores de CIM não se equivaliam aos níveis tolerados pelos consumidores em hambúrguer, ou seja, os consumidores aceitavam concentrações menores do que os valores CIM encontrados. Porém, no presente trabalho, verifica-se que a concentração de 0,312% apresentou efeito antimicrobiano desejado e foi tolerado pelos consumidores de hambúrguer.

Figura 14 – Valores médios atribuídos na intenção de compra do hambúrguer bovino com óleos essenciais



*Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Fonte: Elaborada pela autora.

Barbosa (2010) ainda afirma que há a necessidade de estudos que visem à utilização conjunta de óleos essenciais e outras barreiras que possam atuar sinergicamente, visando garantir a segurança microbiológica de alimentos sem, no entanto, afetar seus aspectos organolépticos.

Neste trabalho, foi verificado que a mistura dos óleos essenciais de orégano e capim-limão apresentaram uma boa ação antimicrobiana e foi bem aceita pelos consumidores, os quais comentavam durante os testes que a formulação dava um equilíbrio no sabor do hambúrguer, não sendo tão intenso como os que possuíam somente orégano ou capim-limão.

4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram uma possibilidade da utilização dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L., *Cymbopogon citratus* e uma mistura dos dois (Mix) como composto antimicrobiano alternativo em sistemas de conservação de alimentos, mesmo quando utilizadas baixas concentrações.

A adição dos óleos essenciais de orégano, capim-limão e a mistura dos dois em hambúrguer bovino na concentração de 0,312%, não influenciou em sua aceitação quanto aos atributos aparência, aroma, textura, sabor, aceitação global e intenção de compra, sendo todas bem

aceitas pelos consumidores com índice de aceitabilidade para todos os atributos $\geq 70\%$, se mostrando, portanto, como um antimicrobiano natural para alimentos.

REFERÊNCIAS

BAKKALI, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista (Instituto de Biociências), Botucatu.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 7-E, 10 jan. 2001.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BUSATTA, C.; MOSSI, A. J.; RODRIGUES, M. R. A.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. Evaluation of organum vulgare essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 610-616, 2007.

CEYLAN, E.; FUNG, D. Y. C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1-55, 2004.

DELAQUIS, P. J.; STANICH, L.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 101-109, 2002.

DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Ed. DA Champagnat, 1996. 23 p.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4. ed. Curitiba: Champagnat, 2013. 531 p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91-7, 2008.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 41, n. 1, p. 119-127, 2008.

MARCHI, P. G. F. **Estudo comparativo do estado de conservação de carne moída através de métodos microbiológicos e físico-químicos**. 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –Unesp), Campus de Jaboticabal, 2006.

MECHKOVSKI, A.; AKERELE, C. O. **Quality, control methods for medicinal plant materials**. WHO/PHARM/92.559. Switzerland: World Health Organization, 1992.

MONTEIRO, C.L.B. **Técnicas de avaliação sensorial**. 2. ed. Curitiba: CEPPA-UFPR, 1984. 101 p.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; PICCOLI, R. H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 887-93, 2008.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. **ASSISTAT 7.7 Versão Beta** - Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009 (Atualizado, 2014).

SILVA, P. S.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 122, p. 32- 40, 2004.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Brasília: EMBRAPA-SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1995.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 6, p. 1011-1022, 2001.

SOARES, R. A. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente à *Salmonella enterica* Enteritidis inoculada em carne moída bovina**. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG. 2010.

TAJKARIMI, M. M., IBRAHIM S. A., CLIVER D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v.21, n. 9, p. 1199–1218, 2010.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E.; BARBETTA, P. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis (SC): Ed. UFSC; 1987.

WILLIAMSON, E.M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 401-9, 2001.

CAPÍTULO V - CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O óleo essencial de alecrim pimenta apresentou como constituinte majoritário o timol (83,53%), o de capim-limão apresentou os constituintes α -Citral (56,17%) e β -Citral (35,77%) e o óleo essencial de orégano apresentou o Terpinen-4-ol (25,62%), γ -Terpineno (16,18%) e Carvacrol (12,84%) como compostos majoritários, além disso, estes apresentaram atividade bactericida *in vitro* frente a cinco linhagens bacterianas de interesse em alimentos, mesmo em baixas concentrações, demonstrando um grande potencial para utilização em indústrias alimentícias, farmacêuticas, dentre outros.

O óleo essencial de orégano também apresentou efeito antimicrobiano em revestimento comestível de hambúrguer bovino, apresentando bom desempenho no armazenamento para algumas bactérias de interesse na área de alimentos, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sem alterar a composição centesimal do alimento utilizando concentrações $\geq 0,15\%$.

Os resultados demonstram uma possibilidade da utilização de óleos essenciais de *Origanum vulgare* L., *Cymbopogon citratus* e uma mistura dos dois (Mix) como composto antimicrobiano alternativo em sistemas de conservação de alimentos, mesmo quando utilizadas baixas concentrações (0,312%). A adição desses os óleos em hambúrguer bovino na concentração de 0,312%, não influenciou em sua aceitação quanto aos atributos aparência, aroma, textura, sabor, aceitação global e intenção de compra, sendo todas bem aceitas pelos consumidores com índice de aceitabilidade para todos os atributos $\geq 70\%$, denotando, portanto, ser um antimicrobiano natural para alimentos. Assim, os óleos essenciais demonstram uma técnica viável para uso como antimicrobianos naturais, com o objetivo de aumentar a vida de prateleira dos alimentos.

Os óleos essenciais possuem atividade antimicrobiana para diversos microrganismos, sugere-se, portanto, a utilização desses óleos em diferentes tipos de alimentos, podendo estar associados ou não a outros óleos, como, também, uma possível associação com a técnica de microencapsulação, a fim de reduzir o sabor forte e característico dos óleos, podendo utilizar concentrações mais elevadas do óleo, com aceitação do produto.

ANEXOS

ANEXO I

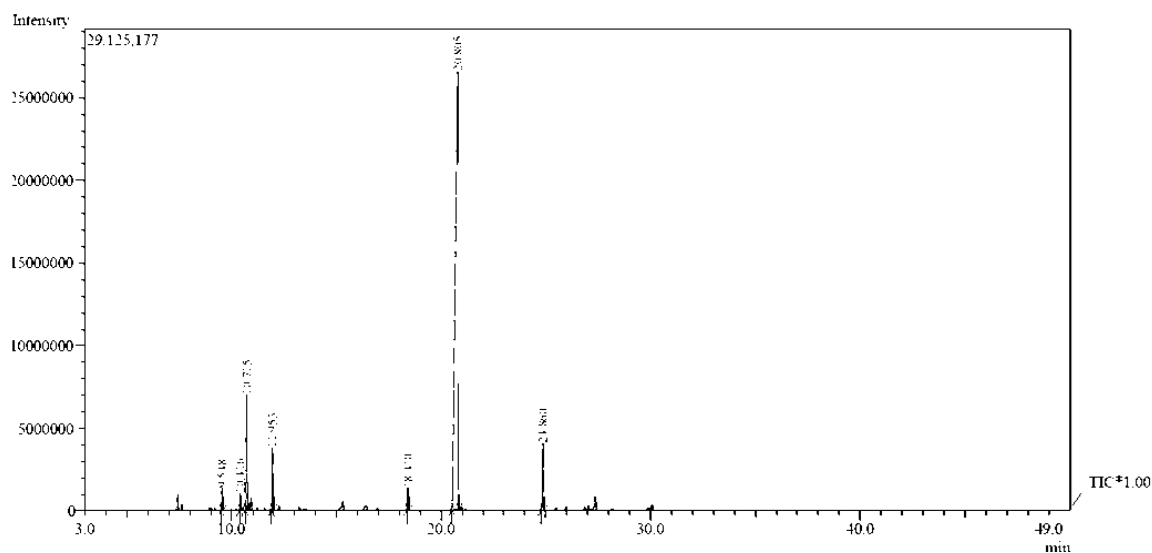
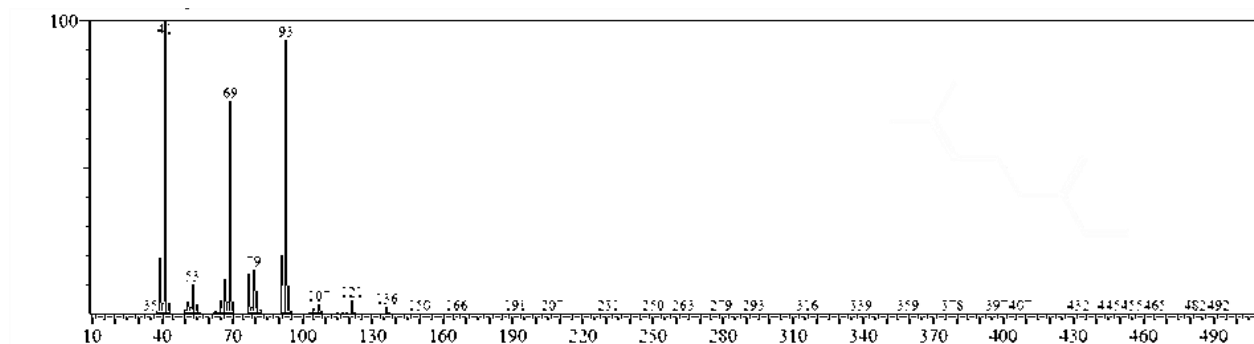
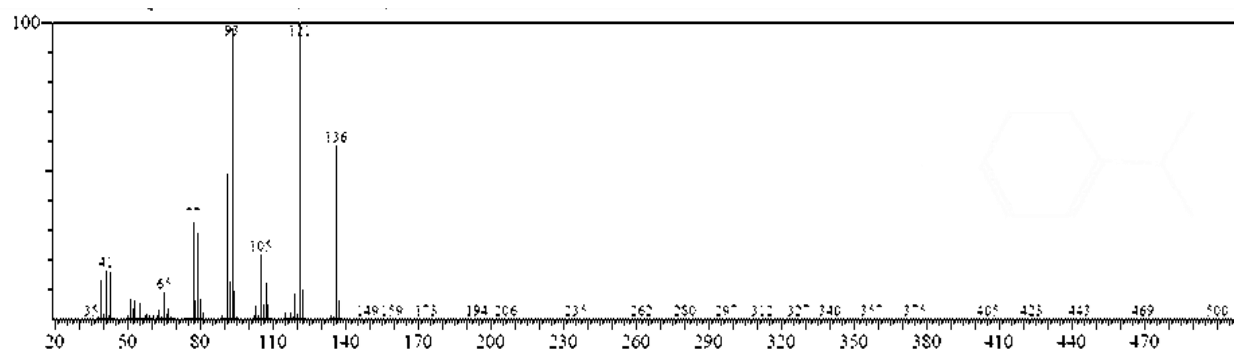
Dados espectrométricos do óleo essencial das folhas secas de *Lippia sidoides*.Figura 1 – Cromatograma do óleo essencial das folhas secas de *Lippia sidoides*Figura 2 – Espectro de massas do β -MyrcenoFigura 3 – Espectro de massas do α -Terpineno

