



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO  
DOUTORADO**

**EVANDRO LEITE DE SOUZA**

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO  
(*Origanum vulgare* L.): UMA ABORDAGEM PARA USO EM SISTEMAS DE  
CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS**

**RECIFE – PE  
2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**EVANDRO LEITE DE SOUZA**

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO  
(*Origanum vulgare* L.): UMA ABORDAGEM PARA USO EM SISTEMAS DE  
CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS**

**RECIFE – PE**

**2006**

**EVANDRO LEITE DE SOUZA**

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO  
(*Origanum vulgare* L.): UMA ABORDAGEM PARA USO EM SISTEMAS DE  
CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Pernambuco em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nutrição, área de concentração de Ciência de Alimentos.**

**Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Lúcia Montenegro Stamford**

**Co-orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edeltrudes de Oliveira Lima**

**RECIFE – PE**

**2006**

**Souza, Evandro Leite de**

**Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) : uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos / Evandro Leite de Souza. – Recife : O Autor, 2006.**

**134 folhas ; il., quadros., tab., fig.**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2006.**

**Inclui bibliografia.**

**1. Nutrição – Ciência dos alimentos. 2. Microbiologia dos alimentos – Óleos essenciais. 3. Conservação de alimentos – *Origanum vulgare* L. – Atividade antimicrobiana – Composição química – Estabilidade térmica. I. Título.**

**612.39  
612.3**

**CDU (2.ed.)  
CDD (22.ed.)**

**UFPE  
BC2006-135**

**EVANDRO LEITE DE SOUZA**

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO  
(*Origanum vulgare* L.): UMA ABORDAGEM PARA USO EM SISTEMAS DE  
CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS**

**Tese de doutorado aprovada por distinção em 10 de março de 2006.**

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Prof. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima  
Presidente da banca examinadora**



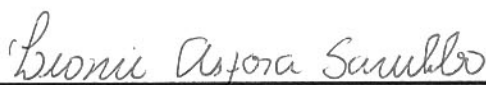
---

**Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior  
Examinador**



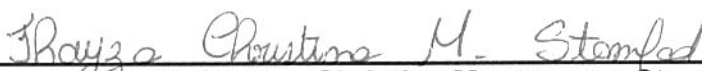
---

**Prof. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga  
Examinadora**



---

**Prof. Dra. Leonie Asfora Sarubbo  
Examinadora**



---

**Prof. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford  
Examinador**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, interminável fonte de força e luz na continua busca dos objetivos e anseios da minha vida, minha silenciosa, porém não menos intensa gratidão;

À Fabíola Moreira Casimiro de Oliveira, companheira, incentivadora, e acima de tudo fonte de amor e conforto na nossa recente história de vida conjunta;

Aos meus pais, Lourival Alves de Souza e Maria do Socorro Leite de Souza, que me deram à oportunidade de entrada no mundo da aquisição do saber;

Aos meus avós, pela simplicidade, responsabilidade, afeto e pelo amor constante;

À professora Dr<sup>a</sup>. Tânia Lúcia Montenegro Stamford pela confiança depositada durante o período deste curso, pelo exemplo de responsabilidade, pelos conselhos, pela amizade conquistada, e finalmente, pela orientação na execução deste trabalho;

À professora Dr<sup>a</sup>. Edeltrudes de Oliveira Lima, verdadeiro símbolo de dinamismo, responsabilidade e eficiência, pela ajuda na viabilização da realização desta pesquisa, e principalmente pela amizade conquistada;

Ao graduando de Farmácia Vinícius Nogueira Trajano pelo auxílio durante os ensaios antimicrobianos pertinentes a este trabalho;

Ao prof. Dr. Eduardo Oliveira de Jesus, LTF/CCS/UFPB pelo auxílio na disponibilização das instalações laboratoriais e equipamentos para o tratamento térmico do óleo essencial;

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, LTF/CCS/UFPB pelo auxílio na viabilização das análises de GC-MS relacionadas com a determinação da constituição do óleo essencial;

À Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques do Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica/Instituto Agronômico, Campinas, SP pela realização das análises de GC-MS de determinação da composição do óleo essencial ;

À Profa. Dra. Zélia Braz Pontes, Neuza Oliveira, Fátima Peixoto e Simone Cristina Pereira Brito do Laboratório de Micologia, DCF/CCS/UFPB, pela gentileza que sempre me receberam durante as análises e pelo convívio durante o período do experimento;

Ao Prof. Dr. Raul Manhães de Castro, pela confiança no meu trabalho e compreensão que sempre me desprendeu;

À Profa. Dra. Janeth Magali do Instituto de Antibióticos/UFPE pelo fornecimento de algumas cepas bacterianas utilizadas no estudo;

À Profa. Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima do Departamento de Micologia/UFPE pelo pronto fornecimento de algumas cepas fúngicas utilizadas no estudo;

Ao prof. Dr. Ivano de Fillipis do INCQS/FIOCRUZ que mesmo a distância nos atendeu prontamente na solicitação de cepas microbianas para inserção no estudo;

À Sra. Necí pela presteza e cordialidade sempre mostrado quando da necessidade de seus trabalhos da Secretaria do Programa de Pós-graduação em Nutrição;

Às professoras Dra. Marta Suely Madruga, Dra. Rita de Cássia Queiroga e Dra. Silvana Gonçalves Brito pelo apoio no início dos contatos como o Programa de



Pós-graduação em Nutrição/UFPE, bem como pelo incentivo na busca pela obtenção do doutorado;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Nutrição pelos saberes repassados na condução das disciplinas do doutorado;

Aos colegas da turma do doutorado pela amizade formada, e pelos bons momentos de diálogo;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.

## Resumo

*Origanum vulgare* L. (orégano) têm sido reconhecido como uma espécie vegetal possuidora de várias propriedades terapêuticas, de modo que atualmente seu potencial antimicrobiano vem recebendo um grande interesse científico. Este estudo objetivou analisar a efetividade do óleo essencial de *O. vulgare* em inibir o crescimento de cepas de microrganismos de interesse em alimentos, bem como avaliar a interferência de diferentes tratamentos térmicos sobre a sua efetividade antimicrobiana e composição química. O *screening* do potencial antimicrobiano do óleo essencial foi realizado através da técnica de difusão em meio sólido, a Concentração Inibitória Mínima-CIM foi determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição, enquanto a avaliação da interferência da CIM sobre a viabilidade microbiana foi realizada através da contagem de células viáveis em placa. A identificação e quantificação dos componentes do óleo essencial foram realizadas através de cromatografia gasosa – espectrometria de massa. O óleo essencial de *O. vulgare* mostrou proeminente poder de inibição do crescimento de todas as cepas microbianas ensaiadas. Os valores de CIM oscilaram entre 80 e 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  quando determinada através da técnica de difusão em meio sólido, enquanto o método da microdiluição mostrou valores de CIM entre 5 e 0.62  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . A CIM determinada pela técnica de difusão em meio sólido foi capaz de causar significativa ( $p < 0,05$ ) efeito inibitório da viabilidade de todas as cepas de bactéria e de leveduras ensaiadas. De outra forma, a CIM determinada pela técnica de microdiluição não mostrou eficiência na inibição da viabilidade da maioria das cepas ensaiadas. O óleo essencial em diferentes concentrações (80, 40, 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) mostrou capacidade de inibição da microbiota autóctone de carne moída armazenada sob refrigeração. A exposição do óleo essencial a diferentes tratamentos térmicos (temperatura ambiente, 60, 80, 100, 120°C/1hora) não apresentou interferência ( $p < 0,05$ ) sobre seu potencial antimicrobiano e composição química. A análise da composição do óleo essencial mostrou uma predominância de terpenos e compostos terpênicos, apresentando carvacrol e *p*-cimeno como componentes majoritários. Conclui-se, que o óleo essencial de *O. vulgare* apresenta-se como uma potencial fonte de agentes antimicrobianos para uso na conservação de alimentos.

**Palavras-chave:** *Origanum vulgare* L.. Óleo essencial. Bactérias. Leveduras. Atividade antimicrobiana.

## Abstract

*Origanum vulgare* L. (oregano) has been known as plant specie with several therapeutic properties and currently its antimicrobial potential has received a great scientific interest. This study aimed to analyze the effectiveness of *Origanum vulgare* essential oil in inhibiting the growth/survival of food related bacteria and yeasts strains, as well as to evaluate the heating interference on the antimicrobial effectiveness and essential oil chemical composition. The antimicrobial activity screening was carried out by solid medium diffusion technique, the MIC was determined by solid medium diffusion and microdilution technique, while the evaluation of the MIC interference on the microbial viability was performed by viable cell count. The essential oil components were identified and quantified by gas chromatography–mass spectrometry. *O. vulgare* essential oil showed prominent inhibitory activity on the growth of all microbial assayed strains. MIC values oscillated between 80 and 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  when determined by solid medium diffusion method, while the microdilution method showed MIC values between 5 and 0.62  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . MIC determined by solid medium diffusion method was able to cause significant ( $p < 0.05$ ) inhibitory effect on the viability of the all assayed bacteria and yeasts strains. On the other hand, the MIC determined by microdilution method did not show effectiveness in inhibiting the viability of the most microbial strains. The essential oil at different concentrations (80, 40, 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) was able to inhibit the autochthonous microbiota of ground meat stored under refrigeration. The exposure of the essential oil to different thermal treatments (room temperature, 60, 80, 100, 120°C) presented no difference ( $p < 0.05$ ) on its antimicrobial potential and chemical composition. The essential oil composition analysis showed high amount of terpenes and terpenic compounds presenting carvacrol and *p*-cimene as majority compounds. It is concluded that *O. vulgare* essential oil presents as potential source of antimicrobial compounds for use in food conservation.

**Key-words:** *Origanum vulgare* L.. Essential oil. Bacteria. Yeasts. Antimicrobial activity.

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1</b> - Vantagens e possíveis desvantagens de algumas novas técnicas de conservação de alimentos	29
<b>Quadro 2</b> - Propriedades medicinais de algumas especiarias	40
<b>Quadro 3</b> - Principais componentes de alguns óleos essenciais de especiarias possuidoras de propriedades antimicrobianas	43
<b>Quadro 4</b> - Informações técnicas relacionadas ao controle de qualidade do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L.	52

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

- Figura 1** - Visualização do vegetal *Origanum vulgare* L. (a: vegetal na natureza; b: vegetal apresentado em pintura botânica) 26
- Figura 2** - Estrutura molecular de alguns constituintes presentes em óleos essenciais de especiarias 49
- Figura 3** - Óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (a: óleo essencial em embalagem fornecida forma fornecida pelo fabricante; b: aspecto visual) 53
- Figura 4** - *Screening* da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre cepas de bactérias de interesse em alimentos (resultados expressos em diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano) 67
- Figura 5** - *Screening* da atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o crescimento de *Shigella flexneri* 68
- Figura 6** - *Sreening* da atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o crescimento de *Salmonella enterica* 68
- Figura 7** - *Screening* da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre cepas de leveduras de interesse em alimentos (resultados expressos em diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano) 70

- Figura 8** - *Screening* da atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o crescimento de *Candida albicans* 71
- Figura 9** - *Screening* da atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o crescimento de *Candida krusei* 71
- Figura 10** - Atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em diferentes concentrações (160–1,25µL/mL) sobre *Yersinia enterocolitica* determinada através da técnica de difusão em meio sólido 74
- Figura 11** - Atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em diferentes concentrações (160–1,25µL/mL) sobre *Bacillus cereus* determinada através da técnica de difusão em meio sólido 75
- Figura 12** - Atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em diferentes concentrações (160–1,25µL/mL) sobre *Serratia mercencens* determinada através da técnica de difusão em meio sólido 75
- Figura 13** – Atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em diferentes concentrações (160–1,25µL/mL) sobre *Candida albicans* determinada através da técnica de difusão em meio sólido 78
- Figura 14** - Atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* em diferentes concentrações (160–1,25µL/mL) sobre *Candida krusei* determinada através da técnica de difusão em meio sólido 79

- Figura 15** - Atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em diferentes concentrações (160 – 1.25µLmL) sobre *Pichia ohmeri* determinada através da técnica de difusão em meio sólido 79
- Figura 16** - Placa de microdiluição utilizada na determinação da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre cepas de bactérias de interesse em alimentos 83
- Figura 17** - Placa de microdiluição utilizada na determinação da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre cepas de leveduras de interesse em alimentos 84
- Figura 18** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Staphylococcus aureus* 89
- Figura 19** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Bacillus cereus* 89
- Figura 20** – Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Salmonella enterica* 90
- Figura 21** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Echerichia coli* 90

- Figura 22** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Serratia mercencens* 91
- Figura 23** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Yersinia enterocolitica* 91
- Figura 24** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Candida albicans* 96
- Figura 25** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Candida krusei* 96
- Figura 26** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Candida tropicalis* 97
- Figura 27** - Cromatograma dos íons totais do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. exposto à temperatura ambiente por 1 hora 111
- Figura 28** - Cromatograma dos íons totais do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. exposto a 60°C por 1 hora 112



- Figura 29** - Cromatograma dos íons totais do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. exposto a 80°C por 1 hora 113
- Figura 30** - Cromatograma dos íons totais do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. exposto a 100°C por 1 hora 114
- Figura 31** - Cromatograma dos íons totais do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. exposto a 120°C por 1 hora 115

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1** – Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre bactérias de interesse de alimentos determinada através da técnica de difusão em meio sólido 73
- Tabela 2** – Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre cepas de leveduras de interesse de alimentos determinada através da técnica de difusão em meio sólido 78
- Tabela 3** – Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre bactérias de interesse de alimentos determinada através da técnica de microdiluição 82
- Tabela 4** – Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre leveduras de interesse em alimentos determinada através da técnica de microdiluição 84
- Tabela 5** - Percentual de inibição do número de células viáveis de bactérias (UFC/mL) de interesse em alimentos frente à CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada pela técnica de difusão em meio sólido e microdiluição em relação ao experimento controle 98
- Tabela 6** - Percentual de inibição do número de células viáveis (UFC/mL) de leveduras de interesse em alimentos frente à CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada pela técnica de difusão em meio sólido e

microdiluição em relação ao experimento controle	99
<b>Tabela 7</b> - Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. sobre o número de bactérias aeróbias mesófilas e/ou anaeróbias facultativas viáveis (UFC/g) em carne moída armazenada sob refrigeração	102
<b>Tabela 8</b> - Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. sobre o número de fungos filamentosos e leveduriformes (UFC/g) em carne moída armazenada sob refrigeração	102
<b>Tabela 9</b> - Inibição percentual do número (UFC/g) de bactérias aeróbias mesófilas e/ou anaeróbias facultativas viáveis e de fungos filamentosos e leveduriformes em carne moída armazenada sob refrigeração causada por diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. em relação ao experimento controle	104
<b>Tabela 10</b> - CIM do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. após exposição a diferentes temperaturas sobre microrganismos de interesse em alimentos	108
<b>Tabela 11</b> - Composição qualitativa e quantitativa do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. após exposição a diferentes temperaturas	110

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS .....	23
2.1 Objetivo geral .....	23
2.2 Objetivos específicos .....	24
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	30
3.1 Aspectos botânicos e terapêuticos de <i>Origanum vulgare</i> L.....	24
3.2 Novas tendências na produção de alimentos .....	27
3.3 Alimentos como substratos para o crescimento microbiano .....	32
3.4 Caracterização das especiarias e seu potencial antimicrobiano .....	38
3.5 Propriedades antimicrobianas de especiarias.....	44
3.6 Considerações sobre a qualidade microbiológica de especiarias .....	50
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	52
4.1 Obtenção do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. ....	52
4.2 Cepas microbianas .....	54
4.3 Ensaio de atividade antimicrobiana .....	56
4.3.1 <i>Screening</i> .....	56
4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM .....	57
4.3.2.1 Preparo das soluções do óleo essencial .....	57
4.3.2.2 Determinação da CIM através da técnica de difusão em meio sólido ...	57
4.3.2.3 Determinação da CIM através da técnica de microdiluição .....	58
4.3.3 Efeito da CIM sobre a viabilidade da célula microbiana .....	60

4.3.4 Ação antimicrobiana óleo essencial de <i>O. vulgare</i> em microsistema de conservação de alimentos .....	61
4.4 Interferência do tratamento térmico sobre a composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> .....	62
4.5 Análise estatística .....	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
6 CONCLUSÕES .....	119
REFERÊNCIAS.....	121

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de conservação de alimentos busca a obtenção de um produto final que seja possuidor de uma alta qualidade nutricional atrelada a uma longa vida útil. Durante os últimos cinquenta anos, a proteção de alimentos contra microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos tem despertado grande interesse, de modo que neste período a produção de alimentos microbiologicamente estáveis vem sendo alcançada através do uso de vários procedimentos de natureza física ou química (BENKEBLIA, 2004).

O controle do crescimento microbiano em alimentos objetiva uma eliminação total ou parcial de microrganismos que venham a alterar suas características organolépticas e/ou que atuem como causadores de doenças. Para tal, faz-se uso de ácidos orgânicos fracos (ácido láctico, benzóico, sórbico, cítrico), peróxido de hidrogênio, agentes quelantes (ácido cítrico, sais de cálcio e de sódio, ácido etilenodiaminotetracético-EDTA) e biomoléculas orgânicas, entre outros artifícios químicos (modulação do potencial de óxido-redução, da pressão osmótica) e físicos (temperatura, embalagens) (BRULL; COOTE, 1999).

Nas últimas décadas o processo de conservação de alimentos tem se tornado um tanto complexo, pois na perspectiva dos consumidores requer-se alimentos mais naturais, mais saudáveis, frescos, livres de aditivos sintéticos, com menor quantidade de sal, açúcar, gordura e ácidos, tendo sido submetidos ao menor processamento possível, entretanto, apresentando a conveniência de possuir longa vida útil e, principalmente, de apresentarem-se inócuos ao consumidor (BEDIN et al., 1999). Ainda, a legislação de alimentos tem progressivamente restringido e/ou

limitado o uso de alguns conservantes químicos utilizados atualmente em diferentes alimentos, de modo que tal restrição tem criado problemas para a indústria de alimentos, pois a susceptibilidade de alguns microrganismos frente a certos antimicrobianos sintéticos clássicos tem diminuído (LEUSCHNER; ZAMPARINI, 2002).

O uso descontrolado de antimicrobianos sintéticos tem sido responsável pelo surgimento de cepas microbianas progressivamente mais resistentes a diferentes compostos antimicrobianos. Resistência antibiótica em patógenos veiculados por alimentos é uma realidade, embora substanciais diferenças qualitativas e quantitativas venham sendo observadas (TEUBER, 1999; KIESSLING et al., 2002). Vários autores reportam sobre o crescente número de isolamentos de cepas microbianas resistentes aos tradicionais procedimentos antimicrobianos aplicados pela indústria de alimentos (BRULL; COOTE, 1999; BURT, 2004).

Este panorama evidencia uma necessidade de desenvolvimento de novos meios de alcance da segurança microbiológica em alimentos, os quais poderiam, possivelmente, ser aplicados em combinação com procedimentos pré-existentes. Assim, os elementos vegetais possuidores de propriedades antimicrobianas têm, notadamente, recebido ênfase em um possível uso racional na conservação de alimentos (KIZIL; SOGUT, 2003). Destacam-se por sua vez, as especiarias, que em soma a sua ação provedora de características organolépticas próprias aos alimentos, podem vir a desempenhar uma ação inibitória sobre o crescimento microbiano nestes substratos (TASSOU et al., 2000). Neste renovado interesse, *Origanum vulgare* L., seja na sua forma *in natura*, de folhas secas ou de produtos derivados, tem apresentado-se como interessante fonte de agentes antimicrobianos (JUGLAL et al., 2002; DAFERERA et al., 2003).

Frente ao reconhecido potencial antimicrobiano das especiarias, bem como considerando a pressão dos órgãos legisladores e do consumidor sobre a indústria de alimentos exigindo a adoção de alternativas mais naturais de controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, com conseqüente eliminação parcial ou total da adição de conservantes químicos em seus produtos, justifica-se a execução deste estudo enfatizando o poder antimicrobiano do óleo essencial da especiaria *Origanum vulgare* L. Desta forma, um estudo desta natureza, viria a subsidiar o possível uso racional desta especiaria e seus subprodutos como alternativas de inserção em sistemas de conservação de alimentos, tendo interveniência no tipo e na quantidade de microrganismos presentes nestes substratos, além de agirem de forma concomitante como provedores de caracteres organolépticos particulares.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Identificar os constituintes químicos do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e avaliar a sua efetividade na inibição do crescimento de cepas de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes de interesse em alimentos.

### 2.2 Objetivos específicos

✓ Verificar a sensibilidade de cepas de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes de interesse em alimentos frente à ação do óleo essencial de *O. vulgare* L.;

✓ Determinar a concentração inibitória mínima do óleo essencial de *O. vulgare* L. sobre as cepas ensaiadas;

✓ Verificar o efeito da concentração inibitória mínima do óleo essencial de *O. vulgare* L. sobre a viabilidade das cepas microbianas utilizadas como microrganismos testes;

✓ Analisar a efetividade do óleo essencial de *O. vulgare* L. na inibição da sobrevivência microbiana em microsistema de conservação de alimentos;

✓ Observar a interferência de diferentes tratamentos térmicos sobre a composição química e efetividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* L.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Aspectos botânicos e terapêuticos de *Origanum vulgare* L.

O gênero *Origanum* é uma erva perene na forma de arbusto e nativa das regiões Euro-Siberiana e Irano-Siberiana, sendo atualmente reconhecidas 38 espécies em todo o mundo (ALIGIANIS et al., 2001). Espécies pertencentes ao gênero *Origanum* crescem abundantemente em áreas pedregosas e em montanhas rochosas em uma ampla faixa de altitude (0-400m) (GUNER et al., 2000).

A espécie *Origanum vulgare* L. possui a seguinte ordem taxonômica hierárquica (FOREY; LINDSAY, 1996):

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta - plantas vasculares

Superdivisão: Espermatófita – plantas com sementes

Divisão: Magnoliófitas – plantas floríferas

Classe: Magnoliopsida - dicotiledôneas

Subclasse: Asteridae

Ordem: Lamiales

Família: Lamiaceae

Gênero: *Origanum*

Espécie: *Origanum vulgare* L.

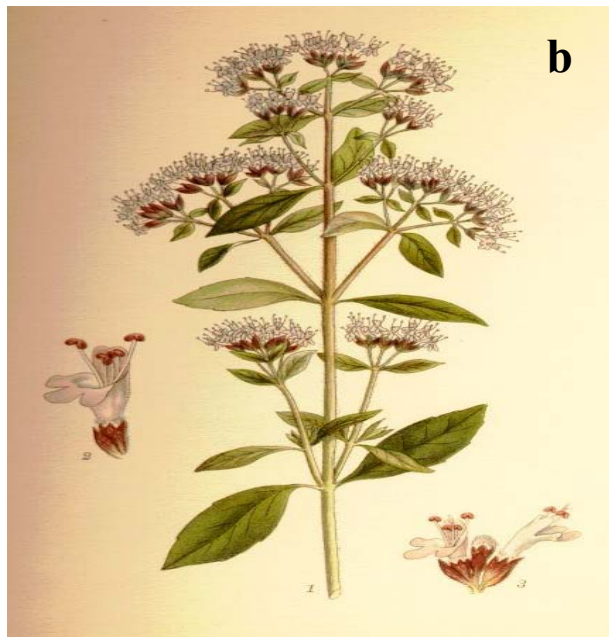
*O. vulgare* L. possui como sinonímia popular ou nome vulgar orégano, sendo também conhecido por manjerona selvagem. Apresenta-se como espécie nativa do mediterrâneo, sendo hoje cultivada na Europa, América e Ásia.

Caracteriza-se como uma planta vivaz aromática, com numerosos caules eretos quadrangulares pilosos, além de folhas ovaladas opostas e minúsculas flores terminais com coloração roxa ou cor-de-rosa dispostas em pequenos ramos compactos. A planta pode atingir até 90 cm de altura e cresce mais satisfatoriamente nas pradarias secas, em declives relvados, matagais e sob terrenos calcários (Figura 2). O vegetal apresenta odor herbáceo, amadeirado e levemente picante (LORENZI, 1991; FOREY; LINDSAY, 1996).

Devido sua ampla variedade de características químicas e de aroma, *O. vulgare* tem sido amplamente utilizados como insumo na indústria farmacêutica e cosmética, como erva culinária, como flavorizante de alimentos, em bebidas alcoólicas e em perfumaria na obtenção de fragrâncias picantes (SIVROPOULOU et al., 1996; NOVAK et al., 2000). Estudos têm mostrado que as propriedades biológicas de espécies de *Origanum* podem variar de acordo com a técnica de cultivo, origem, estágio vegetativo e a estação de coleta do material vegetal (MILOS et al., 2000).

As folhas secas e o óleo essencial de *O. vulgare* são usados medicinalmente por vários séculos em diferentes partes do mundo, de forma que o seu efeito positivo sobre a saúde humana tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes na erva e conseqüentemente em seus produtos derivados (CERVATO et al., 2000; HERNÁNDEZ et al., 2003). *O. vulgare* tem mostrado possuir propriedade analgésica, anti-reumática, antiespasmódica, anti-séptica, estimulante do apetite, carminativa, desinfetante, expectorante, laxante, parasiticida, tônico estomacal, hepatoestimulante, sudorífera, entre outros efeitos terapêuticos. Cortes e feridas infeccionadas podem reagir favoravelmente ao seu uso, bem como parece

ser benéfico para o tratamento de pediculose (infecção dérmica causada por parasitas) (LAVABRE, 1992; MATOS, 1994; SELLAR, 2002).



**Figura 1** - Visualização do vegetal *Origanum vulgare* L. (a: vegetal na natureza; b: vegetal apresentado em pintura botânica)

### 3.2 Novas tendências na produção de alimentos

No sistema de produção de alimentos, torna-se fundamental que medidas sejam tomadas para que seja assegurada a inocuidade e estabilidade dos seus produtos finais durante toda a sua vida de prateleira. Na indústria de alimentos, sabe-se que a conservação química limita a condição de “alimento natural”, embora, seja reconhecida como um dos elementos fundamentais na questão da segurança alimentar (BEDIN et al., 1999).

A conservação de alimentos tem progressivamente se tornado mais complexa, pois ocorre um contínuo surgimento de novos alimentos no mercado requerendo longa e estável vida de prateleira, além de um alto grau de proteção contra microrganismos patogênicos (MARINO et al., 2001). Deve-se, também, considerar a demanda dos consumidores por alimentos mais naturais, caracterizados por se apresentarem livres ou com baixos níveis de aditivos químicos e com um baixo impacto sobre o meio ambiente (DEVLIEGHERE et al., 2004).

A preocupação do consumidor se estende a um número cada vez maior de questões relacionadas com todas as fases da cadeia de produção de alimentos, envolvendo desde a produção da matéria-prima, sua industrialização, distribuição e comercialização. Assim, questiona-se a respeito da integridade do ambiente no qual o alimento foi produzido, sobre a utilização de substâncias químicas ou biológicas aplicadas no seu processamento, sobre os materiais com os quais foram fabricadas suas embalagens, bem como sobre o risco representado à saúde do consumidor (PANETTA, 2005).

Frente ao conhecimento que alguns preservativos químicos são suspeitos ou são tóxicos aos consumidores, tem ocorrido um aumento da pressão sobre a

indústria alimentícia para uma progressiva remoção destes compostos, e conseqüente adoção de alternativas mais naturais para obtenção dos seus propósitos (SOUZA et al., 2005). Neste cenário, surge uma nova discussão sobre opções inovadoras e emergentes para o alcance da segurança microbiológica dos alimentos, a citar o uso de embalagens ativas, bacteriocinas, culturas protetoras e compostos naturais (extratos, óleos essenciais, quitosana) (ROLLER; COVIL, 1999; DIAZ et al., 2002; DEVLIEGHERE et al., 2004).

Existe uma tendência de combinação de vários tratamentos subletais, utilizando-se de novos agentes antimicrobianos em uma aplicação conjunta com agentes já empregados, porém com um uso mais amenizado, proporcionando a segurança microbiológica exigida pelos consumidores e pela legislação de alimentos (LANCIOTTI et al., 2004). O Quadro 1 mostra algumas vantagens e desvantagens apresentadas por algumas novas técnicas de conservação de alimentos.

Gould (1995) citado por Burt (2004) relata sobre o emprego de um novo método de conservação de alimentos chamado de “sistema antimicrobiano natural”. Este sistema baseia-se na aplicação do sinergismo ou conjunto de forças de vários elementos, dentre eles os compostos de origem animal, microbiana e/ou vegetal possuidores de atividade antimicrobiana, somados aos processos de natureza física de empacotamento, manufatura e armazenamento de alimentos, os quais em um uso associado poderiam proporcionar a formação de um ambiente inóspito ao crescimento e sobrevivência microbiana.

**Quadro 1** - Vantagens e desvantagens de algumas novas técnicas de conservação de alimentos

Novas técnicas de conservação	Vantagens	Desvantagens
Embalagem ativa	“Caçadores” de oxigênio em sachês têm apresentado boa efetividade; Fácil processamento.	Caçadores de oxigênio incorporados em filmes de embalagem mostram frequentemente limitada eficácia; Quantidade de compostos ativos que migram para o alimento pode ser frequentemente não substancial; Compostos ativos devem ser termoestáveis quando incorporados em filmes plásticos.
Compostos antimicrobianos naturais	Rotulagem verde; Imagem natural.	Frequentemente apresentam alto custo de obtenção; Interação com ingredientes dos alimentos; Baixa solubilidade em água; Mudança das propriedades organolépticas dos alimentos.
Bacteriocinas	Imagem natural.	Estreito espectro de atividade; Limitada difusão em matriz sólida; Inativação por enzimas proteolíticas; Interação com ingredientes dos alimentos; Resistência bacteriana.
Culturas protetoras	Rotulagem verde; Imagem natural.	Difícil aplicação; Instabilidade ao calor; Efetividade não reproduzida em alimentos.

FONTE: Devlieghere et al. (2004)

Particularmente, a resistência microbiana mostra-se como um importante aspecto impulsionador da busca de novos compostos antimicrobianos potenciais de uso em alimentos. Mudanças no alvo do antimicrobiano, inativação do antimicrobiano por enzimas, mudanças na permeabilidade celular, efluxo ativo do antimicrobiano e superprodução de enzimas-alvo são exemplos de mecanismos de resistência antimicrobiana (McKEEGAN et al., 2002). Resistência antimicrobiana é reconhecidamente uma consequência inevitável da pressão do amplo uso de antimicrobianos em todos os campos do controle do crescimento de microrganismos, portanto, apresenta-se previsível e inevitável. Entretanto, este fenômeno poderia ser possivelmente administrado ou, pelo menos, suavizado através do uso racional de antimicrobianos (BANERJEE; SAKAR, 2004).

Brull e Coote (1999) relatam resistência de microrganismos deteriorantes e patogênicos frente a alguns antimicrobianos usados para a conservação de alimentos como ácidos orgânicos fracos, peróxido de hidrogênio e agentes quelantes. Ainda, tem sido verificado o isolamento de cepas de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Shigella* de origem alimentar com padrão de resistência a diferentes antibióticos de uso clínico como ampicilina, bacitracina, cefalotina, cloranfenicol, ciproflaxin, eritromicina e metronidazol (BANERJEE; SAKAR, 2004). Estes antibióticos são utilizados em alimentos de origem animal com propostas de controle e tratamento de doenças infecciosas de origem bacteriana, bem como para promoção de crescimento (WHITE et al., 2002).

Uma consequência indesejável do amplo uso de antimicrobianos é o potencial desenvolvimento de patógenos bacterianos zoonóticos como *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria*



*monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, com subsequente possível transmissão para humanos como contaminantes de alimentos (FEY et al., 2000; THEREFALL, 2000; WINOKUR et al., 2000).

Torna-se fascinante para a ciência de alimentos a possibilidade da descoberta de antimicrobianos naturais e sua possível aplicação prática na conservação de alimentos, de modo que muitos pesquisadores têm se aprofundado nesta possibilidade tomando como base promissores resultados observados em experimentos *in vitro* (PRASAD; SEENAYYA, 2000; JUGLAL et al., 2002; LEMAY et al., 2002). Entretanto, sabe-se que os componentes das matrizes alimentares podem, possivelmente, interagir com os princípios ativos destes potenciais compostos antimicrobianos resultando em moderada a não significativa efetividade antimicrobiana (MENON; GARG, 2001).

Um obstáculo a ser superado na aplicação de novos compostos como conservantes de alimentos consiste na sua aprovação pelos órgãos legisladores da produção de alimentos. Inicialmente, seis princípios gerais devem ser avaliados para o uso de qualquer substância como aditivo alimentar: i) o aditivo proposto deve ser toxicologicamente testado e avaliado em todos os aspectos pertinentes, incluindo efeito acumulativo, sinérgico e potencial; ii) somente aquela substância considerada segura no nível pretendido de inserção deve ser liberada para o uso; iii) todo aditivo alimentar deve ser novamente avaliado quando do surgimento de novas informações acerca de seu uso e segurança; iv) o aditivo deve sempre ser mantido em conformidade com as especificações aprovadas pela Comissão do *Codex Alimentarius*; v) a justificativa do uso do aditivo deve ser baseada nos requisitos da segurança das diferentes características de consumidores, bem como deve apresentar-se como alternativa viável do ponto de vista técnico e econômico; vi) a

aprovação temporária ou permanente do uso do aditivo deve considerar a limitação para alimentos específicos, sua proposta, condições de uso, diminuição dos níveis necessários para alcance dos efeitos desejáveis, ingestão diária para humanos, bem como a provável ingestão de consumidores especiais (CONCON, 1980).

Nos Estados Unidos e em países da Europa vários componentes de óleos essenciais são registrados para uso como flavorizantes em produtos alimentícios. Estes flavorizantes são considerados como não tendo nenhum risco para a saúde dos consumidores, e inclui carvacrol, carvona, cinamaldeído, citral, eugenol, mentol, timol, *p*-cimeno, limoneno, entre outros (STECHINI et al., 1993; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000). Diferentemente, metil eugenol e estragol são considerados tóxicos, e tem sua inclusão em alimentos proibida (BURT, 2004).

Qualquer país que pretenda adicionar um destes componentes em alimentos com qualquer outra proposta que não seja a de flavorizante, deve o considerar como um novo aditivo alimentar. A aprovação do uso destes compostos envolveria, provavelmente, onerosos estudos metabólicos e de segurança, o que poderia causar uma limitação de seu uso. Do ponto de vista legislativo, o uso das especiarias ou de seus óleos essenciais poderiam surgir como alternativas economicamente mais viáveis naqueles países que pretendem fazer uso das propriedades antimicrobianas de tais compostos na conservação de alimentos (SMID; GORRIS, 1999).

### 3.3 Alimentos como substratos para o crescimento microbiano

Os alimentos são substâncias compostas de proteínas, carboidratos e lipídios, todos possíveis substratos nutritivos para um ou mais tipo(s) de microrganismo(s), além de apresentarem microelementos (vitaminas e minerais) que funcionam muitas vezes como fatores de crescimento. Assim, os microrganismos agem utilizando este arsenal de constituintes para manutenção de suas funções metabólicas, crescimento e reprodução (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Este conjunto de substratos sugere facilidade de sobrevivência de microrganismos nestes ambientes, e provável instalação de diversificada população microbiana. Os microrganismos incorporados aos alimentos podem ser originários de diversas fontes como solo, ar, água, manipuladores, trato intestinal de humanos e outros animais, matérias-primas, equipamentos e utensílios (FRAZIER; WESTHOFF, 1996; RAY, 1996).

Para que a multiplicação microbiana em alimentos seja possível, os seguintes elementos devem estar disponíveis: água, fonte de energia (açúcares, álcoois, aminoácidos), fonte de nitrogênio (proteínas, aminoácidos, nucleotídeos, peptídios), vitaminas e sais minerais, além da interveniência de fatores físico-químicos como pH e potencial de óxido-redução (TRABULSI et al., 2002). De forma geral, a habilidade de um microrganismo sobreviver e multiplicar-se em um alimento é determinada pelas características do alimento que o alberga, bem como pelas características do ambiente no qual o alimento está inserido.

O papel dos microrganismos em alimentos pode ser desejável, a exemplo de seu uso como probióticos, no bioprocessamento e bioconservação de alimentos, bem como poder ser indesejável, nos casos da sua ação como agentes

deteriorantes ou como causadores de doenças. Alguns aspectos relacionados com a deterioração microbiana de alimentos, e com a ação de microrganismos como agentes causadores de doenças relacionadas ao consumo de alimentos serão brevemente discutidos a seguir.

O crescimento de microrganismos em alimentos pode vir a causar uma gama de alterações nos seus caracteres organolépticos conduzindo a um estado de impropriedade para o consumo humano. A deterioração microbiana de alimentos pode ocorrer como consequência do crescimento de microrganismos, ou ainda da liberação de enzimas extra ou intracelulares no substrato após lise da célula microbiana (RAY, 1996). Os microrganismos quando presentes no alimento crescem através da utilização de seus constituintes químicos, seja através de via oxidativa ou fermentativa, com a finalidade de obtenção de energia necessária para manutenção da viabilidade da célula microbiana e síntese de componentes celulares (RIEDEL, 2005).

Durante a condução das reações químicas envolvidas na utilização microbiana dos carboidratos (polissacarídeos, oligossacarídeos, monossacarídeos), lipídios (triglicérides, fosfolipídios, ácidos graxos, esteróis), compostos protéicos (proteínas) e compostos nitrogenados não protéicos (peptídeos, aminoácidos, aminas, uréia, creatinina, óxido de trimetilamina) presentes nos alimentos ocorre a formação de vários produtos intermediários e finais, os quais são responsáveis por variadas alterações organolépticas (GRAHAN, 1982).

Alguns dos parâmetros detectáveis associados com a deterioração microbiana de diversos tipos de alimentos são: mudanças na cor (produção de pigmentos ou oxidação de pigmentos naturalmente presentes no alimento); alteração de odor (produção de produtos voláteis); alteração de textura (quebra de

estruturas tissulares decorrente da ação enzimática); formação de limo (produção de dextranas ou grande acúmulo de células microbianas); acumulação de gás (produção de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S); e liberação de líquido (quebra de estruturas celulares de “sustentação” da água de hidratação) (RIEDEL, 2005).

Desde muito tempo, reconhece-se que não se pode ignorar a magnitude das implicações do problema da deterioração microbiana em relação ao suprimento e segurança mundial de alimentos. As perdas de alimentos decorrentes da deterioração microbiana em base mundial chegam a milhões de dólares por ano, e torna-se ainda mais preocupante, a saber, que este fenômeno figura certamente como um maior problema para as populações subdesenvolvidas do que para as populações já desenvolvidas (GRAHAN, 1982).