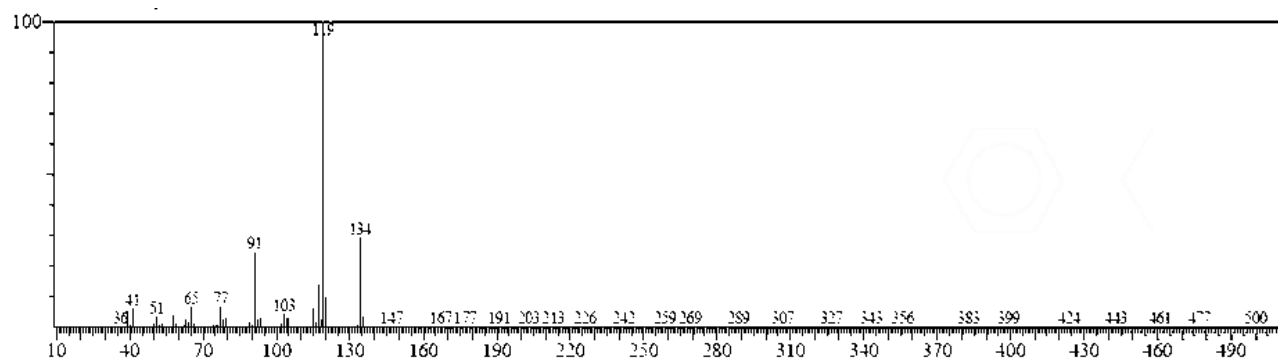
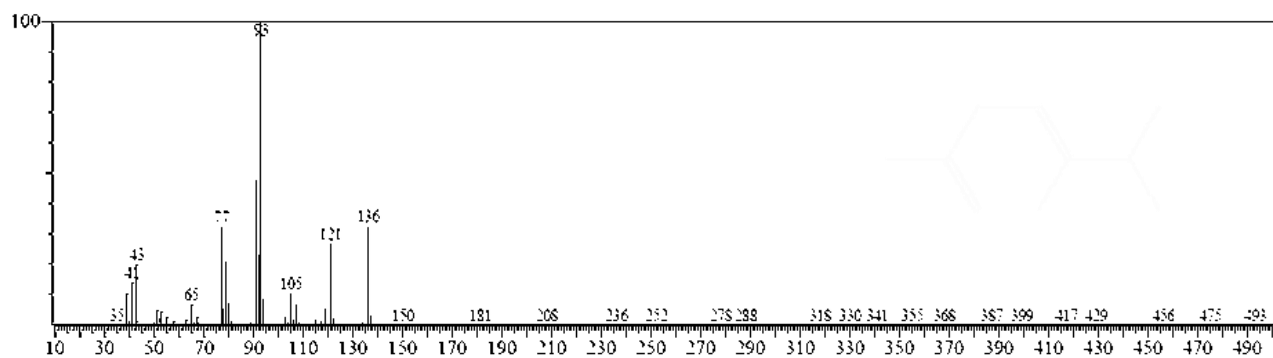
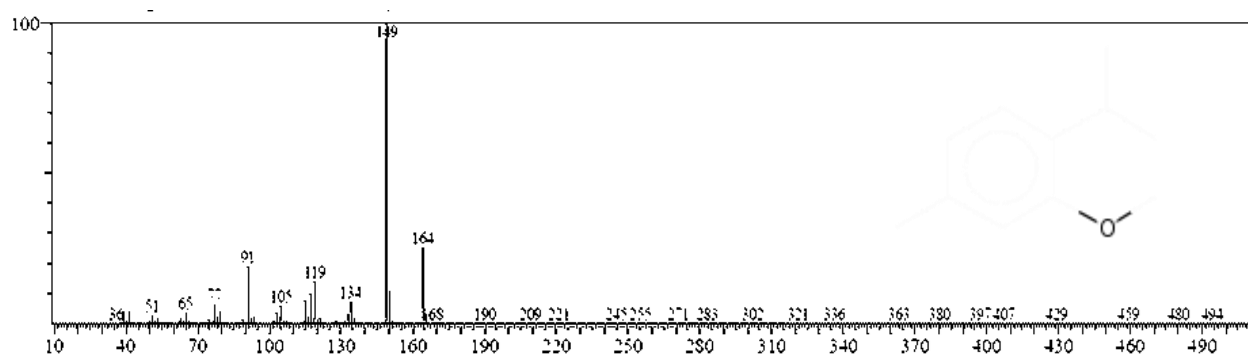
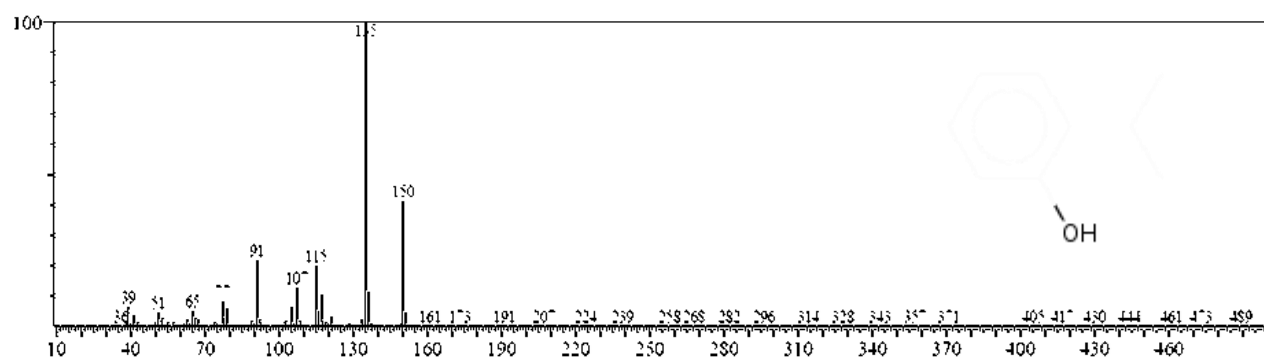
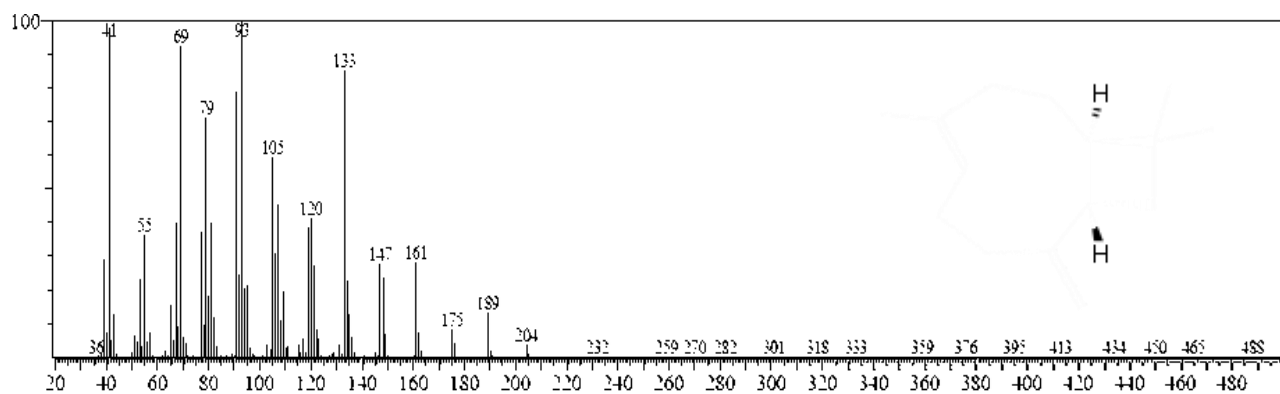
Figura 4 – Espectro de massas do p-Cimeno**Figura 5** – Espectro de massas do γ -Terpineno**Figura 6** – Espectro de massas do Metil-éter-timol

Figura 7 – Espectro de massas do Timol**Figura 8** – Espectro de massas do Cariofileno

ANEXO II

Dados espectrométricos do óleo essencial das folhas secas de *Cymbopogon citratus*.