Bactérias como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, além de alguns gêneros pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, apresentam destaque na deterioração de alimentos por serem possuidores de um variado arsenal enzimático. Dentre os fungos que apresentam maior importância na deterioração de alimentos, pode-se citar as espécies pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Claviceps*, *Trichoderma*, *Scopulariopsis*, *Absidia*, *Candida*, *Pichia*, *Rodhotorula* e *Torulopsis* (FORSYTHE, 2002).

Outra relevante consequência do crescimento microbiano em alimentos consiste na probabilidade da ocorrência das chamadas Doenças Transmitidas por Alimentos - DTAs. DTAs podem ser amplamente divididas em três grupos: aquelas causadas pelo consumo de alimentos contendo microrganismos patogênicos viáveis e/ou suas toxinas pré-formadas; aquelas decorrentes da ingestão de alimentos contendo algas patogênicas, parasitas e/ou suas toxinas pré-formadas; e aquelas

decorrentes de razões outras não relacionadas com a ingestão de patógenos ou de suas toxinas (e.g., ingestão de toxinas naturalmente presentes em alimentos, toxinas formadas em alimentos, agentes químicos tóxicos, alergias alimentares) (RIEDEL, 2005).

Tomando como base o modo de ocorrência da doença, pode-se dividir as DTAs de origem microbiana em três grupos: intoxicações, as quais ocorrem como consequência da ingestão do alimento contendo toxina fúngica ou bacteriana pré-formada; infecções, as quais ocorrem como consequência do consumo de alimentos contaminados com células viáveis de patógenos entéricos; e toxinfecções, as quais ocorrem como resultado do consumo de um grande número de células viáveis de bactérias patogênicas, seguido pela liberação de toxinas em nível intestinal (RAY, 1996).

Nas últimas décadas, as doenças de origem microbiana relacionadas com o consumo de alimentos vem tornando-se a principal preocupação de segurança alimentar entre consumidores e agências reguladoras (WHITE et al, 2002). Estima-se que aproximadamente 30% dos habitantes de países industrializados sofrem de algum tipo de doença de origem microbiana transmitida por alimentos por ano, e que no século 21 pelo menos 2 milhões de pessoas morreram como consequência de doenças diarreicas em todo o mundo. De acordo com dados publicados pelo CDC (Centro para Controle e Prevenção de Doenças, EUA), as doenças microbianas veiculadas por alimentos representam aproximadamente 76 milhões de casos, 325 mil hospitalizações e 5000 mortes a cada ano somente nos Estados Unidos (WHITE et al., 2002; BURT, 2004).

Os sintomas clínicos das DTAs podem variar de moderados quando se observam náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia limitada, bem como

podem ser severos quando se observam distúrbios do sistema nervoso central e diarreia profusa conduzindo a grande perda de líquido e eletrólitos (WHITE et al., 2002). *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* são exemplos de alguns microrganismos patogênicos clássicos freqüentemente envolvidos na ocorrência de DTAs. Em soma, destacam-se os fungos filamentosos toxigênicos (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Penicillium veridicatum*, *P. citrinum*, *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*) através da sua habilidade de produção de micotoxinas (LACAZ, 1991). As micotoxinas resultam ser metabólitos secundários tóxicos, produzidos pelos fungos filamentosos, sobretudo, no crescimento saprofítico, com propriedades carcinogênicas, teratogênicas e hepatotóxicas para homens e animais (CORREA et al., 2000).

As bactérias são os agentes mais importantes na etiologia das DTAs de origem microbiana, sendo responsáveis pelo maior número de surtos e de mortes, seja pela ação como causadores de infecção, intoxicação ou toxinfecção (SOUSA, 2003).

Em paralelo a ação das bactérias patogênicas clássicas supra citadas, algumas outras têm emergido como importantes agentes etiológicos de DTAs, a citar: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157:H7 e *Aeromonas hydrophilla* (NOTERMANS; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, 1992). Vários fatores ambientais, sociais e econômicos como produção de alimentos em larga escala, intenso comércio de alimentos, urbanização, mudanças no comportamento humano, aumentada mobilidade e aumento no número de indivíduos imunodeprimidos, têm

contribuído para o surgimento, e em alguns casos para o agravamento da realidade acerca da emergência de microrganismos patogênicos (WOOLHOUSE, 2002).

Frente às conseqüências do crescimento microbiano em alimentos, seja na consideração dos danos decorrente de sua ação deteriorante ou de sua ação como causador de doenças, torna-se essencial à tomada de ações com ênfase na aplicação de processos que conduzam a uma redução do número de microrganismos e/ou diminuição da velocidade de seu crescimento em alimentos.

### **3.4 Caracterização das especiarias e sua potencialidade antimicrobiana**

As especiarias têm sido usadas pelo homem desde os tempos pré-históricos, de forma que determinadas especiarias foram empregadas para embalsamar no antigo Egito. Existe o mito de que as especiarias eram originariamente usadas para disfarçar o sabor rançoso ou menos fresco da carne deteriorada (BEDIN et al., 1999). Na verdade, as especiarias são utilizadas desde que o homem começou a preparar a sua comida, e há tanto tempo quanto a existência da medicina ervanária (WEBB; CRAZE, 2001).

Por um longo período, o homem não teve de preocupar-se com rapidez e praticidade na preparação de suas refeições. Com desprendimento de tempo para confecção de seus pratos culinários, fez-se uso da experimentação de vários sabores, o que conseqüentemente levou a um incremento na utilização das especiarias. À medida que os antigos exploradores do comércio regressavam de suas longínquas viagens e traziam novas especiarias, das quais nunca se tinha



ouvido falar, estas se espalhavam rapidamente difundindo seus sabores no paladar das pessoas que as experimentavam (ODY, 2001).

Após o intenso comércio das especiarias que ocorreu durante os últimos 600 anos, a situação tem sido abrandada atualmente. A sociedade atual tem crescido acostumada às especiarias secas, que podem ser compradas em qualquer supermercado. Possivelmente, graças à introdução da rede frigorífica em quase todas as casas do Ocidente, já não se faz necessário o uso das especiarias para disfarçar os sabores da comida menos apetitosa. As especiarias merecem muito mais do que servirem de disfarce, elas providenciam uma variedade de sabores e experiências (WEBB; CRAZE, 20001).

Consideram-se como especiarias as substâncias aromáticas ou picantes de origem tropical, empregadas para dar sabores e odores aos alimentos. Ainda, pode-se defini-las como substâncias vegetais de natureza indígena ou exótica, aromáticas ou com forte sabor, utilizadas para realçar o sabor dos alimentos (GERMANO; GERMANO, 1998). Os componentes que as provêm destas propriedades são álcoois, aldeídos, ésteres, terpenos, fenóis, ácidos orgânicos e outros componentes ainda não identificados. Entre as especiarias incluem-se folhas (menta, coentro, louro, orégano), flores (cravo), bulbos (alho, cebola), frutas (cominho, pimentas), caules (canela), rizomas (gengibre) e sementes (cilantro, mostarda) (LANCIOTTI et al., 2004).

Experimentos com ênfase no estudo das propriedades antimicrobianas das especiarias têm sido documentados nos recentes anos e o interesse continua no presente (DORMAN; DEANS, 2000; ALIGIANIS et al., 2001; DÍAZ et al., 2002; LANCIOTTI et al., 2004). As especiarias são reconhecidas como possuidoras de variadas propriedades terapêuticas (Quadro 2), sendo efetivamente aplicadas na

medicina popular em muitos países. Com base nos seu uso na medicina tradicional, várias pesquisas têm observado os seus efeitos fisiológicos benéficos na proteção da integridade de eritrócitos (SALIMATH et al., 1986), prevenção da agregação plaquetária (SUBRAMONIYAM; STAYANARAYANA, 1989), ação anti-litogênica (HUSSAIN; CHANDRASEKHARA, 1993), ação hipolipêmica (SRINIVASAN et al., 2004), além de suas propriedades anti-diabetogênica (WILLAGAMUWA et al., 1998), estimulante da digestão (PLATEL; SRINIVASAN, 2004), antioxidante (MELO et al., 2005) e antiinflamatória (REDDY; LOKESH, 1994).

O interesse da microbiologia pelas especiarias se dá por quatro razões fundamentais: i) pode ocorrer o desenvolvimento de microrganismos nestes produtos quando armazenados sob condições inadequadas de umidade e temperatura; ii) podem conter considerável quantidade de microrganismos que, ao serem introduzidos nos alimentos, podem ocasionar alterações e provocar enfermidades a quem os ingere; iii) em certos casos, podem estimular o metabolismo microbiano; iv) podem apresentam considerável poder antimicrobiano. Esta última propriedade vem tomando uma grande significância, quando considerado a possibilidade de sua aplicação na conservação dos alimentos (TASSOU et al., 1995).

Embora as especiarias sejam bem reconhecidas por suas propriedades medicinais, preservativas e antioxidantes, elas têm sido usadas primariamente com proposta de melhorar o *flavor* de alimentos, mais que de estender sua vida útil (RISTORI et al., 2002).

## Quadro 2 - Propriedades medicinais de algumas especiarias

Especiarias	Propriedades medicinais
Assafétida ( <i>Ferula asafoetida</i> Linn.)	Antibacteriana, anti-espasmódica, diurética, expectorante, laxante, antiasmático
Cominho ( <i>Cuminum cyminum</i> Linn.)	Anti-espasmódica, carminativo, estimulante digestivo
Alho ( <i>Allium sativum</i> Linn.)	Antidispéptico, anti-flatulento, útil no tratamento de otites e úlceras duodenais
Gengibre ( <i>Zingiber officinale</i> Linn.)	Útil no tratamento de doenças cardíacas e sanguíneas
Cebola ( <i>Allium cepa</i> Linn.)	Diurético, emenagogo, expectorante
Pimenta preta ( <i>Piper nigrum</i> Linn.)	Antipirético
Pimenta vermelha ( <i>Capsicum annutum</i> Linn.)	Anti-inflamatório, analgésico, útil no tratamento de indigestão
Açafrão ( <i>Curcuma longa</i> Linn.)	Anti-inflamatório, diurético, laxante, útil no tratamento de doenças hepáticas e sanguíneas

FONTE: Srinivasan (2005)

Entre as muitas especiarias utilizadas primariamente para flavorizar os alimentos, e que ao mesmo tempo têm reconhecido potencial como antimicrobianos inclui-se alho, cebola, noz-moscada, *curry*, mostarda, pimenta-preta, tomilho, orégano, sálvia, alecrim, menta, pimenta jamaicana, anis, manjerição, páprica, açafrão, cássia, aipo, endro, orégano, gengibre, coentro, manjerona, cravo, canela e cominho (SAGDIÇ et al., 2002; SAGDIÇ, 2003; VELLUTI et al., 2003). Tais vegetais são ricos em óleos essenciais reconhecidos por apresentarem notável atividade antimicrobiana (ISMAN, 2000; PRASSAD; SEENAYYA, 2000). Os óleos essenciais (também chamados óleos voláteis) são líquidos aromáticos extraídos de materiais vegetais como flores, folhas, caules, raízes e frutas (MOUREY; CANILLAC, 2002).

Os compostos ativos das especiarias estão incluídos na classe dos conservantes de alimentos de ocorrência natural, e alguns têm sua inclusão em alimentos permitida pelos órgãos reguladores (BRULL; COOTE, 1999). Sendo considerados compostos naturais, as especiarias encaixam-se no apelo dos consumidores que questionam a segurança dos aditivos sintéticos (SAGDIÇ, 2003). O Quadro 3 mostra os componentes de alguns óleos essenciais de especiarias reconhecidos como possuidoras de propriedades antimicrobianas.

Billing e Sherman (1998) revisaram o uso de especiarias em vários países, e verificaram que os países que possuem uma maior média de temperatura ambiental (um indicador relativo da maior facilidade de deterioração de alimentos) apresentam uma maior proporção de receitas culinárias contendo especiarias, um maior número total e um maior número de especiarias por preparações culinárias, bem como utilizam um maior número de especiarias com reconhecidas propriedades antimicrobianas. Os autores consideraram diferentes hipóteses para explicar estes dados. Além do uso das especiarias com fim de melhoria da palatabilidade dos alimentos, relata-se que tais produtos poderiam fornecer macronutrientes, mascarar o sabor e o odor dos alimentos deteriorados e aumentariam a transpiração e conseqüente evaporação refrescante. Entretanto, considerou-se que a razão mais provável seria a sua ação na defesa dos alimentos contra microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes, contribuindo dessa forma para a saúde de pessoas que as apreciam.

Atualmente, alguns poucos preservativos possuindo subprodutos de especiarias como compostos ativos são comercialmente disponíveis. *DMC Base Natural's* é um conservante de alimentos produzido pela DOMCA S.A., Alhedín, Granada, Espanha, composto de 50% de óleo essencial de sálvia, citrus e alecrim, mais 50% de glicerol (BURT, 2004). *Protecta One* e *Protecta Two* são misturas de extratos de ervas produzidas pela *Bavaria Corporation Apopka*, Flórida, EUA, reconhecidas como GRAS - *Generally Recognized as Safe* e, embora, a composição precisa destes preservativos não seja informada pelos produtores, os extratos possivelmente tem um ou mais óleos essenciais dispersos em solução de cloreto de sódio e cloreto de citrato (CUTTER, 2000).

**Quadro 3** - Principais componentes de alguns óleos essenciais de especiarias possuidores de propriedades antimicrobianas

Nome comum da especiaria	Nome científico	Principais componentes	Composição aproximada*
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> Linn. (folhas imaturas)	linalol E-2-decanal	26% 20%
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> Linn. (sementes)	Linalol	70%
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	trans-cinamaldeído	65%
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> L.	carvacrol timol $\gamma$ -terpineno <i>p</i> -cimeno	Traços - 80% Traços - 64% 2 - 52% Traços - 82%
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	$\alpha$ -pineno bornil acetato canfrol 1,8-cineol	2 - 25% 0 - 17% 2 - 14% 3 - 89%
Sálvia	<i>Salvia officinalis</i> L.	canfrol $\alpha$ -pineno $\beta$ -pineno 1,8-cineol $\alpha$ -tujona	6 - 15% 4-5% 2 - 10% 8 - 14% 20 - 42%
Cravo	<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.	eugenol eugenil acetato	75 - 85% 8 - 15%
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i> L.	timol carvacrol terpinene <i>p</i> -cimene	10 - 64% 2 - 11% 2 - 31% 10 - 56%

\* Percentual total dos compostos voláteis arredondado para o número inteiro mais próximo

FONTE: Burt (2004)

### 3.5 Propriedades antimicrobianas de especiarias

O primeiro relato acerca das propriedades antimicrobianas de especiarias apareceu em meados de 1880, onde foi observado a eficácia antimicrobiana de mostarda, cravo, canela e seus óleos essenciais (BOYLE, 1955).

Estudos mostram que uma maior ou menor efetividade antimicrobiana das especiarias apresenta-se dependente do tipo de especiaria, da sua concentração, do tipo e concentração do microrganismo alvo e da composição do substrato (MARINO et al., 2001; OZCAN; ERKMEN, 2001). Muitos relatos científicos descrevem o efeito inibitório de especiarias sobre diferentes microrganismos, embora, consideráveis variações de resistência de diferentes microrganismos para uma dada especiaria e de um mesmo microrganismo para diferentes especiarias tenham sido observadas (AKGUL; KIVANÇ, 1988; PROCTOR; DAVIS, 2000).

Pandit e Shelef (1994) testaram o efeito antimicrobiano de 18 especiarias moídas sobre *L. monocytogenes* e observaram significativa ação inibitória do alecrim ( $\geq 5\%$  p/v) e cravo ( $\geq 1\%$  p/v). Estes pesquisadores também observaram que o alecrim (0,5% p/p) e seu óleo essencial (1% v/p) quando aplicados em salsichas de porco armazenadas a 5°C apresentaram efeito inibitório sobre *L. monocytogenes* por 50 dias.

Thyagaraja e Hosono (1996) ensaiaram a capacidade de pimenta malagueta, pimenta preta, coentro, cominho e assafétida em inibir o crescimento de fungos filamentosos (*Rhizopus azygosporus*, *Mucor dimorphosporus*, *Penicillium commune*, *Fusarium solani*) deteriorantes de alimentos, de modo que assafétida mostrou os resultados mais destacáveis na inibição do crescimento fúngico. Abel-Hafez e El-Said (1997) analisaram o efeito do extrato de alho e cebola sobre a

microflora de pimenta preta, canela e alecrim, sendo relatado uma efetividade do extrato aquoso de alho até a concentração de 0,25% (v/v) na inibição do crescimento de *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *Penicillium chrysigenum*, *P. puberulum*, *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *Rizhopus stolonifer*, *Stachybotrys chartarum*, *Eurotium chevalieri* e *Emiricella nidulans*.

Outtara et al. (1997) analisaram a atividade antibacteriana de ácidos graxos selecionados e de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias deteriorantes de carnes, sendo que nenhum ácido graxo apresentou considerável atividade antibacteriana. Por outro lado, *Brochothrix thermosphacta* e *Serratia liquefaciens* tiveram seu crescimento inibido pelo óleo essencial de canela, cravo, alho e alecrim (1/100 v/v); *Carnobacterium piscicola* foi inibido pelo óleo essencial de canela, cravo e alecrim (1/100 v/v); *Lactobacillus sake* foi inibido pelo óleo essencial de canela, cravo, pimenta preta e alecrim (1/100 v/v); *L. curvatus* foi inibido pelo óleo essencial de pimenta preta (1/100 v/v).

Arora e Kaur (1999) analisaram a atividade antimicrobiana de alho, gengibre, cravo, pimenta preta e pimenta vermelha e seus extratos aquosos sobre bactérias patogênicas incluindo *Bacillus sphaericus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. tiphy* e *Shigella flexneri*. Os autores relataram que todas as bactérias incluídas nos ensaios foram sensíveis ao alho e seu extrato aquoso. Ademais, o extrato aquoso de alho mostrou considerável efeito bactericida sobre *S. epidermidis*, *S. tiphy* e *E. aerogenes*. A mesma pesquisa verificou ainda, que os extratos de alho e cravo apresentaram destacável efeito fungicida sobre *Candida albicans*, *C. acutus*, *C. apicola*, *C. catenulata*, *C. inconspicua*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula rubra*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Trignopsis*

*variabilis*. Grohs e Kunz (2000) observaram que misturas de especiarias (2,0 e 5,0% p/v) foram efetivas na inibição do crescimento de *C. lipolytica*.

Al-Jedah et al. (2000) verificaram a ação combinada de várias especiarias, incluindo cominho, coentro, mostarda, pimenta preta e limão, sobre a contagem de *V. parahaemolyticus*, *S. aureus*, *S. typhi* e *E. coli* em molho de peixe. Este estudo mostrou que as misturas de especiarias foram capazes de exercer efeito bacteriostático sobre todas as bactérias ensaiadas, exceto sobre *S. typhi*.

Sagdiç et al. (2003) analisaram o efeito inibitório de extratos metanólicos de sete especiarias sobre *E. coli* 0157:H7, e encontraram uma destacável atividade bactericida do extrato de murta (2,0% v/v), tomilho (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0% v/v), cominho (1,0, 1,5 e 2,0% v/v) e orégano (1,0, 1,5 e 2,0% v/v). Leuschner e Zamparini (2002) estudaram o crescimento e sobrevivência de *E. coli* 0157 e *S. enterica* serovar *enteridis* em maionese na presença de alho, gengibre, mostarda e cravo moídos. Alho (1% p/v) e cravo (1% p/v) mostraram efeito bacteriostático e bactericida, respectivamente, sobre *S. enterica* e *E. coli* 0157. A ação inibitória do extrato aquoso de cravo e alho sobre a produção de verotoxina por *E. coli* foi observada por Sakagami et al. (2000).