Figura 1 – Espectro de massas da *Cymbopogon citratus*

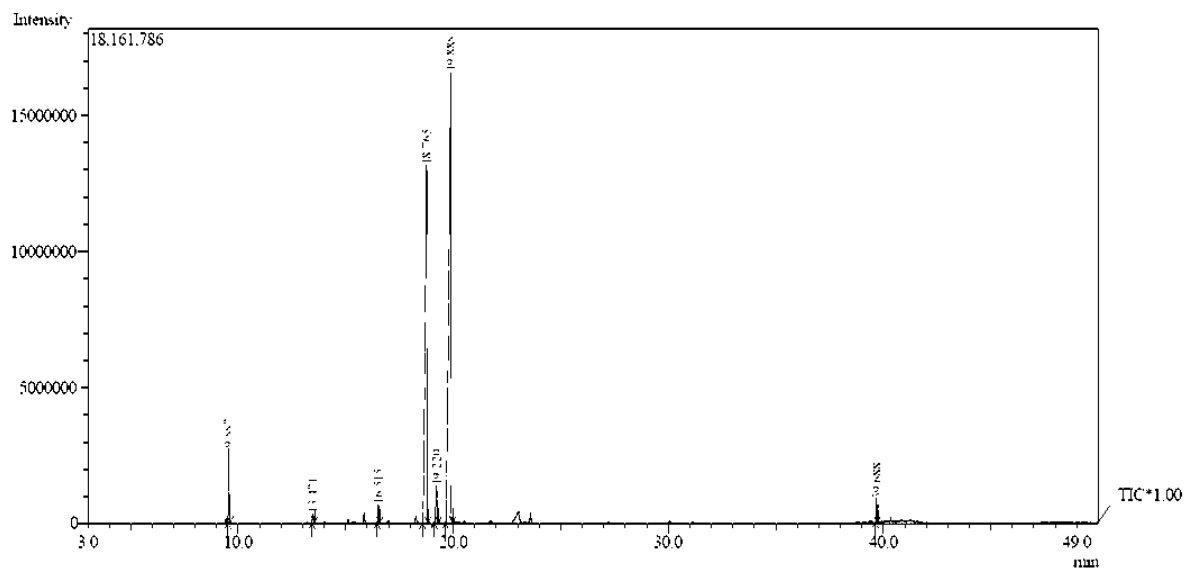


Figura 2 – Espectro de massas do β -Myrcene

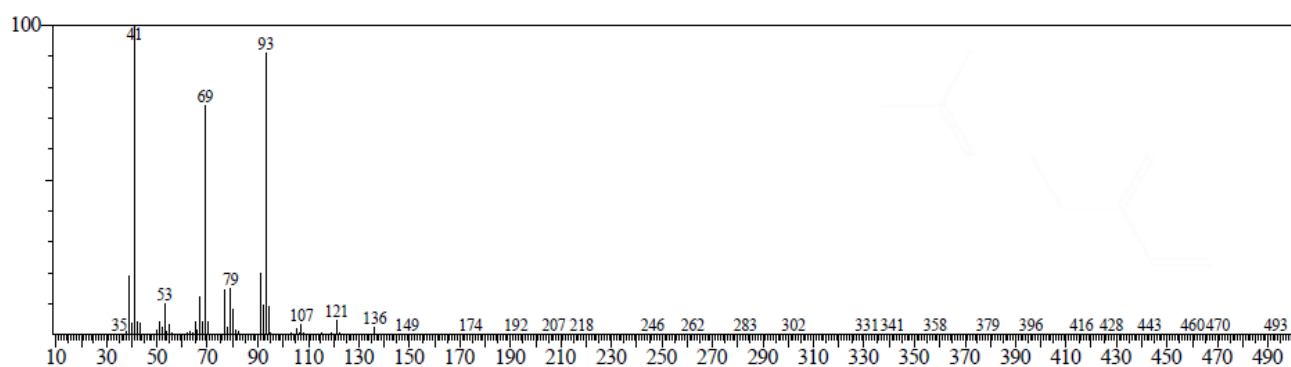


Figura 3 – Espectro de massas do Linalol

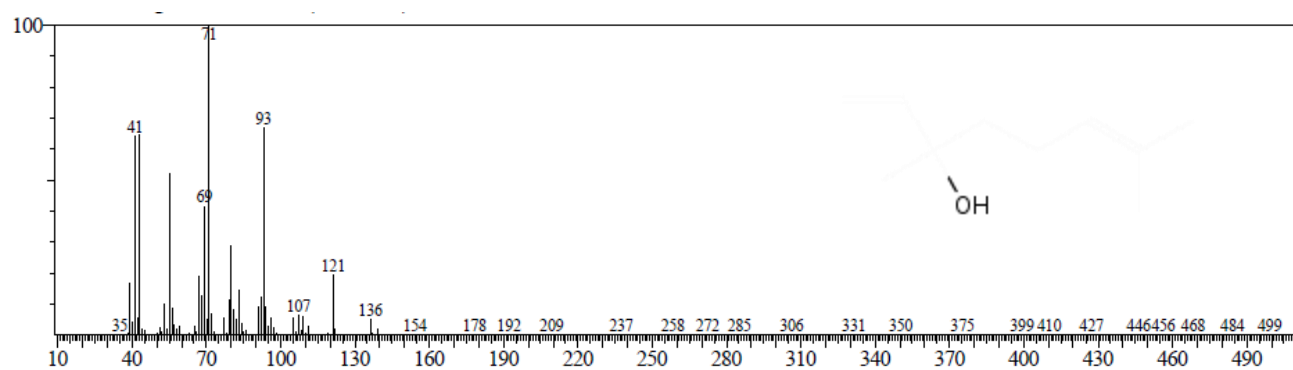


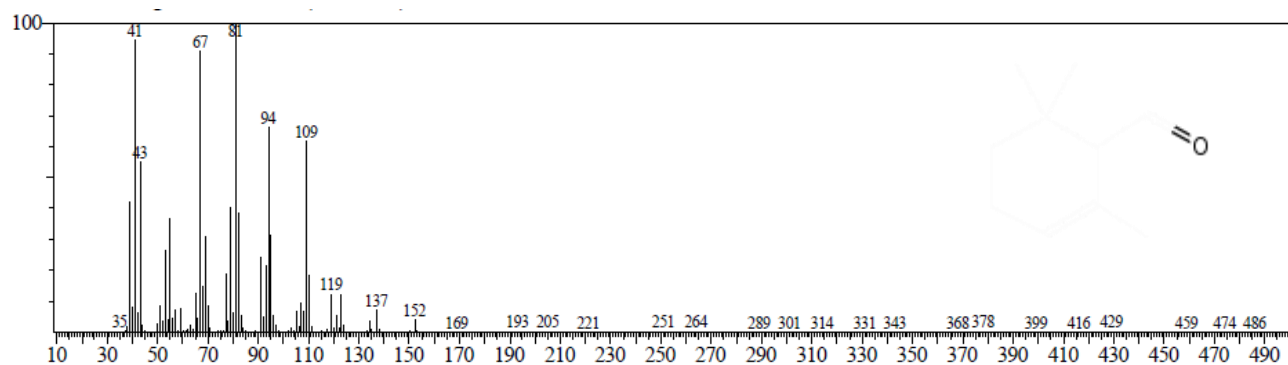
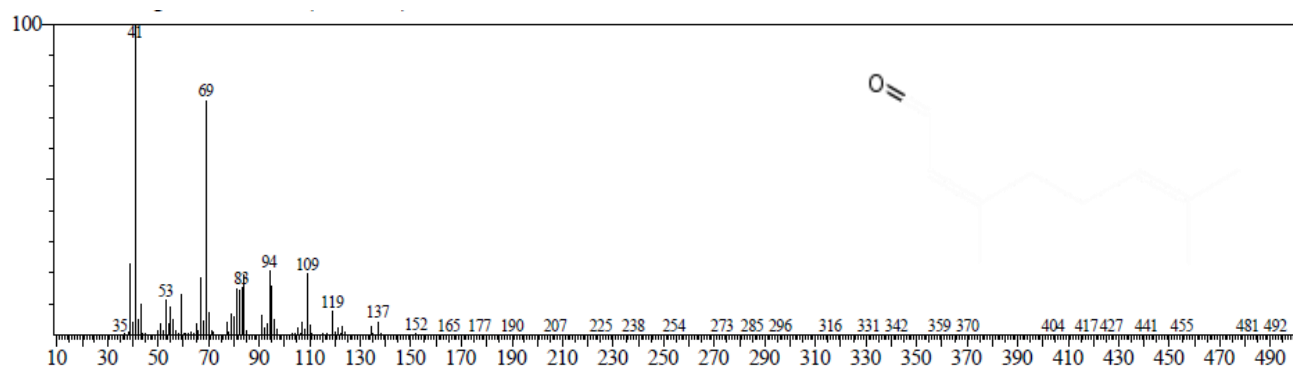
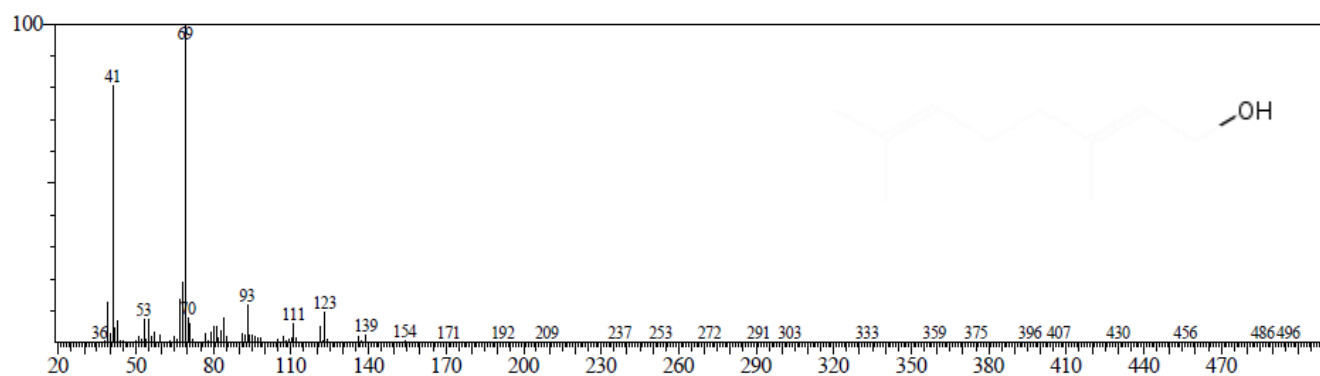
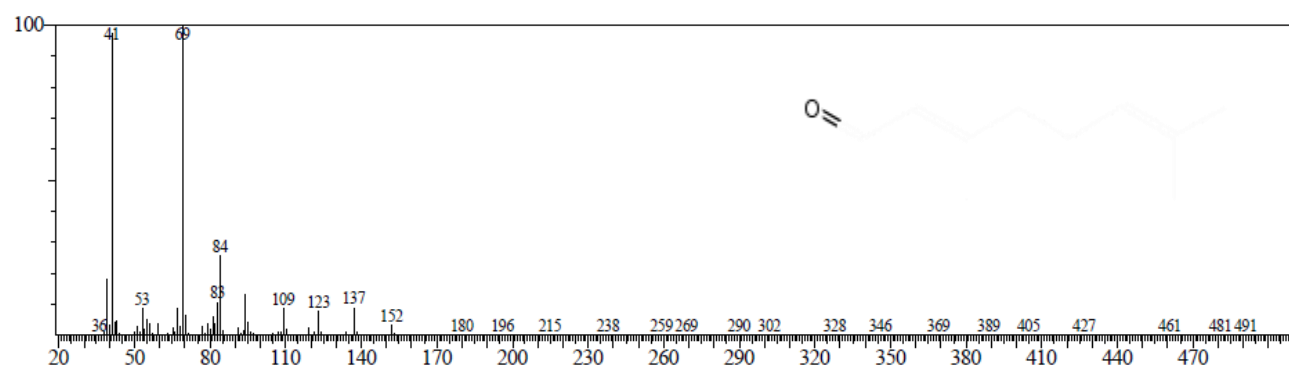
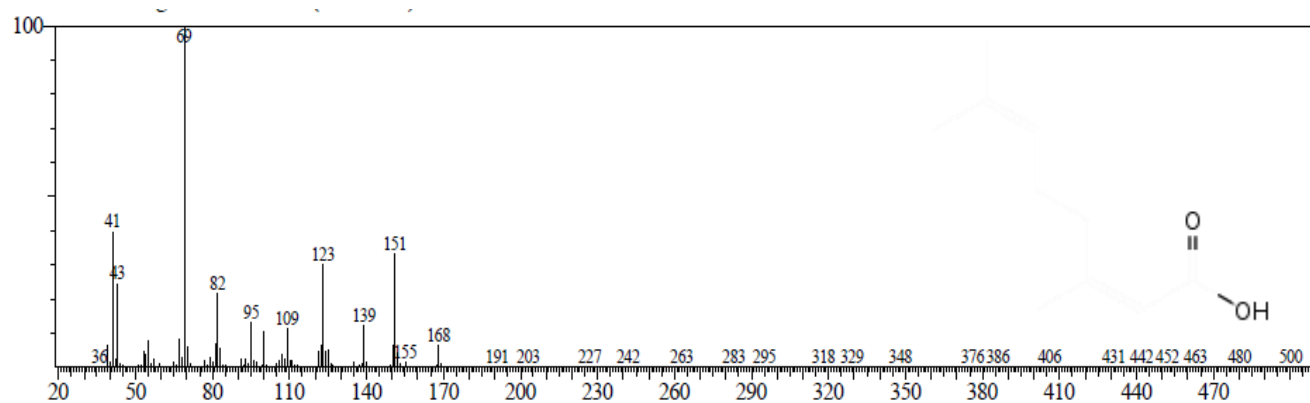
Figura 4 – Espectro de massas do α -Cyclocitral**Figura 5** – Espectro de massas do β -Citral**Figura 6** – Espectro de massas do Geraniol

Figura 7 – Espectro de massas do α -Citral**Figura 8** – Espectro de massas do Ácido Nerólico

ANEXO III

Dados espectrométricos do óleo essencial das folhas secas de *Origanum vulgare*.

Figura 1 – Espectro de massas do *Origanum vulgare* L.