Menon e Garg (2001) avaliaram o efeito inibitório do óleo essencial de cravo na concentração de 0,5 e 1,0% (v/p) sobre *L. monocytogenes* em carne e queijo armazenados a 7 e 30°C, e observaram que ambas as concentrações foram capazes de provocar significativo efeito redutor da população de *L. monocytogenes* nos substratos ensaiados. Hao et al. (1998) relataram efeito inibitório de eugenol, princípio ativo do óleo essencial de cravo, sobre *L. monocytogenes* em carne bovina e de ave cozidas e armazenadas a 5 e 15°C.



Juglal et al. (2002) estudaram a efetividade de nove óleos essenciais para controlar o crescimento de fungos produtores de micotoxinas e notaram que cravo, canela e orégano foram capazes de prevenir o crescimento de *A. parasiticus* e *F. moniliforme*, enquanto que o cravo (moído e óleo essencial) marcadamente reduziu a síntese de micotoxinas em grão infectados. Velluti et al. (2003) observaram significativo efeito inibitório do óleo essencial de canela, orégano e cravo sobre o crescimento de *Fusarium proliferatum* e *F. verticillioides*, bem como sobre a produção de fumonisina B<sub>1</sub> por tais cepas em grãos de milho armazenados em diferentes atividades de água e temperaturas.

Estudo realizado por Benkeblia (2004) observou atividade inibitória do óleo essencial de cebola (amarela e vermelha) nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 500 µL/mL sobre *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* e *Penicillium cyclopium*. Elgayyar et al. (2001) analisando o poder antimicrobiano de óleos essenciais de algumas plantas, verificaram que o óleo essencial de anis apresentou alta capacidade inibitória sobre *A. niger*, *Geotrichum* e *Rhodotorula*, embora não tenha sido ativo sobre bactérias.

Koning et al. (2004) em análise da atividade antimicrobiana de extratos metanólicos (3% p/v) de algumas plantas medicinais, observaram que uma variedade de pimenta (*Piper guinense* Schum. et Thon.) e gengibre foram capazes de inibir o crescimento de bactérias Gram (+) (*S. aureus*, *B. subtilis*), Gram (-) (*E. coli*, *P. aeruginosa*) e fungos (*C. albicans*, *A. niger*). Ngane et al. (2003) em ensaio da atividade antifúngica do extrato etanólico (1, 2 e 4 mg/mL) de *P. guineense* observaram sua efetividade na inibição de *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Scopulariopsis brevicaulis* e *Cryptococcus neoformans* até a concentração de 1 mg/mL.

Em adição ao estudo da atividade antimicrobiana de especiarias e seus extratos e óleos essenciais, a efetividade de seus constituintes químicos na inibição de vários microrganismos tem também merecido investigação com vistas a um melhor entendimento acerca dos alvos celulares das moléculas encontradas nas especiarias (KARATZAS et al., 2000). As estruturas moleculares de alguns compostos encontrados em óleos essenciais de especiarias são mostradas na Figura 1.

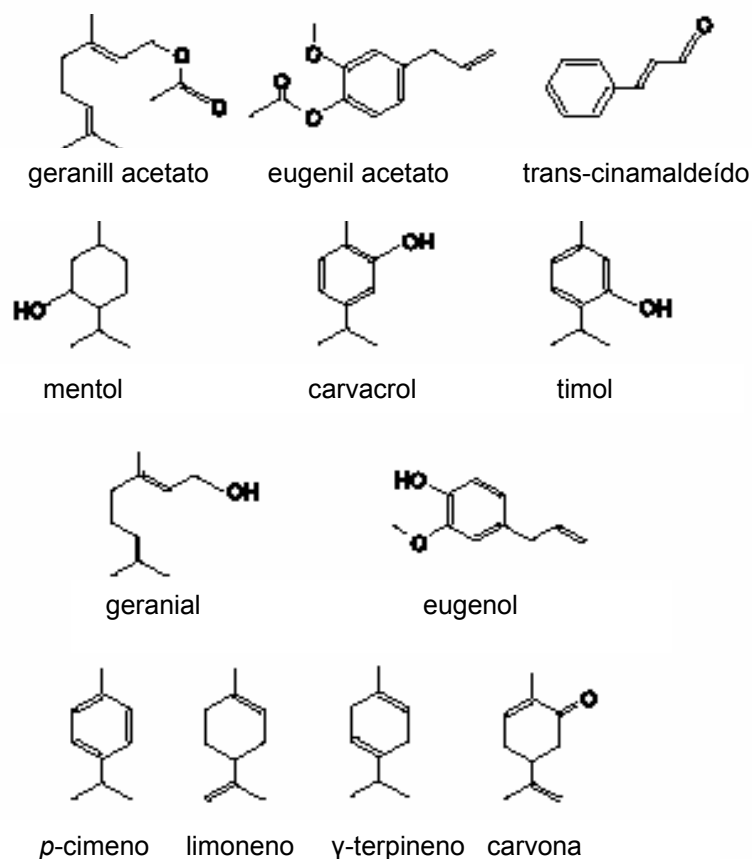
Helander et al. (1998) relataram que carvacrol e timol diminuíram o conteúdo de ATP intracelular em células de *E. coli*, enquanto simultaneamente o conteúdo de ATP extracelular foi aumentado. Este fenômeno foi considerado como indicador da ação de ruptura de membrana citoplasmática destes componentes.

Delaquis e Mazza (1998) descreveram propriedades antimicrobianas de isotiocianato derivado de cebola e alho. Tem existido a hipótese de que isotiocianatos apresentam sua atividade antimicrobiana relacionada à inativação de enzimas microbianas extracelulares através de quebra oxidativa de pontes dissulfídicas (BRULL; COOTE, 1999).

Campo et al. (2003) estudaram qual seria o componente fenólico mais ativo do óleo essencial de alecrim na inibição de *L. monocytogenes* considerando a influência da concentração do componente fenólico, de NaCl e da variação do pH. Os autores verificaram que o ácido carnosídico mostrou-se como o componente mais ativo entre todos os compostos fenólicos ensaiados (carnosol, 1,2-metoxi carnosídico, ácido ferúlico, ácido caféico, ácido rosmarínico, luteolina e luteolina - 7-glicosídeo).

Grande parte dos ensaios científicos com ênfase na atividade antimicrobiana das especiarias tem sido executada com objetivo de analisar o

potencial antimicrobiano de seus óleos essenciais (SKANDAMIS et al., 2002). Os óleos essenciais apresentam duas principais características como agentes antimicrobianos: i) sua origem natural, o que significa mais segurança para os consumidores e para o meio ambiente; e ii) são considerados como possuidores de baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana. A segunda característica citada toma como base o fato de que os óleos essenciais são compostos por uma grande variedade de constituintes, os quais, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana, tornando, desta forma, mais difícil uma possível adaptação dos microrganismos frente a sua ação (DAFERERA et al., 2003).



**Figura 2** - Estrutura molecular de alguns constituintes presentes em óleos essenciais de especiarias

### 3.6 Considerações sobre a qualidade microbiológica de especiarias

A presença de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes em especiarias tem feito surgir o seu reconhecimento como possíveis veículos de inserção de microrganismos em alimentos. Frequentemente, as especiarias são cultivadas e colhidas em áreas quentes e úmidas que favorecem o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos (MOUSUYMI; SARKAT, 2003). Como muitos outros produtos agrícolas, as especiarias são expostas a uma ampla variação de intempéries que facilitam a ocorrência de contaminação durante a colheita, processamento e no mercado de varejo através da poeira, águas residuais e mesmo excretas de humanos e animais (FREIRE; OFFORD, 2003).

Zamboni et al. (1991) relatam que a Comissão Internacional sobre Especificações para Alimentos (1974) preconiza limites máximos de  $10^6$ ,  $10^4$  e  $10^3$  Unidades Formadoras de Colônias/g (UFC/g) de microrganismos aeróbios e/ou anaeróbios facultativos viáveis, fungos, coliformes e *E. coli*, respectivamente, por grama de especiaria. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) estabelece limite máximo de  $5,0 \times 10^2$  e  $10^2$  UFC/g para coliformes fecais e *Staphylococcus* coagulase positivo, respectivamente, e ausência de *Salmonella* em 25 g de especiarias. A legislação alemã preconiza valor limite para bactérias mesófilas aeróbias e/ou anaeróbias facultativas viáveis, *B. cereus* e *S. aureus* de  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^2$  UFC/g de especiaria, respectivamente (MOUSUYMI; SARKAT, 2003). A qualidade microbiológica, a carga de bactérias totais ou *Enterobacteriaceae*, em particular, frequentemente figuram como indicadores das condições sanitárias da região onde as especiarias são produzidas e processadas (SCHWAB et al., 1982).

Mousuymi e Sarkat (2003) citam que estudos prévios acerca da análise microbiológica de especiarias mostram a detecção de uma ampla variedade de microrganismos incluindo bactérias totais, *B. cereus*, *C. perfringens*, *E. coli*, *Salmonella* e fungos toxigênicos. Muitas pesquisas em várias partes do mundo têm sido realizadas com ênfase na qualidade microbiológica de especiarias incluindo a análise bacteriana e micológica, bem como o estudo da presença de metabólitos tóxicos microbianos (FERNÁNDEZ et al., 1984; ZAMBONI et al., 1991; OLIVEIRA et al., 1992; TORO SANTA MARIA et al., 1993; HOFFMAN et al., 1994; ABDEL-HAFEZ; AL-SAID, 1997; PEREIRA et al., 1999; BENEZET et al., 2003; FREIRE; OFFORD, 2003;).

A atividade antimicrobiana de especiarias somente poderá ser prontamente reconhecida como fator suficiente para subsidiar sua inclusão em sistemas de conservação de alimentos quando medidas pertinentes sejam tomadas para assegurar a sua qualidade sanitária. Estas medidas devem incluir ações para controle de umidade, de promoção de satisfatórias condições sanitárias no processamento, treinamento dos manipuladores, monitoramento da qualidade microbiológica, ou seja, ações de marca sanitária aplicadas desde a colheita até a sua inserção nos alimentos.

A literatura científica na área da ciência e tecnologia de alimentos tem mostrado nos últimos anos um enfoque no estudo do potencial antimicrobiano das especiarias considerando a sua inclusão nos chamados sistemas de bioconservação de alimentos. A bioconservação de alimentos é um sistema de preservação amplamente aceito, sendo referido como um procedimento natural capaz de prover a extensão da vida útil e satisfatória segurança microbiológica de alimentos (FIORENTINI et al., 2001; UTAMA et al., 2001; RISTORI et al., 2002).

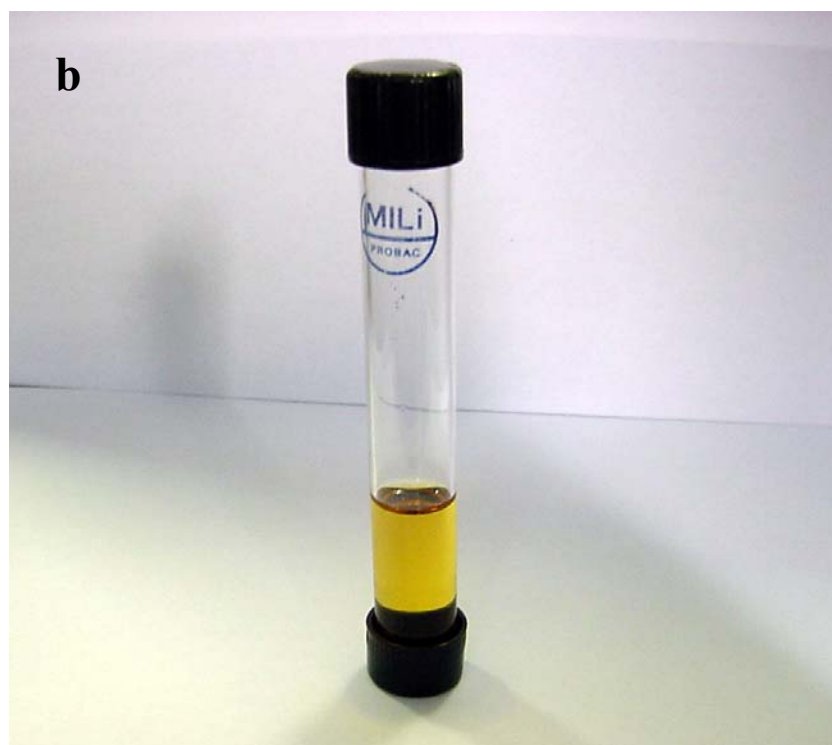
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do óleo essencial de *Origanum vulgare* L.

O óleo essencial de *O. vulgare* (Figura 3) foi fornecido pela Ferquima Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil), sendo o procedimento de sua extração realizado em Março de 2005 (lote nº 206) através do método de hidrodestilação em escala industrial. O óleo essencial atendeu todas as especificações exigidas concernentes a seu controle de qualidade conforme análises realizadas pelo fornecedor (Quadro 4).

**Quadro 4** - Informações técnicas relacionadas ao controle de qualidade do óleo essencial de *Origanum vulgare* L.

Itens controlados	Resultados	Especificações
Aparência	líquido claro	líquido claro
Cor	amarelo claro	amarelo claro a marrom claro
Impurezas	Isento	Isento
Odor	característico	característico
densidade (20°C)	0,941	0,920 – 0,950
Índice de refração (20°C)	1,508	1,500 – 1,520



**Figura 3** - Óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (a: óleo essencial em embalagem fornecida pelo fabricante; b: aspecto visual do óleo essencial)

## 4.2 Cepas microbianas

Cepas padrões de bactérias patogênicas e/ou deteriorantes, bem como de fungos leveduriformes deteriorantes de alimentos foram utilizadas como microrganismos testes nos ensaios antimicrobianos. As cepas de *Aeromonas hydrophilla* INCQS 9610 (*A. hydrophilla*), *Bacillus cereus* ATCC 11778 (*B. cereus*), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4362 (*K. pneumoniae*), *Listeria monocytogenes* ATCC 7664 (*L. monocytogenes*), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (*P. aeruginosa*), *Salmonella choleraesuis* ATCC 4028 (*S. choleraesuis*), *Salmonella enterica* ATCC 6017 (*S. enterica*), *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 (*Y. enterocolitica*), *Candida krusei* ATCC 6258 (*C. krusei*), *Pichia ohmeri* ATCC 46053 (*P. ohmeri*) e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 (*S. cerevisiae*) foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade, FIOCRUZ (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

As cepas de *Pichia minuscula* NI 7638 (*P. minuscula*) e *Rodhotorula rubra* LBFHC 1096 (*R. rubra*) foram fornecidas pelo Departamento de Micologia, UFPE (Recife, PE, Brasil). As cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. subtilis*), *Enterobacter aerogenes* ATCC 15012 (*E. aerogenes*), *Serratia mercencens* ATCC 13880 (*S. mercencens*), *Shigella flexneri* MM 412 (*S. flexneri*), *Shigella sonnei* ATCC 11060 (*S. sonnei*) e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (*S. aureus*) foram cedidas pelo Instituto de Antibióticos, UFPE (Recife, PE, Brasil).

As cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 (*E. coli*), *Candida albicans* ATCC 7645 (*C. albicans*) e *Candida tropicalis* MD 37 (*C. tropicalis*) foram cedidas pelo Laboratório de Micologia Clínica, Centro de Ciências da Saúde, UFPB (João Pessoa, PB, Brasil).



As cepas de bactérias e de fungos leveduriformes foram mantidas, respectivamente, em tubos de ensaio contendo ágar nutriente e ágar Sabouraud inclinado sob uma temperatura de 8°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Para os ensaios de atividade antimicrobiana foram utilizados repiques de 24 horas (*overnight*) das culturas estoque incubados a 37°C e 28°C para bactérias e leveduras, respectivamente, em tubos de ensaio contendo os mesmos meios de manutenção inclinados.

Os inóculos dos microrganismos testes utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana foram obtidos utilizando-se o seguinte procedimento: inicialmente, foram preparadas suspensões das cepas microbianas em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina (NaCl a 0,85% p/v) estéril. Em seguida, tais suspensões foram agitadas durante 2 minutos com auxílio de aparelho Vortex. Após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada à turbidez apresentada pela solução de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala de McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL para bactérias e  $10^6$  UFC/mL para fungos leveduriformes (FROMTLING et al., 1983; DRUTZ, 1987; BELÉM, 2001). As suspensões bacterianas foram diluídas seriadamente em água peptonada 0,1% para obtenção de uma inóculo final contendo aproximadamente  $10^6$  UFC/mL, objetivando alcançar a mesma concentração celular apresentada pelas suspensões dos fungos leveduriformes.

## 4.4 Ensaios de atividade antimicrobiana

### 4.4.1 *Screening*

O *screening* da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* foi realizado através da técnica de difusão em meio sólido utilizando-se discos de papel de filtro. Em placas de Petri 90 x 15 mm descartáveis esterilizadas foi colocado 1 mL do inóculo do microrganismo teste, em seguida foi adicionado 21 mL de ágar nutriente ou ágar Sabouraud fundido a 50°C quando o ensaio envolvia, respectivamente, bactérias e leveduras. Após solidificação do ágar, um disco de papel de filtro impregnado com 20 µL do óleo essencial foi colocado no centro da placa de Petri contendo o ágar inoculado com a suspensão microbiana (NAIR et al., 2005). O sistema foi incubado a 35-37°C/24 horas e 25-28°C/48 horas para bactérias e leveduras, respectivamente. No final do período de incubação, foi considerado como atividade antimicrobiana positiva quando observado a formação de halo de inibição do crescimento microbiano com diâmetro igual ou superior a 10 mm (LIMA et al., 1993; SOUZA et al., 2005 ).

Paralelamente ao experimento de *screening*, foram realizados experimentos controle de sensibilidade das cepas ensaiadas frente ao Tween 80 através da técnica de difusão em meio sólido (BAUER; KIRBY, 1966). Também, foi realizado o controle da viabilidade das cepas microbianas através da verificação da capacidade de crescimento das cepas de bactérias e de leveduras em, respectivamente, ágar nutriente e ágar Sabouraud sem adição do óleo essencial.

#### **4.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM**

A determinação da CIM foi realizada com as cepas que apresentaram perfil de sensibilidade ao óleo essencial de *O. vulgare* no experimento do *screening*. A CIM foi determinada através da técnica de difusão em meio sólido utilizando-se cavidade em placa, bem como através da técnica de microdiluição.

##### **4.4.2.1 Preparo das soluções do óleo essencial**

As soluções apresentando diferentes concentrações do óleo essencial de *O. vulgare* foram obtidas da seguinte forma: em tubo de ensaio esterilizado foi adicionado 1,6 mL do óleo essencial, 0,04 mL de TWEEN 80 e q.s.p. 5 mL de água destilada estéril, sendo tal mistura agitada por cinco minutos utilizando aparelho Vortex. A partir de tal procedimento, obteve-se uma solução com concentração final de 320  $\mu\text{L/mL}$ . Seguindo-se o processo de diluição seriada, onde cada tubo de ensaio seguinte continha 2,5 mL de água destilada estéril, adicionada de 2,5 mL da concentração anterior, foram obtidas soluções possuindo as seguintes concentrações do óleo essencial: 160, 80, 40, 20, 10, 5,0, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31, 0,15 e 0,07  $\mu\text{L/mL}$  (GAYOSO et al., 2005).