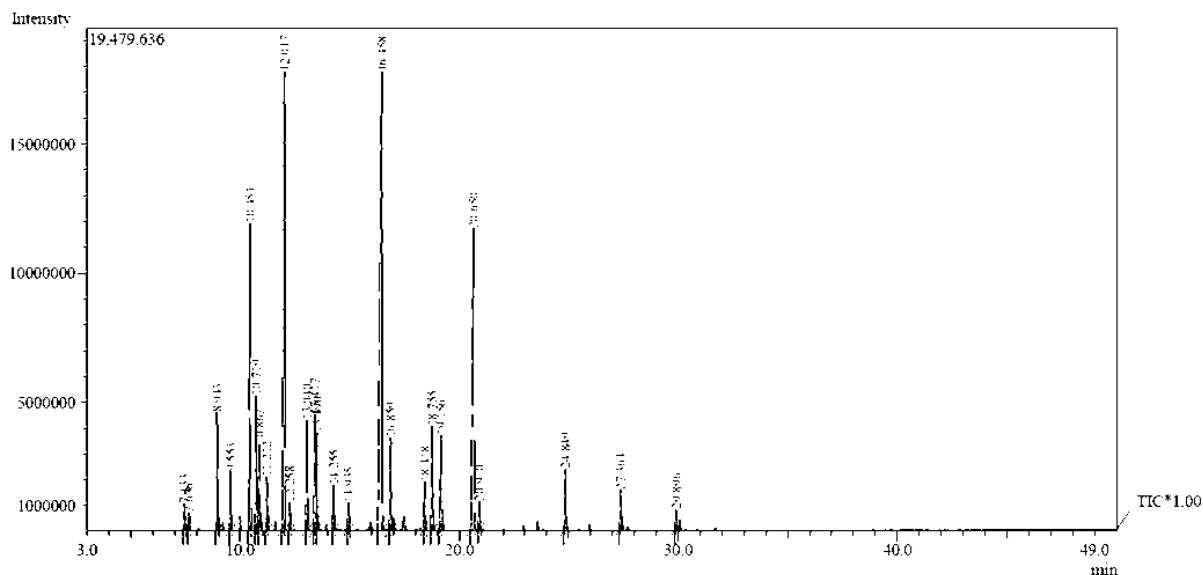


Figura 2 – Espectro de massas do α -Thujene

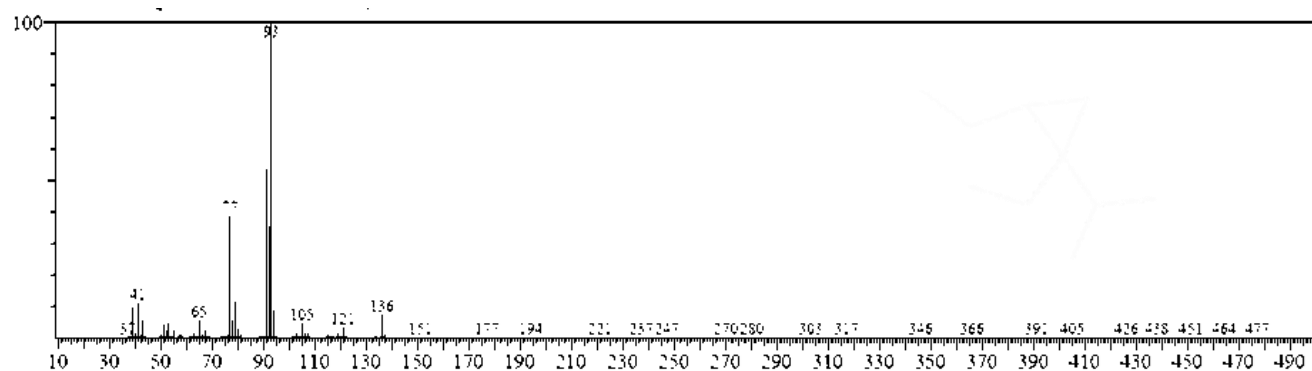


Figura 3 – Espectro de massas do α -Pinene

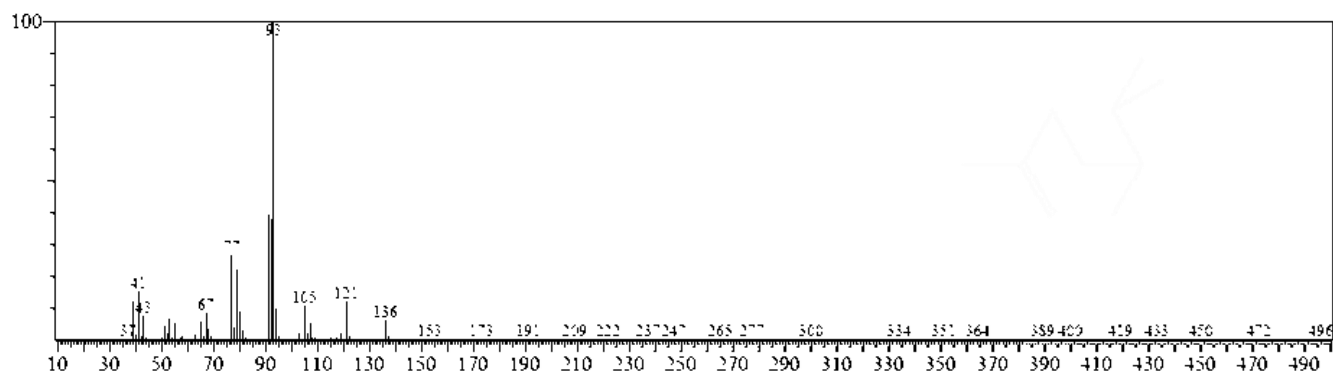


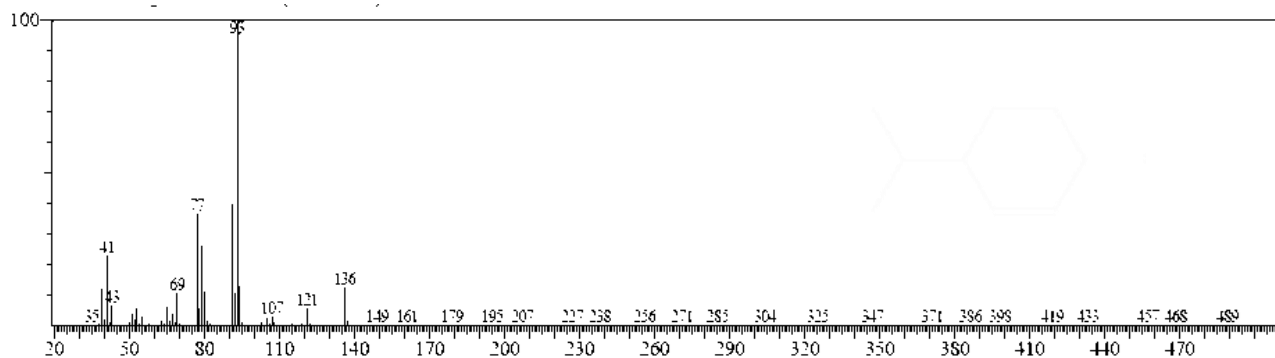
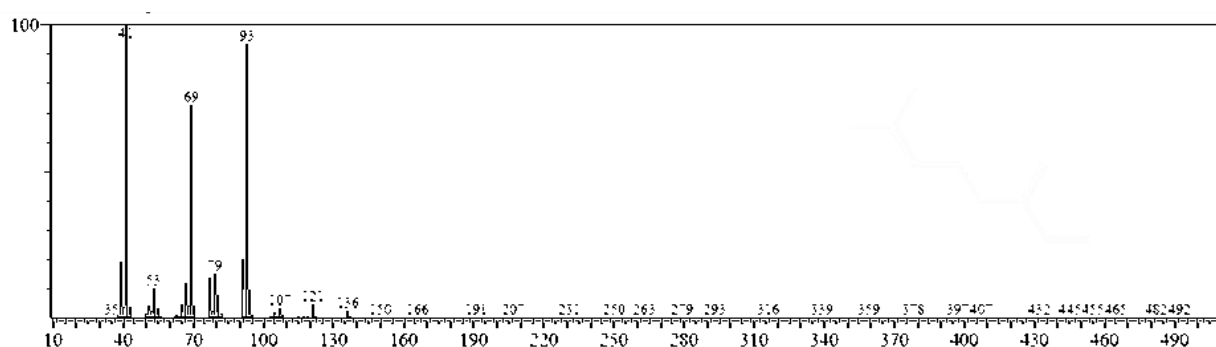
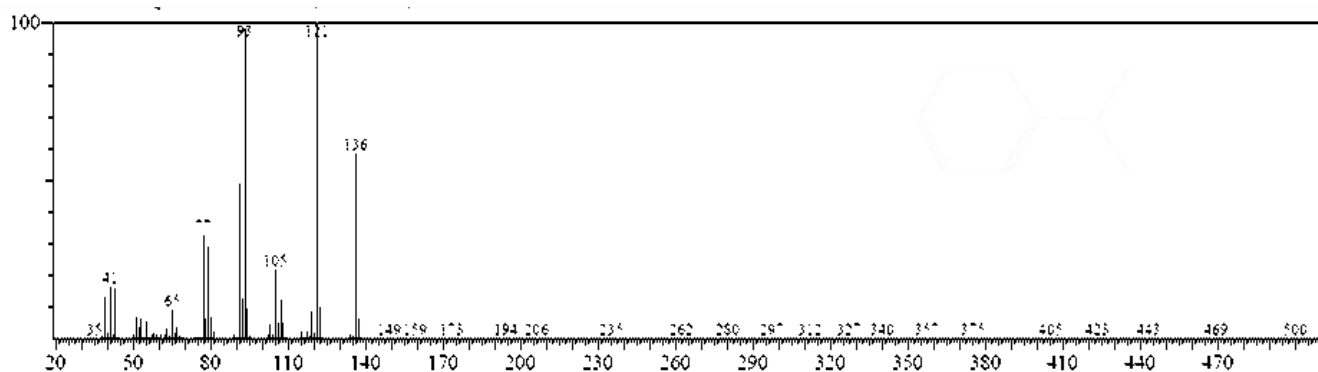
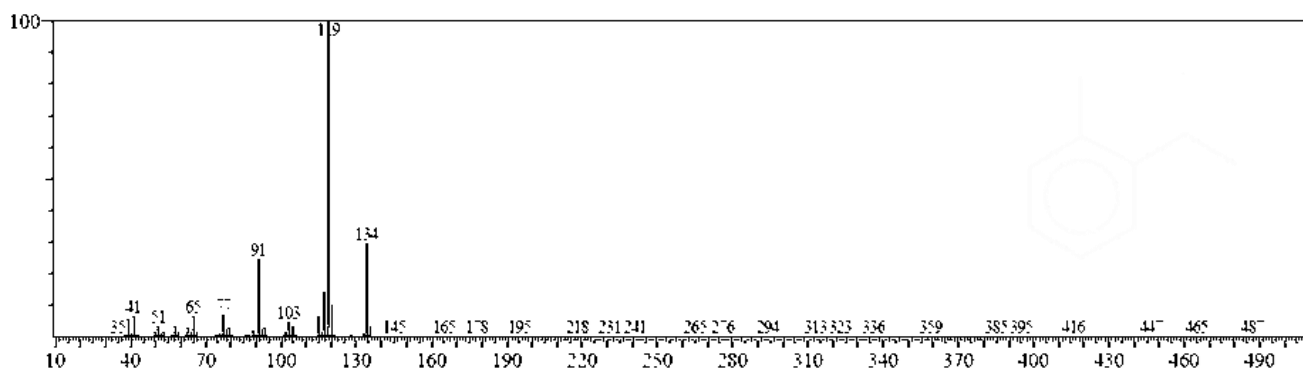
Figura 4 – Espectro de massas do β -Phellandrene**Figura 5** – Espectro de massas do β -Myrceno**Figura 6** – Espectro de massas do α -Terpineno**Figura 7** – Espectro de massas do o-Cymene

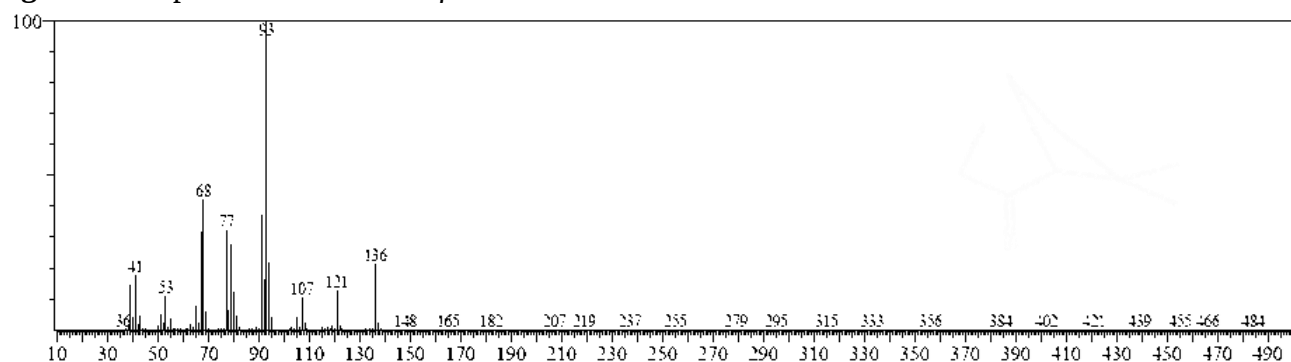
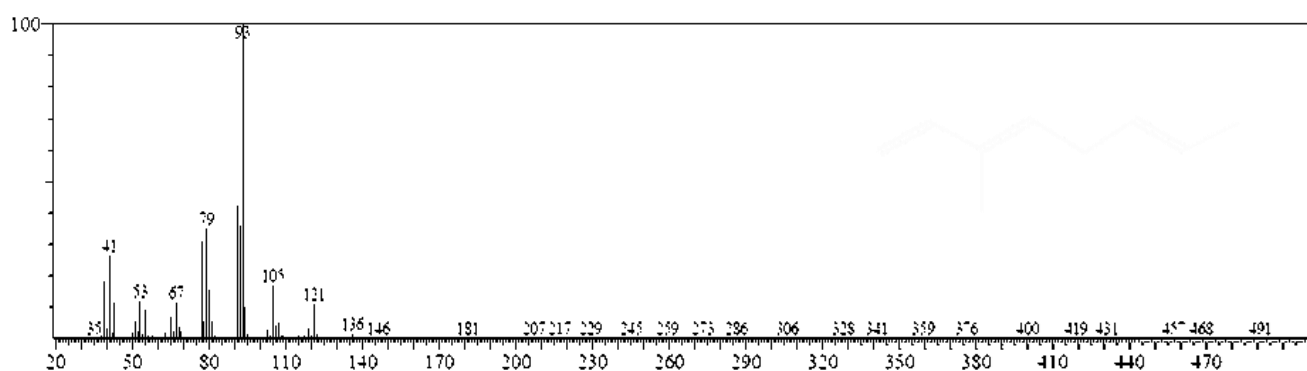
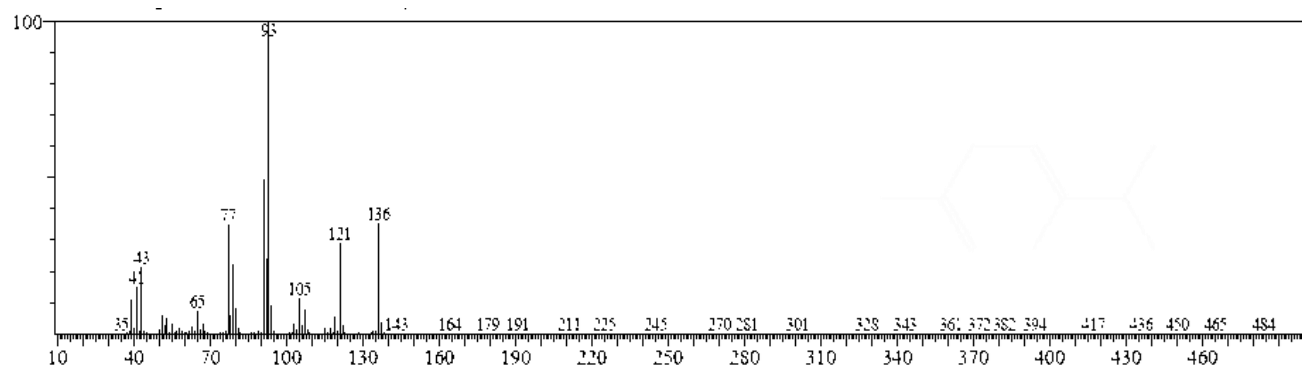
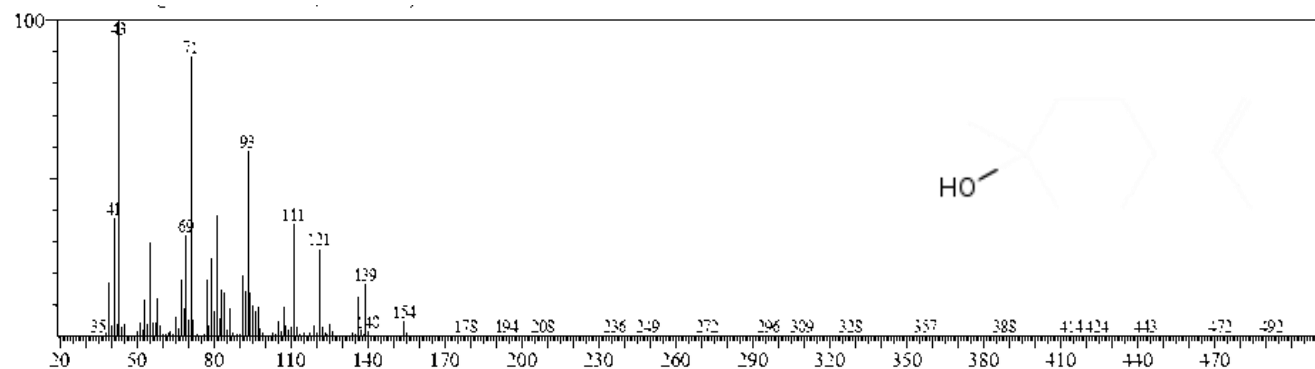
Figura 8 – Espectro de massas do β -Pinene**Figura 9** – Espectro de massas do trans- β -Ocimene**Figura 10** – Espectro de massas do γ -Terpinene**Figura 11** – Espectro de massas do β -Terpineol