##### **4.4.2.2 Determinação da CIM através da técnica de difusão em meios sólido**

Inicialmente, foi adicionado o inóculo microbiano e vertido o ágar correspondente à cepa ensaiada, seguindo-se procedimento idêntico ao citado para

a execução do *screening*. Após solidificação do ágar, foram feitas cavidades utilizando cânulas de vidro (6 mm de diâmetro) esterilizadas, de modo que nestas cavidades foram depositados 50 µL de cada solução possuindo diferentes concentrações (160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 µL/mL) do óleo essencial. O sistema foi incubado a 35-37°C/24 horas e 25-28°C/48 horas quando o ensaio envolvia bactérias e leveduras, respectivamente (ARORA; KAUR, 1999; BENKEBLIA, 2004). Após o término do período de incubação, foi considerada como CIM aquela concentração do óleo essencial, que quando em interação com a cepa microbiana ensaiada foi capaz de desenvolver um halo de inibição do crescimento microbiano com diâmetro igual ou superior a 10 mm (LIMA et al., 1993; SOUZA et al., 2005).

#### **4.4.2.3 Determinação da CIM através da técnica de microdiluição**

A determinação da CIM do óleo essencial de *O. vulgare* através da técnica de microdiluição foi realizada utilizando-se microplaca esterilizada contendo 96 poços com fundo chato e tampa. Inicialmente, 100 µL da solução do óleo essencial nas diferentes concentrações (80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31, 0,15 e 0,07 µL/mL) foram dispensados nos poços da microplaca, de modo que a primeira seqüência de poços apresentasse a maior concentração do óleo essencial, e a décima primeira fila apresenta-se a menor concentração. Em seguida, adicionou-se aos poços 100 µL de caldo nutriente (para bactérias) e caldo Sabouraud (para leveduras) duplamente concentrado e inoculado com o microrganismo ensaiado. No décimo segundo poço da placa de microdiluição foi dispensado 200 µL do caldo de incubação inoculado

com a suspensão microbiana como procedimento de controle da viabilidade da cepa ensaiada. O sistema foi incubado a 35-37°C/24 horas e a 25-28°C/48-72 horas quando o ensaio envolvia cepas de bactérias e de leveduras, respectivamente (VILJOEN et al., 2003; SAHIN et al., 2004).

Foram utilizados diferentes procedimentos de leitura para determinação da CIM do óleo essencial frente os dois diferentes grupos de microrganismos ensaiados. Para as cepas bacterianas, utilizou-se o seguinte procedimento: no final do período de incubação, adicionou-se 20 µL de solução do corante resazurina (1 µg/mL), o qual é reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (MANN; MARKAN, 1998; SALVAT et al., 2001; BURT; REINDERS, 2003). Assim, quando da observação de mudança de coloração do corante (azul para rosa), considerou-se como indicador de crescimento microbiano. Considerou-se como CIM a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento da cepa ensaiada, verificado por uma não mudança de coloração do corante indicador.

Por sua vez, a determinação da CIM do óleo essencial sobre para as cepas de leveduras foi determinada através de observação visual, tomando como base o fato de que o crescimento destes microrganismos nos poços da placa de microdiluição ocorre através da formação dos chamados botões de crescimento (aglomerado de células). Desta forma, nos ensaios envolvendo as cepas de leveduras foi considerada com CIM a menor concentração do óleo essencial capaz de provocar uma inibição visual total do crescimento da cepa ensaiada ao final do período de incubação (ESPINEL INGROFF et al., 1991; ESPINEL INGROFF et al., 1992).

#### 4.4.3 Efeito da CIM sobre a viabilidade microbiana

O estudo de interferência do óleo essencial de *O. vulgare* sobre a viabilidade das cepas microbianas foi realizado através do método de contagem de células viáveis. Neste ensaio foi observado o comportamento das cepas microbianas frente à CIM determinada pelo método de difusão em meio sólido e pelo método de microdiluição. Inicialmente, 1 mL da suspensão microbiana foi inoculado em 4mL de caldo nutriente e caldo Sabouraud para bactérias e leveduras, respectivamente, com concentração ajustada para 10 mL, em seguida, adicionou-se 5 mL da solução do óleo essencial possuindo concentração de duas vezes a da CIM previamente determinada. O sistema foi incubado a 35-37°C e 25-28°C quando o ensaio envolvia, respectivamente, bactérias e leveduras. Nos intervalos 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas pós-incubação, uma alíquota de 1,0mL da suspensão foi diluída seriadamente (1:9 v/v) em água peptonada 0,1% ( $10^{-1} - 10^{-5}$ ) e uniformemente inoculada em placa de Petri contendo ágar nutriente e ágar Sabouraud, respectivamente, para as cepas de bactérias e leveduras. Foi realizado o experimento controle onde a solução do óleo essencial foi substituída por 5 mL de água destilada estéril adicionado de 0,04mL de Tween 80. Os ensaios foram incubados a 35-37°C/24 horas para bactérias e a 25-28°C/48 horas para leveduras. Após o fim do período de incubação, foi realizada a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC/mL (SAGDIÇ, 2003).

#### **4.4.4 Ação antimicrobiana do óleo essencial em microsistema de conservação de alimentos**

Amostras de carne moída fresca comercialmente disponível foram utilizadas como substratos para verificação da ação do óleo essencial de *O. vulgare* em diferentes concentrações em microsistema de conservação de alimentos. Inicialmente, 30 g de carne moída foram homogeneamente distribuídos sobre a superfície inferior (fundo) de uma placa de Petri 90 x 15 mm descartável esterilizada. Em seguida, 10 mL da solução possuindo a concentração desejada do óleo essencial foi homogeneamente distribuída sobre a amostra de carne, de modo que todo o substrato utilizado se apresentasse embebido na solução do óleo essencial. O microsistema foi hermeticamente fechado utilizando-se parafilme, e armazenado sob refrigeração (8°C, ±1°C). Foi utilizado como controle, um microsistema sem adição da solução do óleo essencial (GROHS; KUNZ, 2000; MENON; GARG, 2001).

Nos tempos 24, 48 e 72 horas de armazenamento, uma alíquota de 10 g do substrato foi pesada e seriadamente diluída (1:9 p/v) em água peptonada 0,1% ( $10^{-1}$  –  $10^{-6}$ ) seguindo-se por plaqueamento em ágar contagem padrão e ágar Sabouraud para contagem de bactérias aeróbias mesófilas e/ou anaeróbios facultativos viáveis e de fungos filamentosos e leveduriformes, respectivamente. As placas contendo ágar contagem padrão e ágar Sabouraud foram incubadas, respectivamente, a 35-37°C/24 horas e a 25-28°C/48 horas (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 1992). Após término do período de incubação, realizou-se a leitura das placas, sendo os resultados expressos em UFC/g.

#### **4.5 Interferência do tratamento térmico sobre a composição e atividade microbiana do óleo essencial de *O. vulgare*.**

Alíquotas de 2 mL do óleo essencial foram acondicionadas em tubos de ensaio esterilizados com tampa de rosca, sendo em seguida expostas por 1 hora a diferentes temperaturas (temperatura ambiente –  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $80^{\circ}\text{C}$ ,  $100^{\circ}\text{C}$  e  $120^{\circ}\text{C}$ ) (TOMAINO et al., 2005). A exposição do óleo essencial às temperaturas de  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $80^{\circ}\text{C}$ ,  $100^{\circ}\text{C}$  e  $120^{\circ}\text{C}$  foi realizada através do uso de um bloco seco de aquecimento (Dry Block TE 021, Technal). Ao final do período de exposição às diferentes temperaturas, as alíquotas do óleo essencial foram imediatamente resfriadas em recipiente contendo água e gelo. Após o resfriamento, foram realizadas as análises concernentes à atividade antimicrobiana e a determinação da composição química do óleo essencial. A alíquota do óleo essencial mantida à temperatura ambiente foi utilizada como controle no experimento.

O estudo da interferência dos diferentes tratamentos térmicos sobre a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* foi realizado através da determinação da CIM utilizando-se a técnica de difusão em meio sólido, sendo seguidos os mesmos procedimentos e critérios citados no item 4.4.2.2.

A análise da composição das alíquotas do óleo essencial submetidas aos diferentes tratamentos térmicos foi realizada utilizando-se cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (GC-MS, Shimadzu, QP-5000) operando por impacto de elétrons.

Para a separação dos componentes do óleo essencial foram utilizadas as seguintes condições analíticas:

Diluição da amostra: 1  $\mu\text{L}$  de óleo essencial: 1 mL de acetato de etila;



Volume de injeção da amostra: 1  $\mu$ L;

Temperatura do injetor: 240  $^{\circ}$ C;

Gás de arraste: hélio (He);

Vazão do gás de arraste: 1,0 mL/min.;

Taxa de *split*: 1:20;

Pressão na cabeça da coluna: 11,5 psi;

Temperatura do detector: 230  $^{\circ}$ C;

Característica da coluna: coluna capilar apolar de sílica fundida OV - 5 (Ohio Valley Specialty Chemical Inc., USA) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25  $\mu$ m de diâmetro do filme da fase estacionária líquida;

Programa de temperatura: 60 $^{\circ}$ C – 240 $^{\circ}$ C (3 $^{\circ}$ C/minuto), mantendo-se a temperatura inicial e final por 5 minutos, perfazendo um total de 70 minutos.

As condições de uso do espectrômetro para a detecção e identificação dos componentes do óleo essencial foram as seguintes:

Temperatura da linha de transferência: 170 $^{\circ}$ C;

Voltagem de ionização: 70 eV;

Faixa de *scanning* de massas: de 40-550 u.m.a. (unidade de massa atômica);

Frequência de *scanning* (*scan time*): 0,5 seg.;

Demora no início de atuação do espectrômetro (*delay*): 1,5 min.

A identificação dos constituintes do óleo essencial foi efetuada junto ao sistema de computação e processamento de dados (*workstation*) interligado ao GC-MS. O sistema é equipado com uma biblioteca do NIST 62 (NIST 62 *library*, *National Institute of Standards & Technology*, EUA) contendo aproximadamente um total de

150.000 espectros de referência e dados da literatura (McLAFFERTY; STAUFFER, 1989), de modo que uma comparação do espectro de um pico constando na amostra pela equiparação automática com os espectros de referência existente forneceu designação estrutural do composto. Adicionalmente, para identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada a comparação dos índices de retenção dos componentes do óleo essencial com dados da literatura (ADAMS, 1995). Os índices de retenção (IR) foram obtidos através da co-injeção do óleo essencial com uma mistura padrão de hidrocarbonetos (C<sub>9</sub>-C<sub>24</sub>) aplicando-se a fórmula de Kovatz (equação 1) (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963).

$$IR = [(T_s - TC_{n-1}) / (TC_n - TC_{n-1}) \times 100] + 100 \times C_{n-1} \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

T<sub>s</sub> = tempo de retenção do componente analisado

TC<sub>n</sub> = tempo de retenção do n-alcano que elui após a substância

TC<sub>n-1</sub> = tempo de retenção do n-alcano que elui antes da substância

C<sub>n-1</sub> = n° de carbonos do n-alcano que elui antes da substância analisada

A quantificação dos componentes do óleo essencial foi relacionada à percentagem de área do pico de cada componente em relação à área total de todos os picos normalizados no cromatograma.

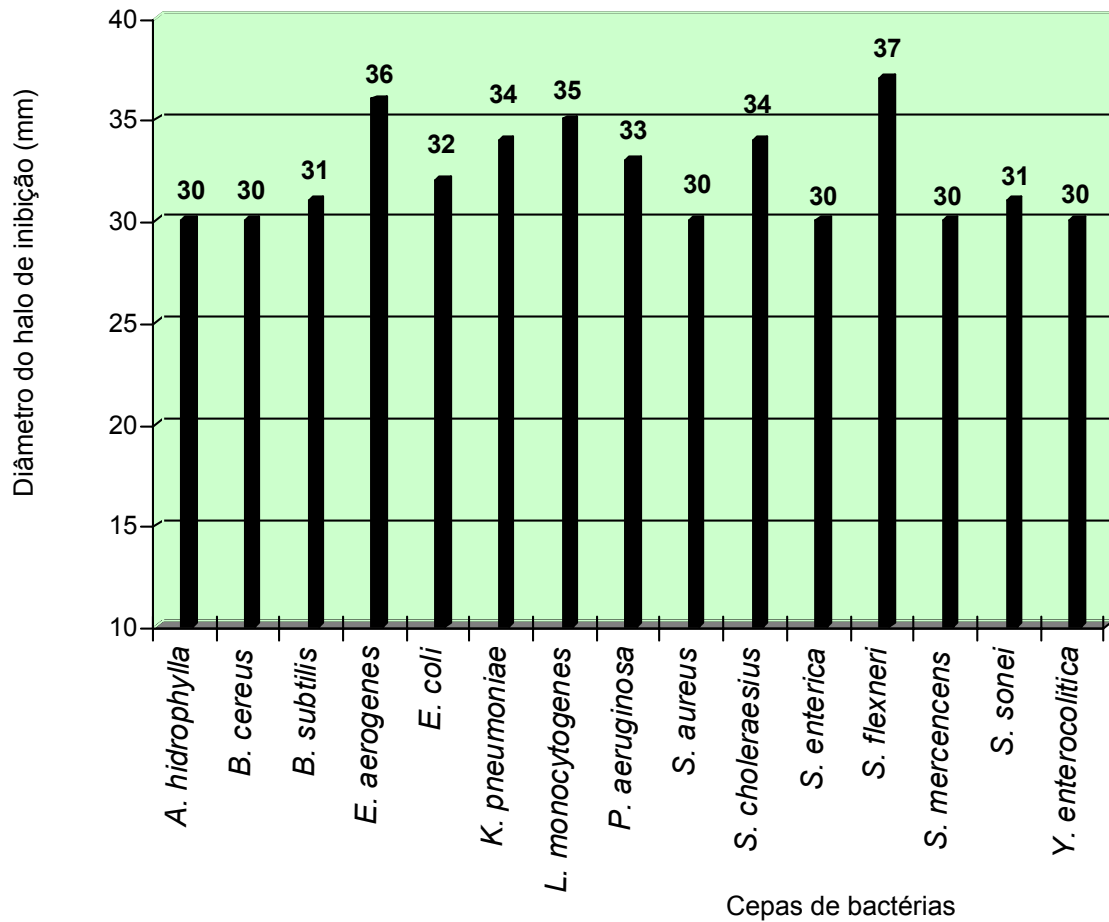
#### **4.6 Análises estatísticas**

A análise estatística foi realizada utilizando-se testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e de estatística inferencial (teste t de Student e teste de Tukey) para determinação de diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos aplicados. Para realização das análises estatísticas utilizou-se o software Sigma Stat. 2.03.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do *screening* da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* sobre cepas de bactérias de interesse em alimentos estão mostrados na Figura 4. Observa-se que todas as cepas bacterianas ensaiadas apresentaram comportamento de sensibilidade à ação do óleo essencial na concentração absoluta, de modo que todos os halos de inibição do crescimento apresentaram diâmetros superiores a 30 mm (média de 32,2 mm,  $\pm 2,45$ ). Os menores halos de inibição foram observados nas interações do óleo essencial com *A. hydrophylla*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. enterica*, *S. mercencens* e *Y. enterocolitica* (30 mm), enquanto o maior halo de inibição foi observado na interação com *S. flexneri* (37 mm). As Figuras 5 e 6 mostram a atividade inibitória do óleo essencial de *O. vulgare* no procedimento de *screening* sobre o crescimento de *K. pneumoniae* e *S. sonnei*, respectivamente.

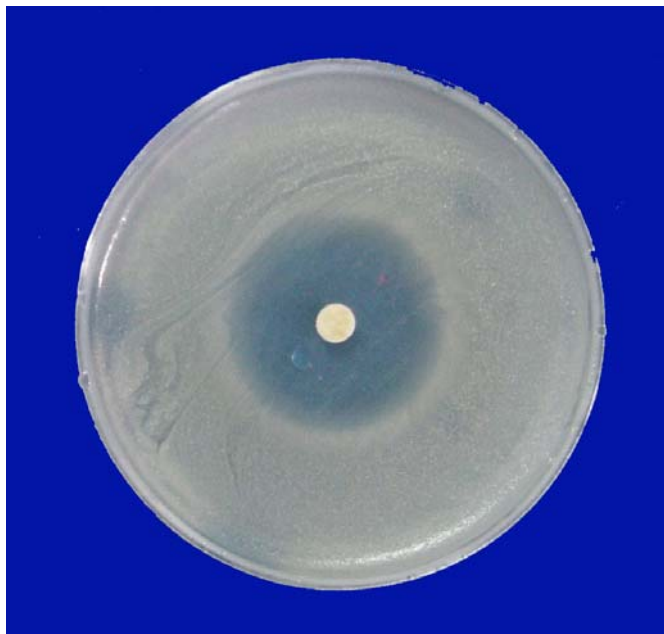
Todas as cepas bacterianas incluídas nos ensaios de atividade antimicrobiana não apresentaram sensibilidade ao Tween 80, bem como foram capazes de crescer em ágar nutriente sem adição do óleo essencial caracterizando a sua viabilidade.



**Figura 4** - *Screening* da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre cepas de bactérias de interesse em alimentos (resultados expressos em diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano)



**Figura 5** – *Screening* da atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o crescimento de *Shigella flexneri*

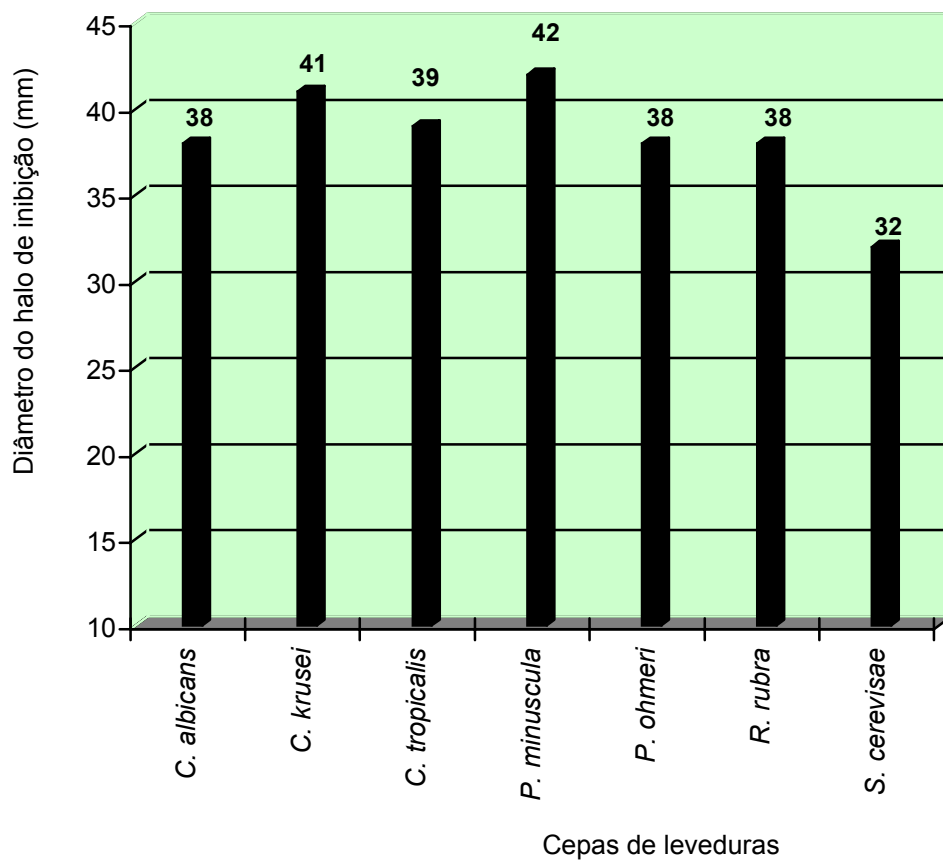


**Figura 6** – *Sreening* da atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o crescimento de *Salmonella enterica*

A Figura 7 mostra os resultados do *screening* da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* sobre cepas de leveduras de interesse em alimentos. Verifica-se, que todas as cepas ensaiadas foram sensíveis à ação do óleo essencial, apresentado, de forma geral, halos de inibição de crescimento com diâmetros superiores àqueles desenvolvidos nos ensaios envolvendo as cepas bacterianas. Esta maior sensibilidade, também pode ser notada quando considerado que as cepas de leveduras apresentaram média de diâmetro dos halos de inibição (38,3 mm,  $\pm 3,2$ ) maior que a encontrada para as cepas bacterianas (32,2 mm,  $\pm 2,45$ ).