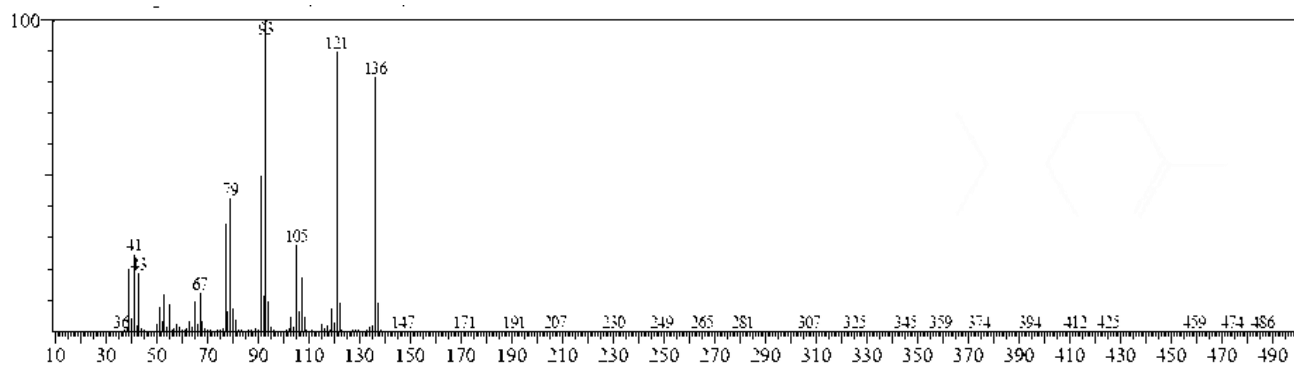
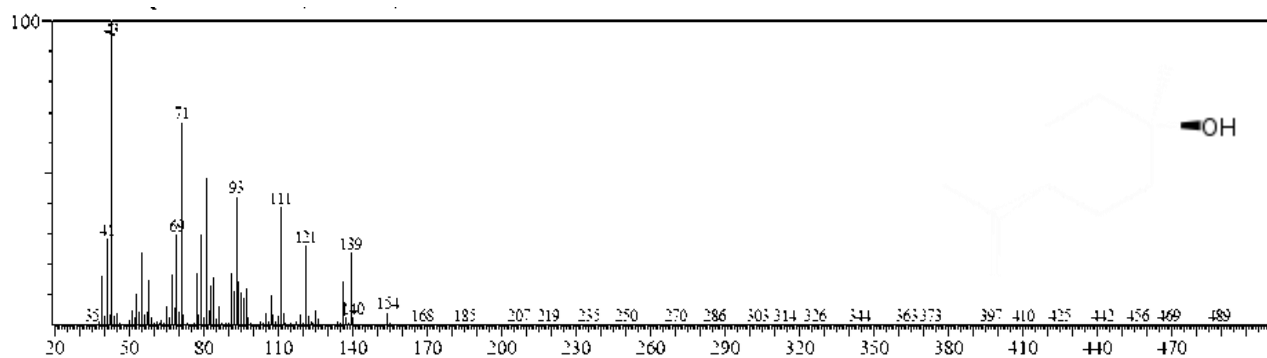
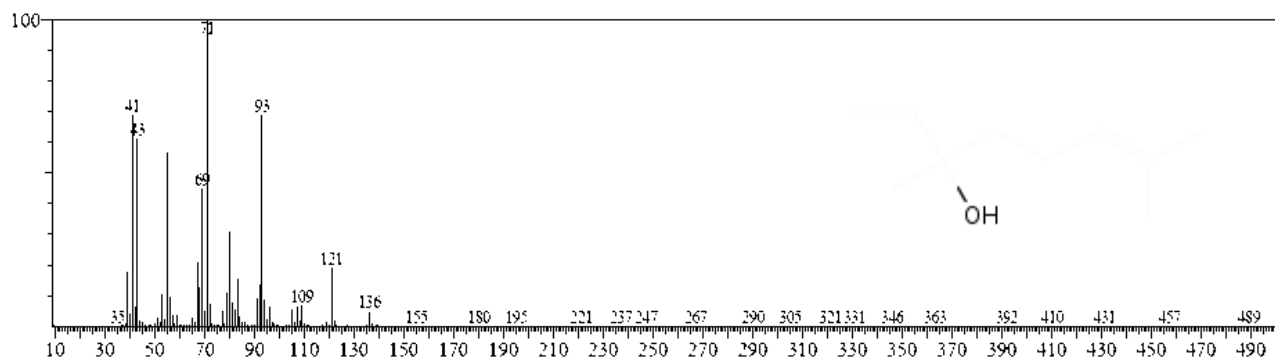
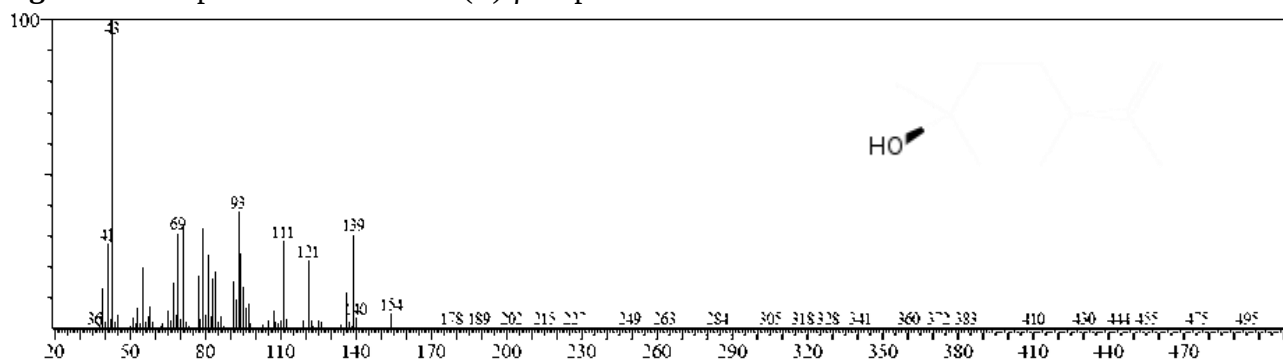
Figura 12 – Espectro de massas do Terpinolene**Figura 13 – Espectro de massas do Terpineol****Figura 14 – Espectro de massas do Linalool****Figura 15 – Espectro de massas do (E)- β -terpineol**

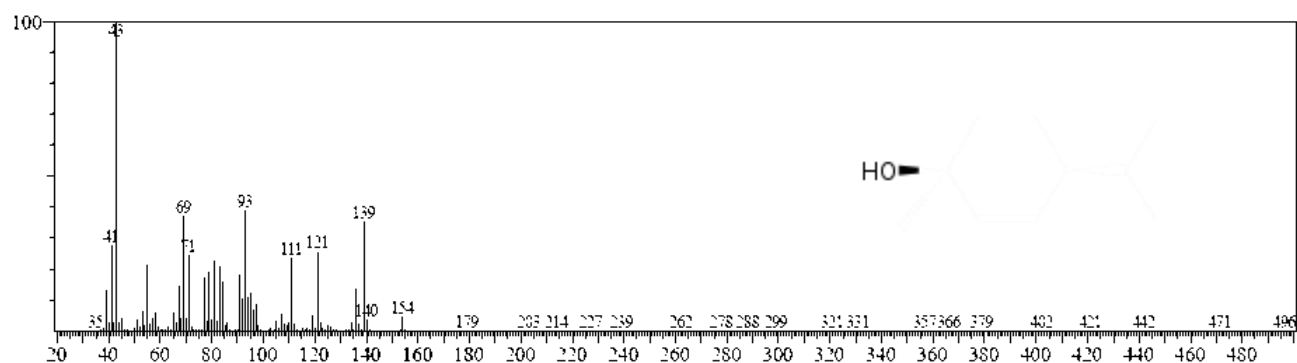
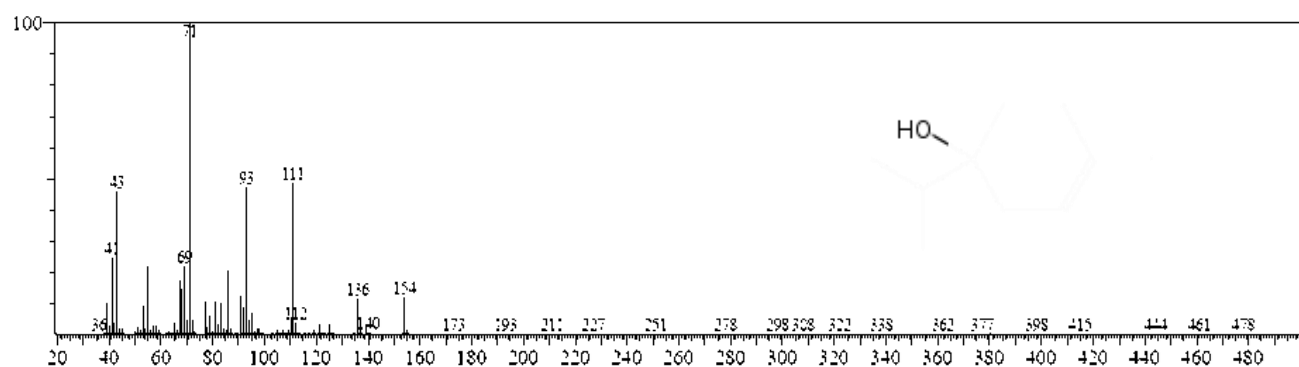
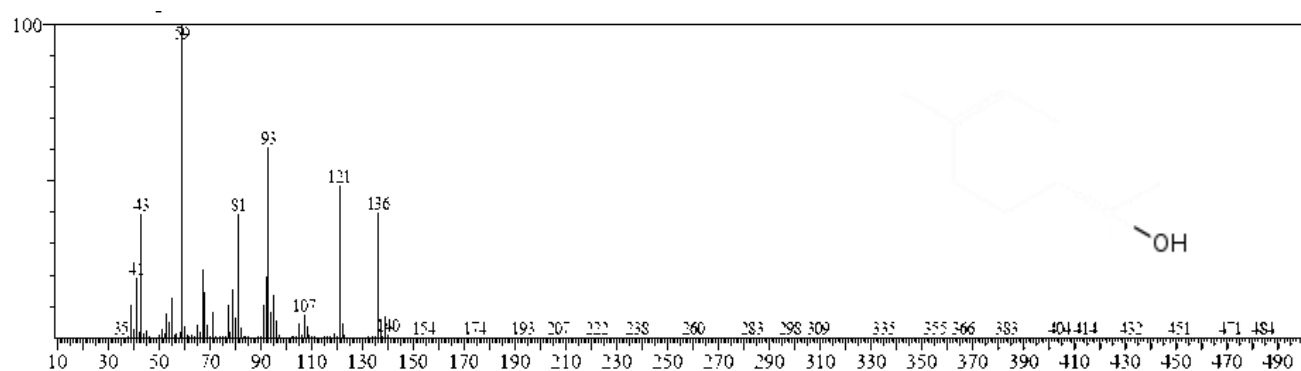
Figura 16 – Espectro de massas do cis-2-Menthenol**Figura 17** – Espectro de massas do Terpinen-4-ol**Figura 18** – Espectro de massas do α -Terpineol

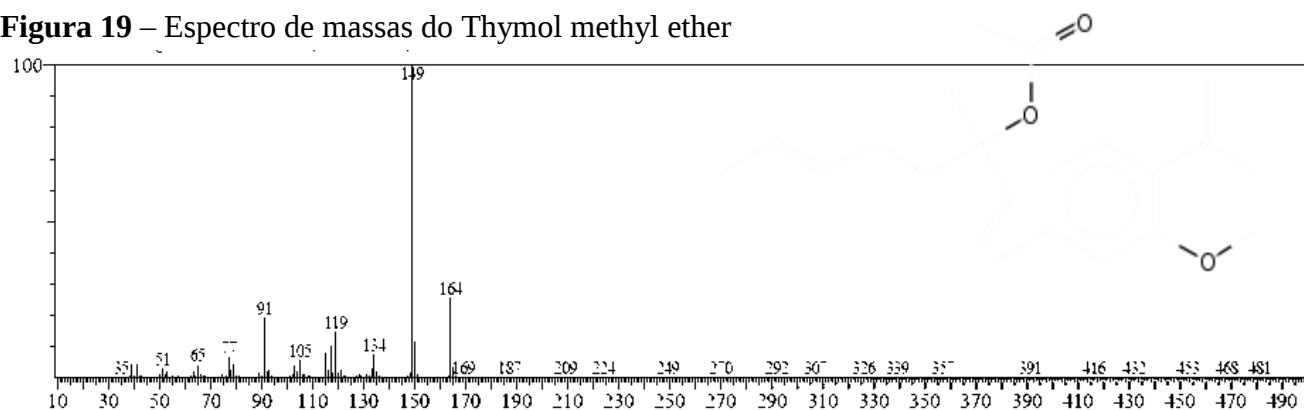
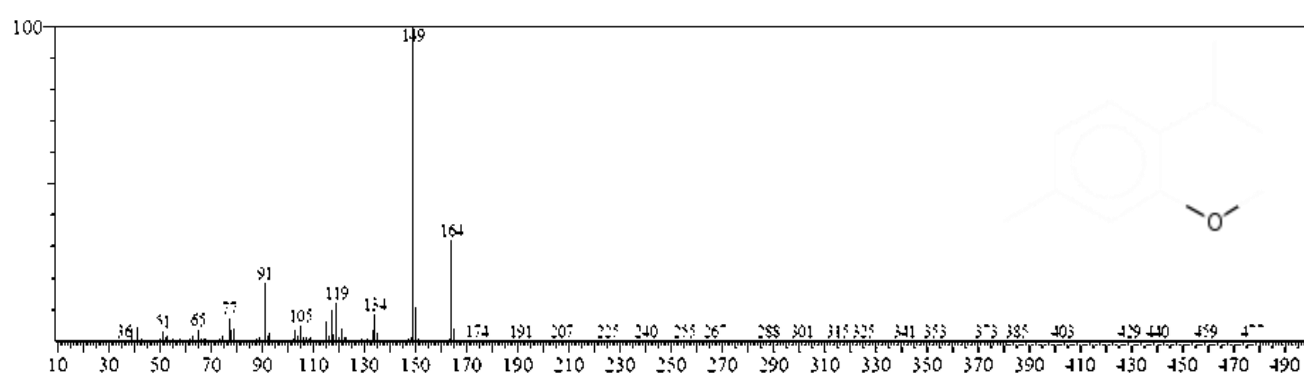
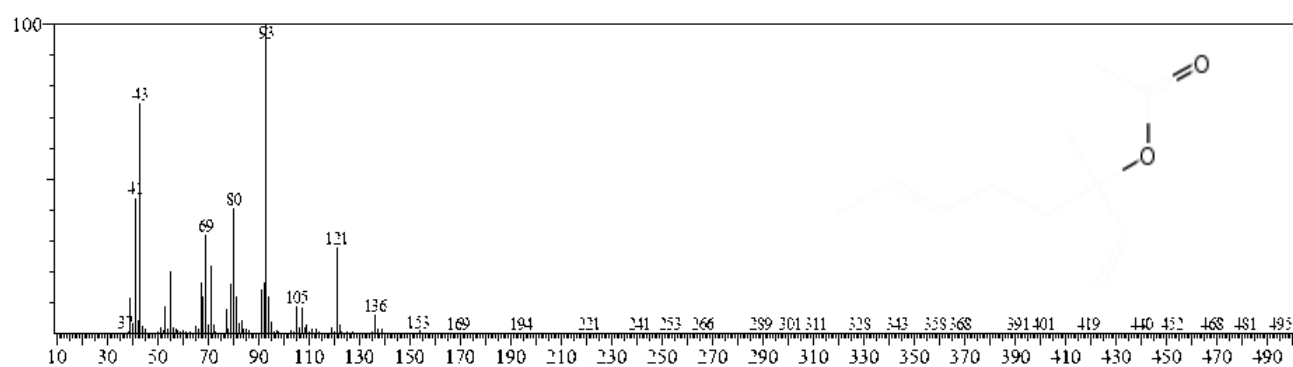
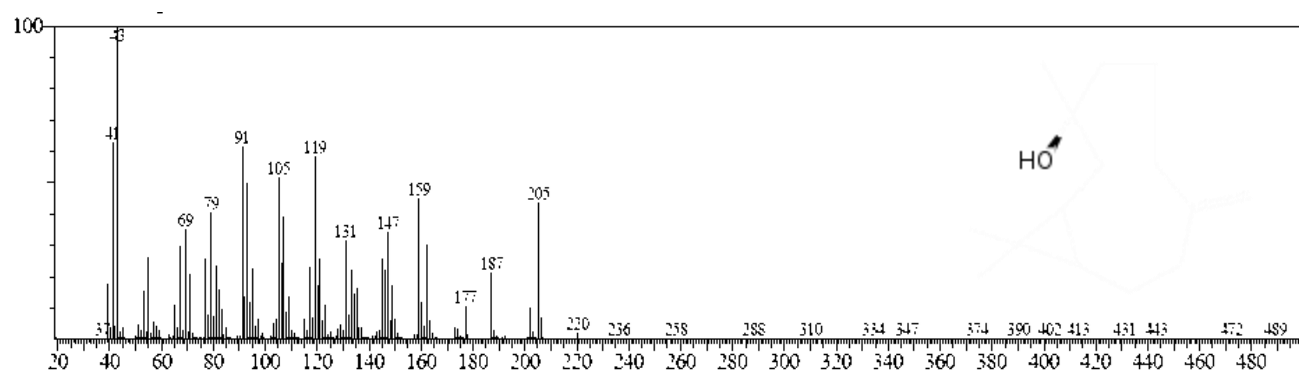
Figura 19 – Espectro de massas do Thymol methyl ether**Figura 20** – Espectro de massas do 3-Methoxy-p-cymene**Figura 21** – Espectro de massas do Linalool acetate

Figura 26 – Espectro de massas do Espatululol

ANEXO IV – TESTE DE ACEITAÇÃO

Nome: _____ **Data:** __/__/____

Faixa etária: () <20 anos () 20 a 29 anos () 30 a 39 anos () 40 a 50 anos () >50 anos

Formação: () Ensino médio C. () Superior INC. () Superior C. () Pós-graduando

Você está recebendo 4 (quatro) amostras de hambúrguer bovino com adição de óleos essenciais. Prove as amostras da esquerda para direita e atribua um valor correspondente à escala para cada atributo avaliado.

Escala Hedônica

- 9 - Gostei muitíssimo
- 8 - Gostei muito
- 7 - Gostei moderadamente
- 6 - Gostei ligeiramente
- 5 - Não gostei/nem desgostei
- 4 - Desgostei ligeiramente
- 3 - Desgostei moderadamente
- 2 - Desgostei muito
- 1 - Desgostei muitíssimo

CÓDIGO DA AMOSTRA	APARÊNCIA	AROMA	TEXTURA	SABOR	ACEITAÇÃO GLOBAL

Comentário:

Intenção de compra

Indique a intenção de compra das amostras de acordo com a escala abaixo:

- 5 – Certamente compraria
- 4 – Provavelmente compraria
- 3 – Talvez comprasse/talvez não comprasse
- 2 – Provavelmente não compraria
- 1 – Certamente não compraria

AMOSTRA	VALOR DA ESCALA