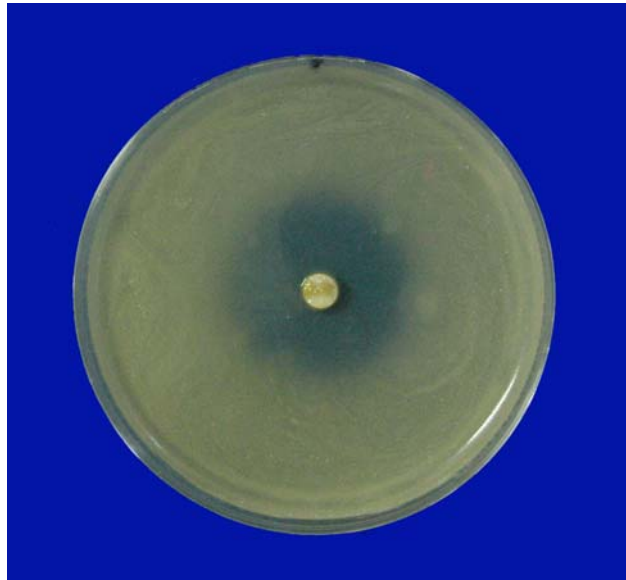
As cepas de *P. minuscula* e *C. krusei* foram as mais sensíveis ao óleo essencial de *O. vulgare* apresentando os maiores halos de inibição, com diâmetros de, respectivamente, 41 e 42 mm. Por sua vez, *S. cerevisiae* apresentou o menor halo de inibição com diâmetro de 32 mm. As Figuras 8 e 9 mostram a atividade inibitória do óleo essencial de *O. vulgare* no procedimento de *screening* sobre o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei*, respectivamente.

Todas as cepas de leveduras utilizadas como microrganismos testes não apresentaram sensibilidade ao Tween 80, bem como foram capazes de crescer em ágar Sabouraud sem adição do óleo essencial caracterizando a sua viabilidade.

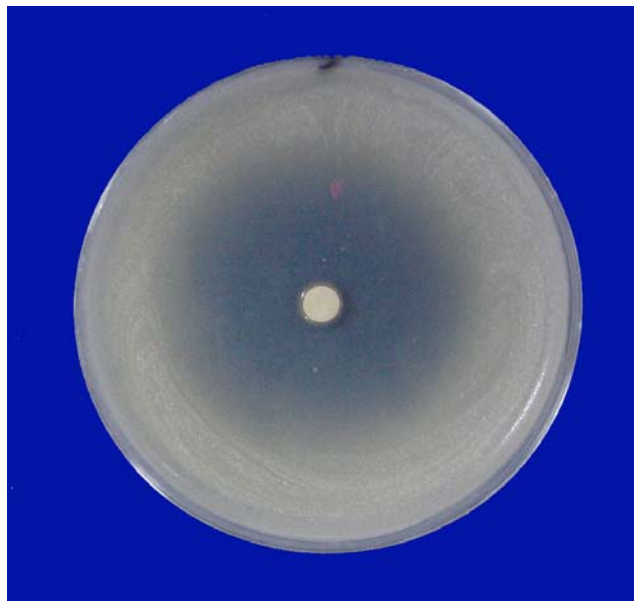


**Figura 7** - *Screening* da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre cepas de leveduras de interesse em alimentos (resultados expressos em diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano)





**Figura 8** – *Screening* da atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o crescimento de *Candida albicans*



**Figura 9** – *Screening* da atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o crescimento de *Candida krusei*

Poucos relatos na literatura são disponíveis acerca da ação de óleos essenciais na concentração absoluta sobre o crescimento de microrganismos, de modo que esta escassez de informações torna-se mais acentuada quando se busca relatos da ação de óleos essenciais de especiarias sobre microrganismos relacionados com alimentos. O *screening* da atividade antimicrobiana de um óleo essencial é geralmente utilizado como teste preliminar de avaliação do seu potencial antimicrobiano, e de acordo com os resultados obtidos pode-se elaborar uma seqüência de análises mais detalhadas com vistas à obtenção de maiores informações sobre tal propriedade biológica (HSIEH et al., 2001; LIMA, 2002). A maioria das informações disponíveis sobre a ação antimicrobiana de óleos essenciais na sua concentração absoluta está direcionada ao estudo contra microrganismos de interesse clínico (LIMA, 1996; PONTES, 2002; GAYOSO et al., 2004).

Sahin et al. (2004) observaram a efetividade do óleo essencial de *O. vulgare* na inibição de *Bacillus macerans*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes*, sendo observado a formação de halos de inibição do crescimento microbiano com diâmetros oscilando entre 10 e 18 mm.

A Tabela 1 mostra a CIM do óleo essencial de *O. vulgare* sobre bactérias de interesse em alimentos determinada através da técnica de difusão em meio sólido. Os valores de CIM encontrados oscilaram entre 80 e 20  $\mu\text{L/mL}$ , sendo encontrado uma CIM de 40  $\mu\text{L/mL}$  para um número significativo das cepas ensaiadas (07 cepas). Dentre as cepas que apresentaram CIM de 40  $\mu\text{L/mL}$ , ocorreu a formação de halos de inibição de crescimento com diâmetros oscilando entre 10 (*A. hydrophylla*, *P. aeruginosa*) e 13 mm (*E. aerogenes*). Por sua vez, entre

as cepas que apresentaram CIM de 20  $\mu\text{L/mL}$  (*B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. mercencens*, *Y. enterocolitica*) ocorreu a formação de halos de inibição com diâmetros entre 11 e 12 mm.

**Tabela 1** – Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre bactérias de interesse em alimentos determinada através da técnica de difusão em meio sólido \*

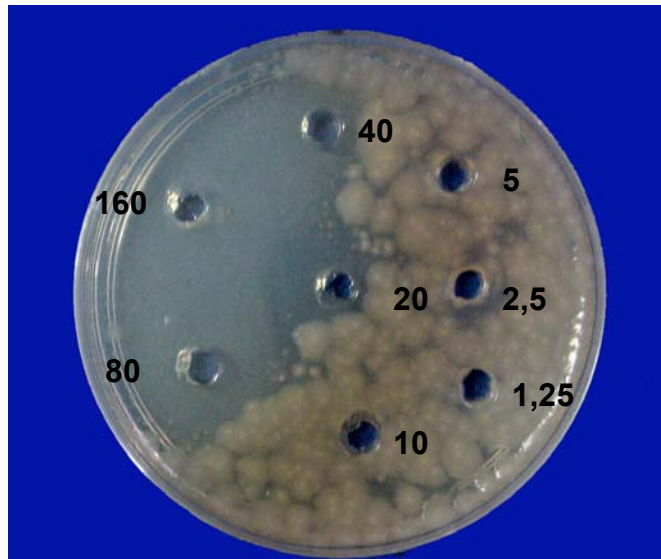
Bactérias	Óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L. ( $\mu\text{L/mL}$ )							
	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25
<i>A. hydrophylla</i>	33	21	10	0	0	0	0	0
<i>B. cereus</i>	34	24	15	11	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	31	25	14	10	0	0	0	0
<i>E. aerogenes</i>	26	20	13	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	25	17	12	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	33	21	11	0	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	20	13	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	26	14	10	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	26	21	15	12	0	0	0	0
<i>S. choleraesius</i>	20	14	0	0	0	0	0	0
<i>S. enterica</i>	24	16	12	0	0	0	0	0
<i>S. mercencens</i>	30	20	16	12	0	0	0	0
<i>S. flexneri</i>	27	15	12	0	0	0	0	0
<i>S. sonei</i>	32	25	16	12	0	0	0	0
<i>Y. enterocolitica</i>	35	30	21	12	0	0	0	0

\* resultados expressos em diâmetro - mm dos halos de inibição do crescimento microbiano

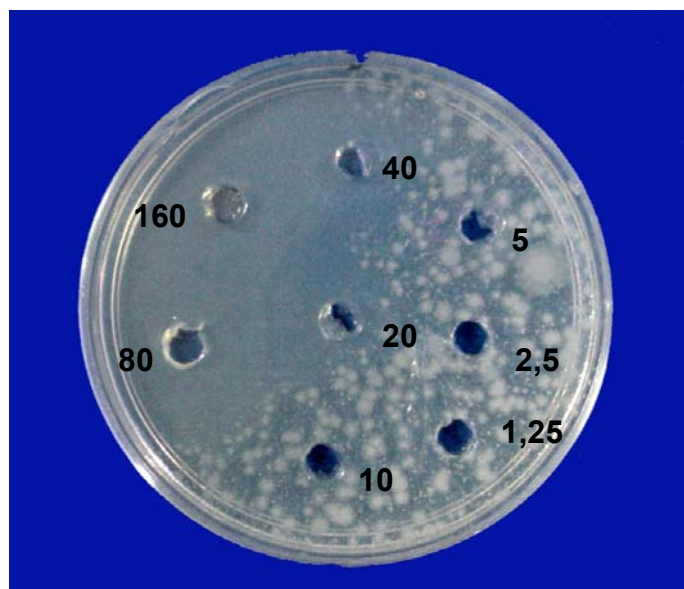
*L. monocytogenes* e *S. choleraesius* mostraram-se como as cepas bacterianas mais resistentes ao óleo essencial, sendo encontrado um valor de CIM de 80  $\mu\text{L/mL}$ . O comportamento de menor sensibilidade destas duas cepas já pôde ser notado na interação com a solução do óleo essencial com concentração de 160  $\mu\text{L/mL}$ , visto que desenvolveram os menores halos de inibição do crescimento (20 mm). As Figuras 10, 11 e 12 mostram a atividade inibitória do óleo essencial de *O. vulgare* em diferentes concentrações sobre, respectivamente, *Y. enterocolitica*, *B. cereus* e *S. mercencens* observada através da técnica de difusão em meio sólido.



**Figura 10** - Atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em diferentes concentrações (160–1,25 $\mu\text{L/mL}$ ) sobre *Yersinia enterocolitica* determinada através da técnica de difusão em meio sólido



**Figura 11** - Atividade do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em diferentes concentrações (16-1,25 $\mu$ L/mL) sobre *Bacillus cereus* determinada através da técnica de difusão em meio sólido



**Figura 12** - Atividade do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em diferentes concentrações (160–1,25 $\mu$ L/mL) sobre *Serratia mercencens* determinada através da técnica de difusão em meio sólido

Nota-se que das quatro cepas de bactérias Gram positivas ensaiadas (*B. cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*) três apresentaram valores de CIM de 20 µL/mL, ou seja, o menor valor. Muitos estudos de investigação da ação antimicrobiana de óleos essenciais reportam que, geralmente, os microrganismos Gram positivos são mais sensíveis à ação de tais substâncias quando comparados aos microrganismos Gram negativos (NEGI et al., 1999; CANILLAC; MOUREY, 2001; DERMETZOS; PERDETZOGLU, 2001). A menor sensibilidade apresentada pelos microrganismos Gram negativos está, possivelmente, relacionada à presença de uma membrana externa ao redor de sua parede celular, a qual restringe a difusão de compostos antimicrobianos através do lipopolissacarídeo de membrana, dificultando, desta forma, que os componentes dos óleos essenciais alcance seus alvos-celulares (JULIANO et al., 2000; PINTORE et al., 2002; HARPAZ et al., 2003). Entretanto, alguns autores postulam que esta relação de estrutura celular e sensibilidade não é ainda bem estabelecida nas interações entre óleos essenciais e microrganismos. Sugere-se, que uma menor ou maior atividade inibitória de óleos essenciais sobre microrganismos Gram positivos ou Gram negativos poderia estar relacionada com o grau de efetividade particular que os seus componentes individuais exercem sobre os diferentes tipos de microrganismos (DEANS; RITCHIE, 1987; DORMAN; DEANS, 2000).

Alguns autores reportam que entre as bactérias Gram-negativas, *P. aeruginosa* figura como a menos sensível à ação de óleos essenciais (RUBERTO et al., 2000; PINTORE et al., 2002; WILKINSON et al., 2003), enquanto *A. hydrophilla* tem sido citada como estando entre as bactérias mais sensíveis à ação destes produtos (STECHINI et al., 1993; WAN et al., 1998). Entretanto, estas observações não foram reveladas no presente estudo quando considerado os valores de CIM

encontrados para tais bactérias, bem como os diâmetros dos halos de inibição conseguintes à ação do óleo essencial. *P. aeruginosa* não mostrou o maior valor de CIM, além de não desenvolver os menores halos de inibição. Por sua vez, *A. hydrophylla* mostrou valor de CIM comum a diversas bactérias Gram negativas, bem como não desenvolveu os maiores halos de inibição do crescimento.

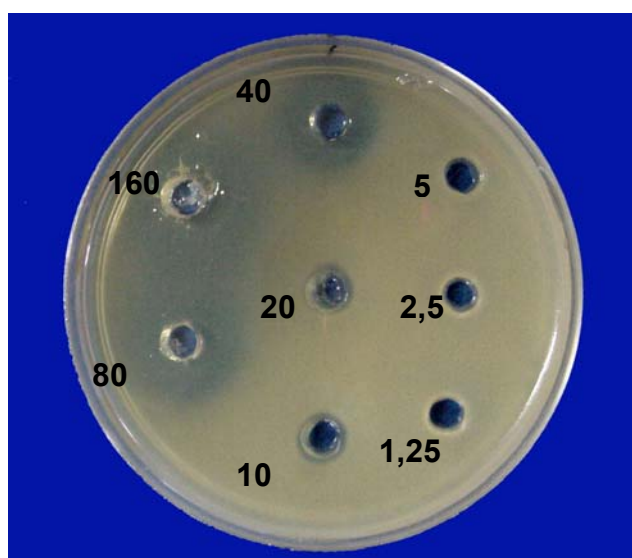
Baydar et al. (2004) em estudo do poder de inibição de espécies de *Origanum* sobre *A. hydrophylla*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Y. enterocolitica* através da técnica de difusão em meio sólido, encontraram valores de CIM entre 10 e 5  $\mu\text{L/mL}$ . Outros estudos também encontraram efetividade de espécies de *Origanum* na inibição de bactérias patogênicas (AL-JEDAH et al., 2000; MARINO et al., 2001). Nostro et al. (2004) observaram sensibilidade de cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* metilicina resistentes frente ao óleo essencial de *O. vulgare*, encontrando CIM de 1,25  $\mu\text{L/mL}$ .

A Tabela 2 mostra a CIM do óleo essencial de *O. vulgare* sobre leveduras de interesse em alimentos determinada através da técnica de difusão em meio sólido. Verifica-se que a CIM esteve entre 20 e 5  $\mu\text{L/mL}$ , de modo que a maioria das cepas de leveduras (04 cepas) mostrou CIM de 10  $\mu\text{L/mL}$ . *P. minuscula* mostrou-se como a cepa mais sensível, apresentando a mais baixa CIM (5  $\mu\text{L/mL}$ ) e os maiores diâmetros de halos de inibição do crescimento frente às diferentes concentrações do óleo essencial. De outra forma, *S. cerevisiae* apresentou-se como a levedura menos sensível a ação do óleo essencial mostrando a maior CIM (20  $\mu\text{L/mL}$ ). As Figuras 13, 14 e 15 mostram a atividade inibitória do óleo essencial de *O. vulgare* em diferentes concentrações sobre, respectivamente, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* observada através da técnica de difusão em meio sólido.

**Tabela 2** – Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre cepas de leveduras de interesse de alimentos determinada através da técnica de difusão em meio sólido

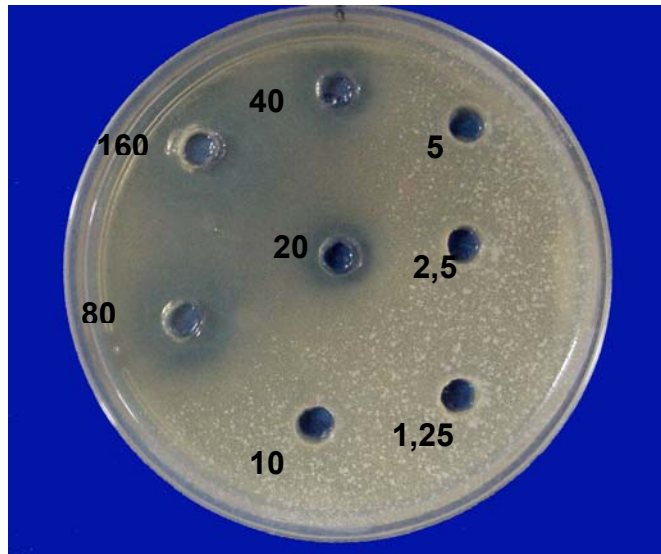
Leveduras	Óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L. ( $\mu\text{L/mL}$ )							
	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25
<i>C. albicans</i>	38	28	20	12	10	0	0	0
<i>C. krusei</i>	32	25	15	12	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	35	27	21	14	11	0	0	0
<i>P. minúscula</i>	39	36	31	21	16	11	0	0
<i>P. ohmeri</i>	33	28	16	13	10	0	0	0
<i>R. rubra</i>	38	34	30	28	14	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	26	22	14	11	0	0	0	0

\* resultados expressos em diâmetro - mm dos halos de inibição do crescimento microbiano



**Figura 13** - Atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em diferentes concentrações (160-1,25 $\mu\text{L/mL}$ ) sobre *Candida albicans* determinada através da técnica de difusão em meio sólido





**Figura 14** - Atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em diferentes concentrações (160–1,25 $\mu$ L/mL) sobre *Candida krusei* determinada através da técnica de difusão em meio sólido



**Figura 15** - Atividade inibitória do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em diferentes concentrações (160–1,25 $\mu$ L/mL) sobre *Pichia ohmeri* determinada através da técnica de difusão em meio sólido

Considerando os valores de CIM encontrados para as cepas de bactérias e de leveduras através da técnica de difusão em meio sólido, nota-se que o conjunto de leveduras apresentou uma maior sensibilidade ao óleo essencial de *O. vulgare*. A maioria das cepas de leveduras apresentou CIM de 10 µL/mL, enquanto, a maioria das cepas bacterianas mostrou CIM de 40 µL/mL. Esta maior sensibilidade, também pode ser verificada quando são observados os maiores diâmetros dos halos de inibição de crescimento desenvolvidos pelas cepas de leveduras frente às soluções com diferentes concentrações do óleo essencial.

Comportamento de maior sensibilidade de cepas de leveduras frente à ação de óleos essenciais, quando comparado com a resposta de sensibilidade de cepas bacterianas, também foi observado em outros estudos (ARORA; KAUR, 1999; VILJOEN et al, 2003; KONING et al., 2004).

A atividade antifúngica do óleo essencial de *O. vulgare* tem sido estudada com maior ênfase sobre fungos filamentosos, enquanto somente poucos estudos vem inserindo cepas de leveduras em ensaios antimicrobianos. Algumas pesquisas observaram a efetividade do óleo essencial de *O. vulgare* na inibição do crescimento de leveduras de interesse clínico (NGANE et al., 2003; DUARTE et al., 2005). Adan et al. (1998) em pesquisa da potencialidade antifúngica de diferentes óleos essenciais sobre fungos patogênicos para humanos (*Malassezia furfur*, *Trichophyton rubrum*, *Trichosporum beigelii*) relataram que o óleo essencial de *O. vulgare* apresentou os resultados mais destacáveis com CIM oscilando entre 10 e 2.5 µL/mL.

A propriedade antifúngica do óleo essencial de *O. vulgare* também foi observada sobre alguns fungos filamentosos micotoxigênicos e/ou deteriorantes de

alimentos (BASILICO; BASILICO, 1999; NIELSEN; RIOS, 2000; LOPEZ-DÍAZ et al., 2002; MARÍN et al., 2004).

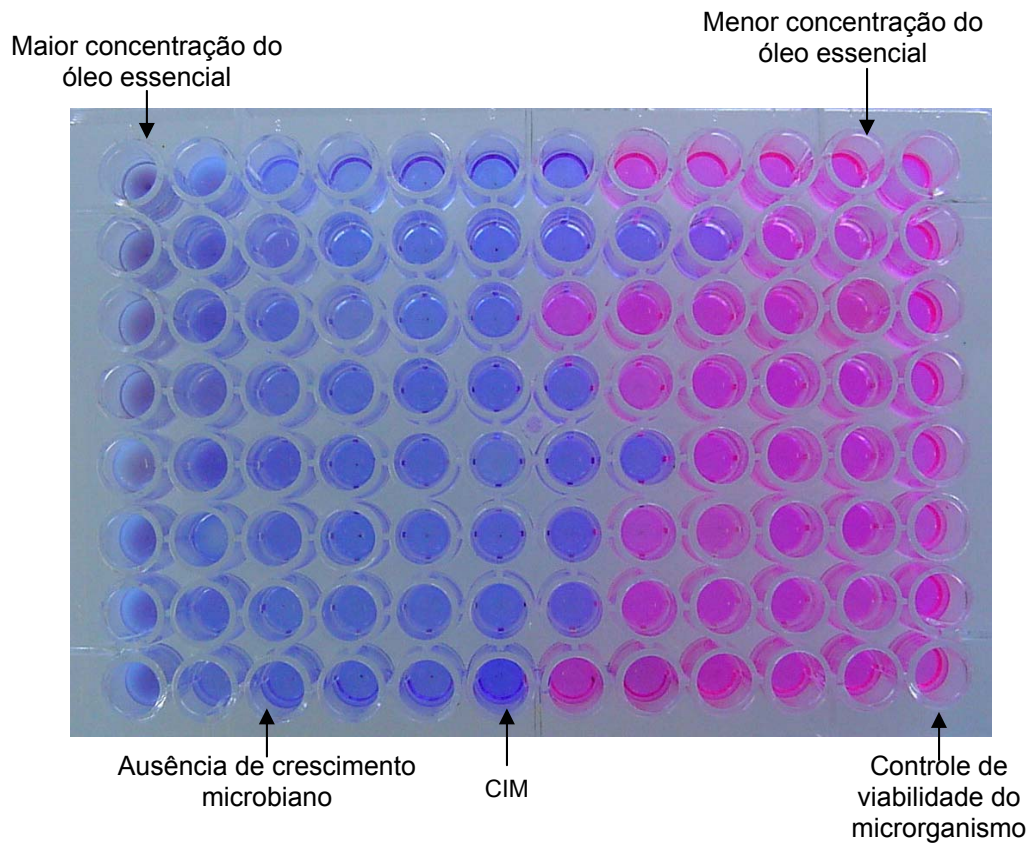
A Tabela 3 mostra a CIM do óleo essencial de *O. vulgare* sobre bactérias de interesse em alimentos determinada através da técnica de microdiluição. Verifica-se que a maioria das cepas bacterianas testadas (13 cepas) apresentou CIM entre 2,5 e 1,25  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Particularmente, as cepas de *B. cereus* e de *Y. enterocolitica* mostraram um diferenciado padrão de sensibilidade apresentando CIM de 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . A Figura 16 mostra uma placa de microdiluição utilizada na determinação da CIM do óleo essencial de *O. vulgare* com a viragem do corante utilizado como indicador de crescimento bacteriano.

Sahin et al. (2004) em pesquisa com ênfase na atividade antibacteriana do óleo essencial de *O. vulgare*, através da técnica de microdiluição, sobre diversas bactérias patogênicas e/ou deteriorantes (*Acinetobacter baumannii*, *B. marcerans*, *B. subtilis*, *B. megantherium*, *Clavibacter michiganense*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *S. aureus*, *S. pyogenes*) encontraram valores de CIM oscilando entre 125 e 15,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Tabela 3** – Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre bactérias de interesse de alimentos determinada através da técnica de microdiluição \*

Bactérias	Óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L. (µL/mL)					
	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31
<i>A. hydrophylla</i>	-	-	-	-	+	+
<i>B. cereus</i>	-	-	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	+
<i>E. aerogenes</i>	-	-	-	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	+	+
<i>S. choleraesuis</i>	-	-	-	+	+	+
<i>S. enterica</i>	-	-	-	+	+	+
<i>S. mercencens</i>	-	-	-	+	+	+
<i>S. flexneri</i>	-	-	-	-	+	+
<i>S. sonnei</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	+	+	+	+

\* (-): inibição do crescimento bacteriano; (+) não inibição do crescimento bacteriano



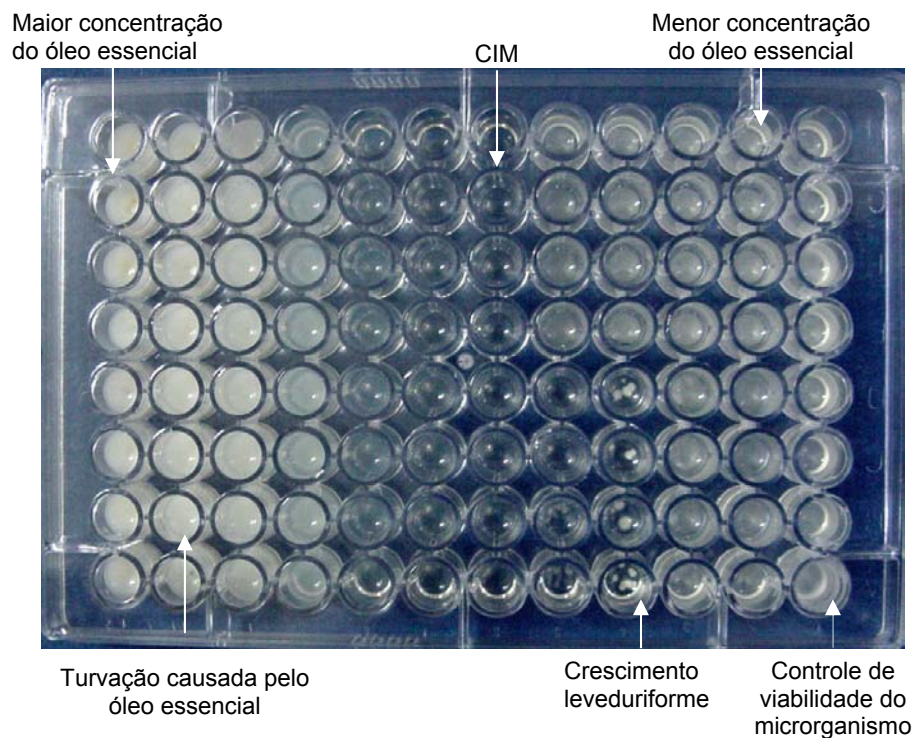
**Figura 16** - Placa de microdiluição utilizada na determinação da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre cepas de bactérias de interesse em alimentos

A Tabela 4 mostra a CIM do óleo essencial de *O. vulgare* sobre leveduras de interesse em alimentos determinada através da técnica de microdiluição. Verifica-se que os valores de CIM apresentaram-se entre 1,5 e 0,2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . As cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *P. minuscula* e *P. ohmeri* mostraram os menores valores de CIM (0,2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). A Figura 17 mostra uma placa de microdiluição utilizada na determinação da CIM do óleo essencial de *O. vulgare* sobre cepas de leveduras de interesse em alimentos com observação de visível crescimento leveduriforme.

**Tabela 4** – Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre leveduras de interesse em alimentos determinada através da técnica de microdiluição \*

Leveduras	Óleo essencial de <i>O. vulgare</i> L. (µL/mL)					
	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	+
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	+	+
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	+
<i>P. minuscula</i>	-	-	-	-	-	+
<i>P. ohmeri</i>	-	-	-	-	-	+
<i>R. rubra</i>	-	-	-	-	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+	+

\* (-): inibição do crescimento fúngico; (+) não inibição do crescimento fúngico



**Figura 17** - Placa de microdiluição utilizada na determinação da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre cepas de leveduras de interesse em alimentos

Nota-se que, de uma forma geral, as cepas de leveduras apresentaram similar comportamento para os dois métodos utilizados na determinação da CIM. As mesmas cepas, excetuando-se *R. rubra*, que foram mais ou menos sensíveis ao óleo essencial de *O. vulgare* no ensaio de difusão em meio sólido, considerando-se um maior ou menor valor de CIM, mostraram o mesmo comportamento no ensaio de microdiluição. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *P. minuscula* e *P. ohmeri* mostraram os menores valores de CIM nos dois métodos utilizados, enquanto *C. krusei* e *S. cerevisiae* mostraram os maiores valores de CIM. Viljoen et al. (2003) e Sahin et al. (2004) também encontraram correlação entre maior ou menor sensibilidade entre estes dois métodos de determinação de CIM.

Seguindo a mesma tendência encontrada na determinação da CIM através da técnica de difusão em meio sólido, os ensaios de microdiluição mostraram menores valores de CIM do óleo essencial de *O. vulgare* sobre as cepas de leveduras, quando comparado com os valores encontrados para as cepas de bactérias.

Duarte et al. (2005) em estudo do potencial anti-*Candida* de plantas medicinais brasileiras através da técnica de microdiluição encontraram uma CIM para o óleo essencial e extrato etanólico de *O. vulgare* maior que 2 µg/mL.

Aligianis et al. (2001) propõem a seguinte escala de classificação do poder antimicrobiano de produtos vegetais tomando como base os valores de CIM determinados pela técnica de microdiluição: produto que apresente CIM até 0,5 µL/mL pode ser considerado como possuidor de forte poder antimicrobiano; produto com CIM entre 0,6 e 1,5 µL/mL pode ser considerado como possuidor de moderado poder antimicrobiano; produto que apresente CIM acima de 1,6 µL/mL pode ser considerado como possuidor de fraco poder antimicrobiano. Tomando como base

este critério de classificação de potencial antimicrobiano, pode-se inferir que o óleo essencial de *O. vulgare* apresenta um grande potencial como inibidor do crescimento de microrganismo de interesse em alimento, particularmente, de fungos leveduriformes.

Os valores de CIM obtidos pelo método de microdiluição para os dois grupos de microrganismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana apresentaram-se sempre menores daqueles obtidos pelo método de difusão em meio sólido. As maiores diferenças foram encontradas nos testes envolvendo as cepas bacterianas, onde a CIM determinada pela técnica de microdiluição mostrou valores até 32 vezes menores (*L. monocytogenes*, *S. choleraesius*) daqueles encontrados pela técnica de difusão em meio sólido. A maioria das cepas bacterianas apresentou diferença entre os valores de CIM entre 16 (*B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *S. sonnei*) e 30 vezes (*A. hydrophilla*, *E. aerogenes*, *S. flexneri*). Nos ensaios envolvendo as cepas de leveduras, esta diferença foi de 16 vezes para maioria das cepas ensaiadas, de modo que somente *P. minuscula* apresentou uma diferença de 8 vezes entre os dois valores de CIM.

Ensaio considerando o estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais têm mostrado diferentes resultados de CIM quando da utilização de diferentes métodos de determinação, sendo que a técnica de microdiluição tem sempre apresentado os menores valores de CIM (MANN; MARKHAN, 1998; ANUCK et al., 1999; TAKIKAWA et al., 2002; BURT; REINDERS, 2003; SAHIN et al., 2004; DUARTE et al., 2005). A diferença de resultados entre os diferentes métodos pode ser atribuída, principalmente, à variação da quantidade líquida do óleo essencial a ser absorvida pelo disco de papel de filtro, a quantidade de óleo



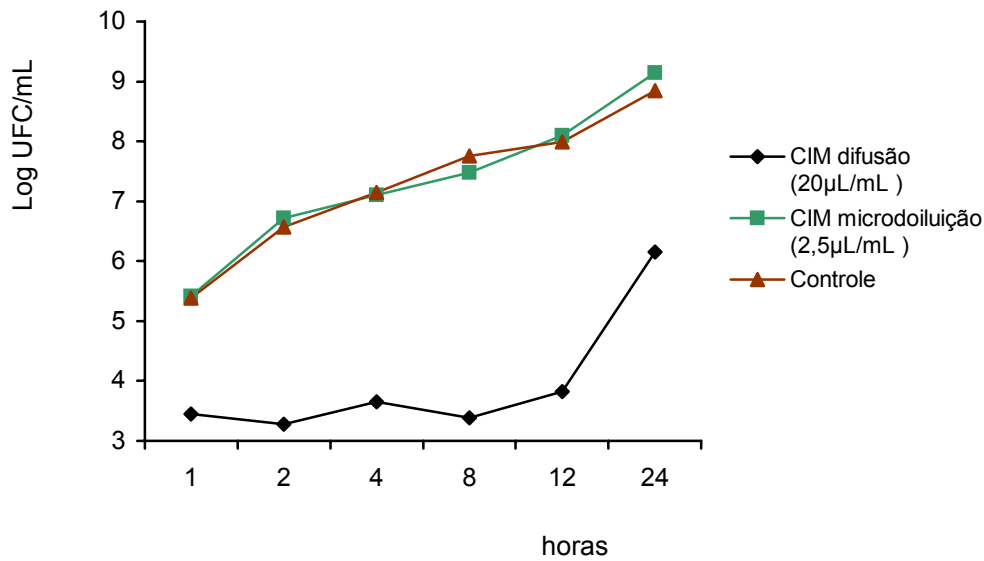
essencial posta na cavidade da placa, o tamanho do disco ou da cavidade, a composição do ágar, bem com a volatilidade do óleo em um sistema aberto quando da utilização da técnica de difusão em meio sólido. Durante o período de incubação, a volatilidade do óleo essencial pode, possivelmente, ser responsável por resultados de CIM mais elevados obtidos em ensaios de difusão em meio sólido (VILJOEN et al, 2003). Inouye et al. (2001) observaram que os valores de CIM de óleos essenciais podem ser diminuídos de duas a oito vezes quando se consegue impedir a evaporação do óleo essencial.

Sabe-se que o resultado de um teste antimicrobiano pode sofrer interferência de vários fatores como método escolhido, volume do inóculo, fase de crescimento do microrganismo, meio de cultura utilizado, e tempo e temperatura de incubação (WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1995). De uma forma geral, nenhum método tem sido padronizado para a avaliação da atividade antimicrobiana de produtos a serem testados contra microrganismos de interesse em alimentos. Assim, na literatura relacionada à ciência e tecnologia de alimentos podem ser encontrados vários estudos com um número variável de tamanho de inóculos microbianos, concentrações de antimicrobianos, meios de cultura, emulsificantes, e, principalmente, de métodos básicos de estudo da potencialidade antimicrobiana de óleos essenciais (BURT, 2004). Dentro desta diversidade, a técnica de microdiluição tem recentemente sido muito utilizada, visto apresentar algumas vantagens como facilidade de realização, economia, obtenção de resultados rápidos, e, principalmente, por mostrar alta sensibilidade na detecção de atividade antimicrobiana.

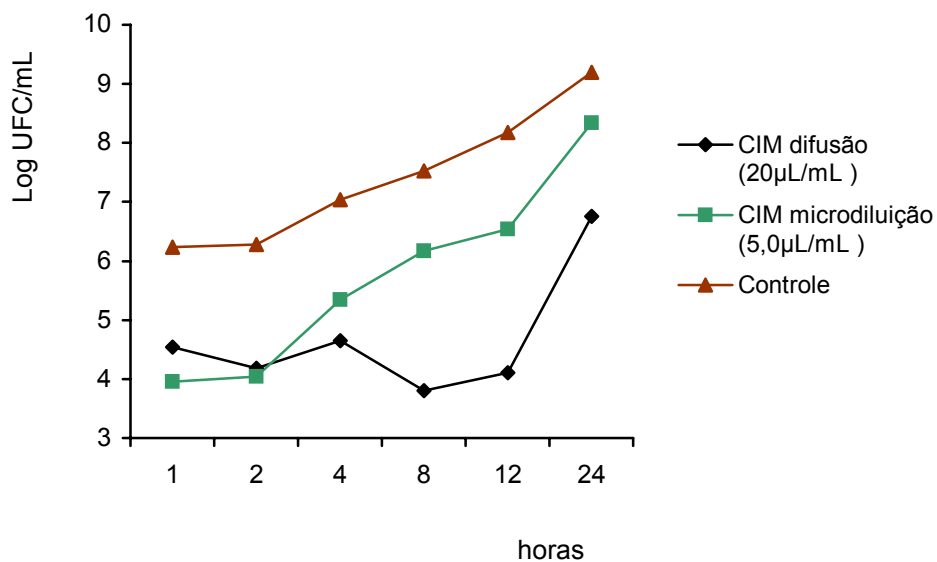
As Figuras 18, 19, 20, 21, 22 e 23 mostram o efeito da CIM do óleo essencial de *O. vulgare* determinada através da técnica de difusão em meio sólido e de microdiluição sobre a viabilidade de cepas de bactérias de interesse em alimentos. A curva de morte ou estudo da cinética microbiana apresenta-se como uma forma dinâmica de mensurar a capacidade de um composto de agir sobre a viabilidade de um microrganismo. Ainda, pode-se inferir que é a estimativa de mortalidade de uma população microbiana quando se enfrenta uma dada concentração de um composto antimicrobiano, evidenciando a rapidez de um efeito bactericida ou a duração de um efeito bacteriostático determinado pelo número de células viáveis em placa (BURT, 2004).

Para a execução deste teste foram escolhidas seis cepas bacterianas tomando como critério a inclusão de um representante reconhecido como indicador de contaminação fecal (*E. coli*), um patógeno esporulador (*B. cereus*), um patógeno Gram positivo clássico (*S. aureus*), um patógeno Gram negativo clássico (*S. enterica*), um patógeno emergente (*Y. enterocolitica*) e um deteriorante (*S. mercencens*).

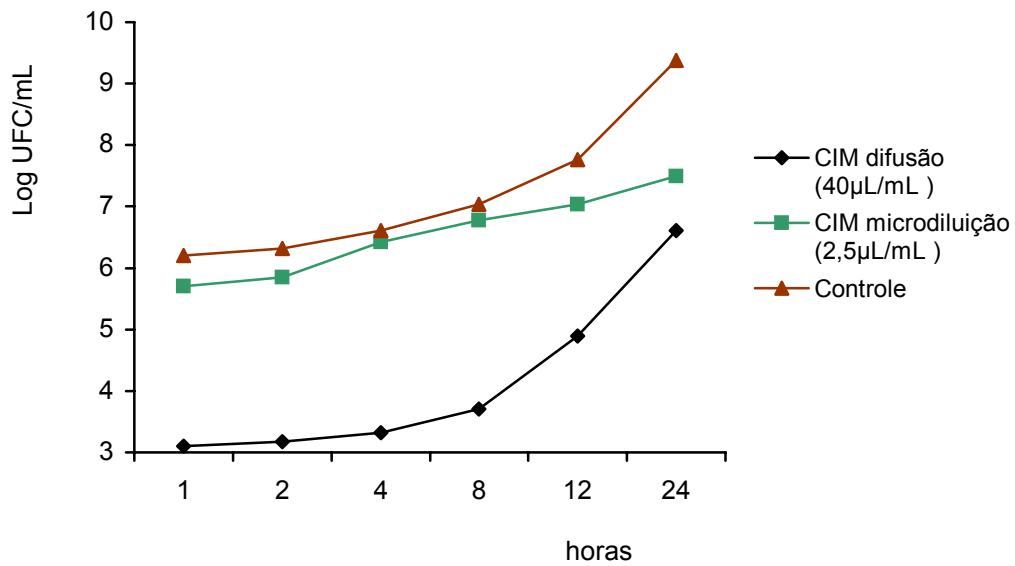
Todas as curvas de crescimento obtidas mostraram uma diferenciada ação entre os dois valores de CIM. A CIM determinada através da técnica de difusão em meio sólido mostrou uma destacável capacidade inibitória da viabilidade celular de todas as cepas de bactérias, a qual foi evidenciada por valores de UFC/mL sempre menores daqueles observados no experimento controle.



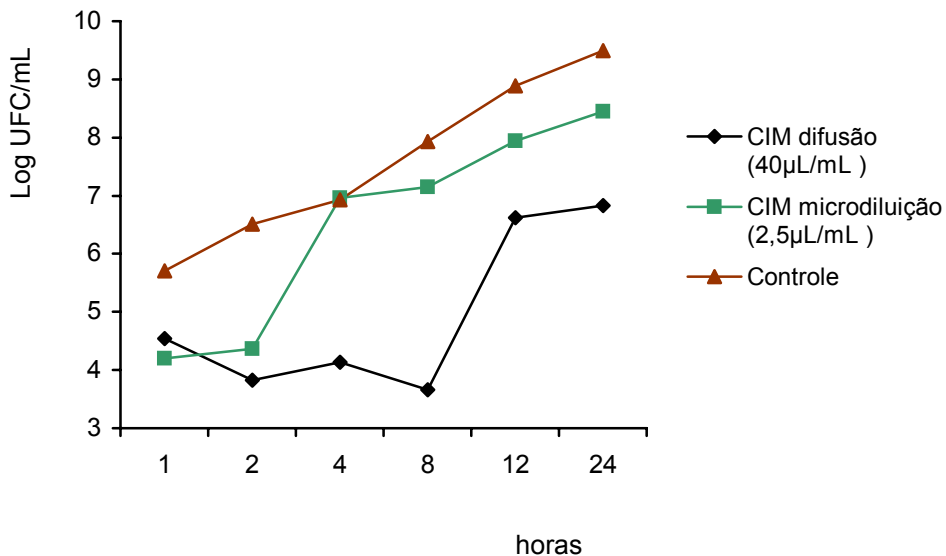
**Figura 18** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Staphylococcus aureus*



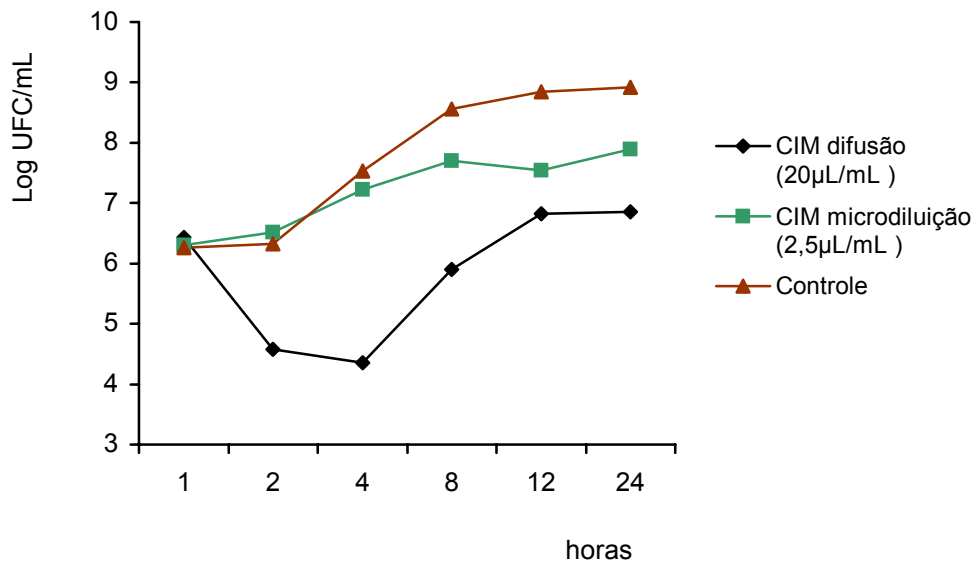
**Figura 19** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Bacillus cereus*



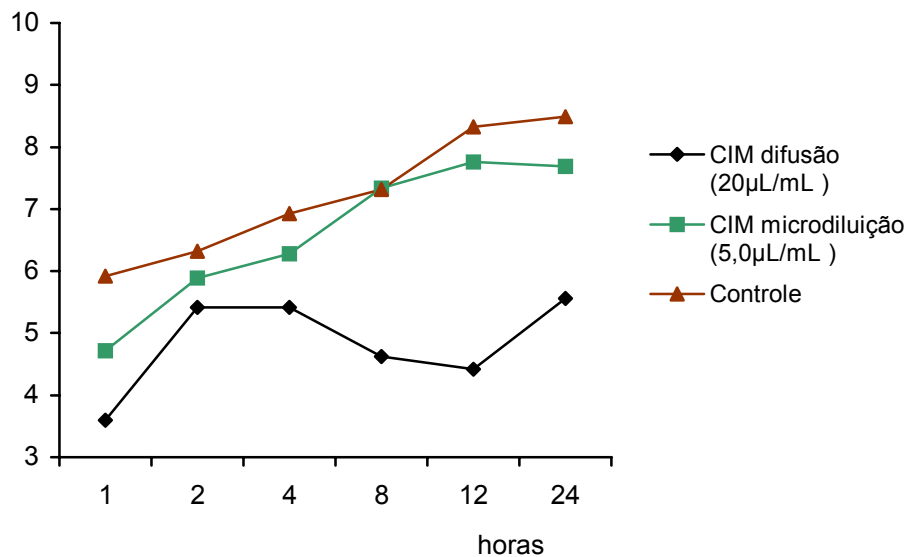
**Figura 20** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Salmonella enterica*



**Figura 21** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Echerichia coli*



**Figura 22** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Serratia mercencens*



**Figura 23** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Yersinia enterocolitica*

Verifica-se, que a população microbiana encontrada ao final do último tempo analisado (24 horas) apresentou valores sempre ao redor de  $10^6$  UFC/mL, ou seja, muito próximos do inóculo microbiano inicial utilizado. Por sua vez, o experimento controle mostrou no tempo 24 horas uma população microbiana entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC/mL, ou seja, um aumento ao redor de 100 a 1000 vezes do valor do inóculo inicial.

Esta observação evidencia uma ação bacteriostática (diminuição da taxa de crescimento) do óleo essencial de *O. vulgare* sobre as cepas bacterianas ensaiadas. Este efeito bacteriostático ficou bem evidenciado nas interações com *E. coli* (Figura 21) e *S. mercencens* (Figura 22) após 12 horas de interação. A ação bacteriostática caracteriza-se pela efetividade de uma substância em tornar uma bactéria incapaz de crescer/multiplicar-se em caldo, porém capaz de ser cultivada quando uma alíquota do caldo de incubação é plaqueada em um ágar adequado para o seu crescimento (SMITH-PALMER et al., 1998).

Em todas as interações, a CIM determinada pela técnica de difusão em meio sólido apresentou resultados com diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos resultados do experimento controle. De outra forma, a CIM determinada pela técnica de microdiluição não foi capaz de causar uma diferença estatisticamente significante para todas as cepas bacterianas ensaiadas. *B. cereus* apresentou-se como a cepa bacteriana mais sensível à ação da CIM obtida pela técnica de microdiluição, mostrando valores de UFC/mL sempre menores dos encontrados no experimento controle. As demais cepas de bactérias, mostraram valores de UFC/mL iguais ou maiores daqueles encontrados no experimento controle em pelo menos um dos tempos analisados.

A eficácia da CIM determinada pela técnica de difusão em meio sólido em inibir o crescimento das cepas bacterianas mostrou-se mais intensa até o tempo de 8 horas de interação. Após este período, o número de UFC/mL apresentou uma maior tendência de estabelecer um crescimento progressivo, porém nunca atingindo o valor do experimento controle. Alguns patógenos veiculados por alimentos quando expostos à ação de compostos com propriedades antimicrobianas podem exibir inicialmente uma exponencial diminuição da sua capacidade de crescimento, seguida por um subsequente aumento de resistência, caracterizando um estágio de proteção ao *stress* causado pela substância antimicrobiana (ROWAN, 1999). No caso da ocorrência deste fenômeno, as células microbianas resistentes que não representavam, em um primeiro momento, o maior número na população microbiana inicial, representam ao passar do tempo uma maior proporcionalidade dentro da população total.

A possibilidade da ocorrência deste fenômeno ficou muito bem marcada quando verificado a cinética de crescimento apresentada por *S. mercencens* (Figura 22) em interação com a CIM da técnica de difusão em meio sólido até o tempo de 12 horas de exposição. Nota-se uma exponencial diminuição da população microbiana até o tempo de 2 horas de interação, seguido por um menor efeito de redução no intervalo de 4 horas, e por fim, apresentando uma curva ascendente de crescimento até 12 horas de interação.

Ainda, a CIM determinada pela técnica de difusão em meio sólido marcadamente mostrou um poder de prolongamento do tempo de duração da fase lag de *S. aureus* (Figura 18), *B. cereus* (Figura 19) e *E. coli* (Figura 21). A duração da fase lag (ou fase estacionária) da curva de crescimento bacteriano é tomada como um indicador do tempo que uma dada bactéria desprende para que ocorra

uma adaptação a um novo meio ao qual foi exposta. Desta forma, quanto mais prolongada for a fase lag, ocorre uma maior dificuldade do microrganismo se adaptar ao novo meio, e assim, não estabelecer um comportamento de crescimento exponencial (TRABULSI et al., 2002). Valero e Salmerón (2003) notaram que o óleo essencial de *O. vulgare* (25 µg/mL) foi efetivo na extensão (tempo de duração) da fase lag da curva de crescimento de cepas de *B. cereus*.

Sagdiç et al. (2002) em estudo do efeito de vários extratos de especiarias sobre o crescimento de *E. coli* O157:H7, observaram que o extrato de *O. vulgare* nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0% foi capaz de causar uma total eliminação do inóculo bacteriano em cinco dias de exposição, caracterizando uma ação bactericida. Sagdiç (2003) em análise da ação do hidrossol de *O. vulgare* sobre *S. aureus*, *E. coli* e *Y. enterocolitica*, verificou efeito bactericida depois de 48 horas de exposição. Hidrossol, também chamado água floral ou água aromática, é um produto derivado da hidrodestilação de produtos vegetais, caracterizando-se como uma mistura complexa contendo traços de óleos essenciais e muitos compostos solúveis em água.

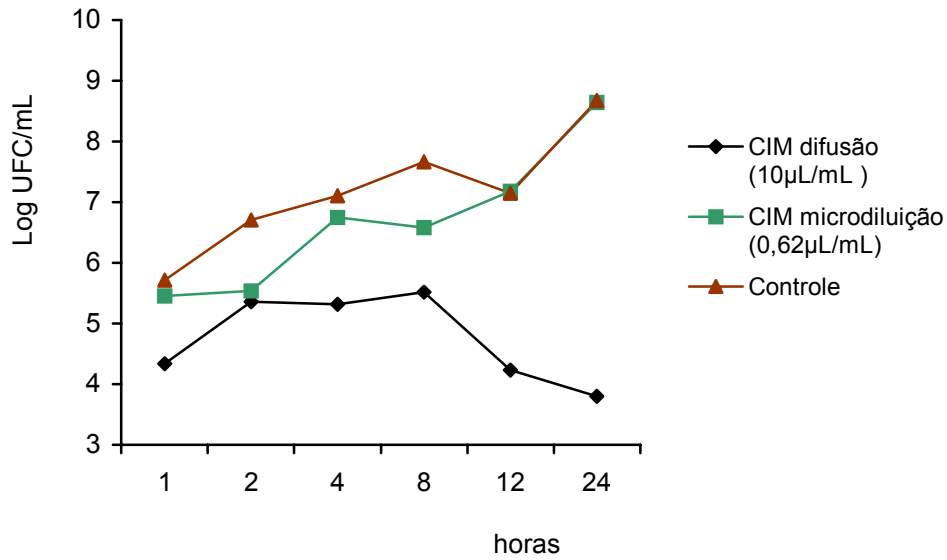
As Figuras 24, 25 e 26 mostram o efeito da CIM do óleo essencial de *O. vulgare* determinada através da técnica de difusão em meio sólido e de microdiluição sobre a viabilidade de cepas de leveduras de interesse em alimentos. A escolha das cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* para o estudo da interferência da CIM sobre a viabilidade microbiana baseou-se no reconhecimento do gênero *Candida* como principal grupo de leveduras deteriorantes de alimentos, bem como na considerável freqüência de isolamento de suas espécies em amostras de alimentos (ROOSTITA; FLEET, 1996; WELTHAGE; VILJOEN, 1999; XAVIER, 2003).



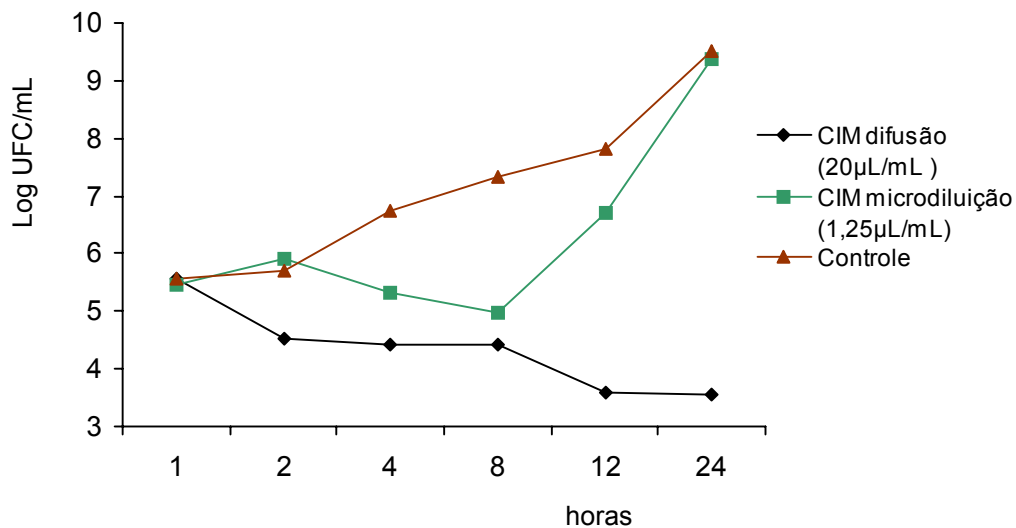
Seguindo o mesmo comportamento verificado nos ensaios com as cepas bacterianas, a CIM determinada pela técnica de difusão em meio sólido mostrou resultados com diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao experimento controle para todas as cepas de leveduras ensaiadas. A CIM determinada pela técnica de microdiluição mostrou resultado com diferença estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ) somente quando em interação com *C. krusei*.

A ação microstática da CIM da técnica de difusão em meio sólido supra citada para as bactérias, novamente foi observada sobre *C. tropicalis* (Figura 26). Diferentemente, quando em interação com *C. albicans* (Figura 24) e *C. krusei* (Figura 25) observou-se um efeito fungicida, provocando uma diminuição de 3 ciclos logarítmicos do número de células viáveis quando relacionado ao inóculo inicial. Alguns pesquisadores têm considerando que um composto deve ser reconhecido como possuidor de um forte efeito fungicida quando capaz de causar uma diminuição de 1000 vezes (3 ciclos logarítmicos ou 99,9%) do inóculo inicial (ESPINEL INGROFF et al., 1992; ERNST et al., 1996).

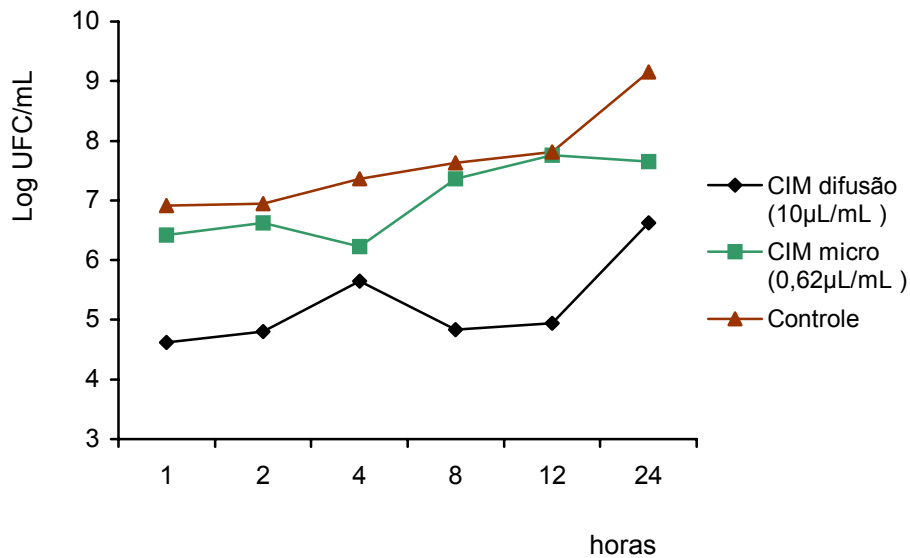
Arora e Kaur (1999) observaram forte efeito fungicida de extratos de especiarias sobre *C. albicans*, *C. acutus*, *C. inconspicua* e *Trignopsis variabilis*, provocando total eliminação do inóculo microbiano entre 1 e 5 horas de exposição.



**Figura 24** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Candida albicans*



**Figura 25** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Candida krusei*



**Figura 26** - Efeito da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre o número de células viáveis de *Candida tropicalis*

As Tabelas 5 e 6 mostram o percentual de redução do número de células viáveis (UFC/mL) causado pela ação da CIM do óleo essencial de *O. vulgare* determinada pela técnica de difusão em meio sólido e microdiluição sobre as cepas de bactérias e de leveduras em relação à contagem do experimento controle. Verifica-se, que embora a CIM obtida pela técnica de microdiluição não tenha, de uma forma geral, apresentado resultados estatisticamente significantes de inibição da viabilidade das cepas microbianas ensaiadas, ocorreu em alguns intervalos de tempo uma considerável inibição percentual do número de UFC/mL. Em algumas interações, os percentuais de inibição causados pelos dois valores de CIM mostraram resultados muito próximos.

**Tabela 5** - Percentual de inibição do número de células viáveis (UFC/mL) de bactérias de interesse em alimentos frente à CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição em relação ao experimento controle

Bactérias	CIM	Tempo (horas)					
		1	2	4	8	12	24
<i>B. cereus</i>	DMS	97,9%	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%
	MCD	90,8%	99,4%	98,0%	95,6%	97,7%	86,3%
<i>E. coli</i>	DMS	93,1%	99,8%	99,0%	99,9%	99,5%	99,8%
	MCD	97,0%	99,3%	5,9%	83,9%	88,6%	90,8%
<i>S. aureus</i>	DMS	98,9%	99,8%	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%
	MCD	4,0%	26,9%	-16,6%*	93,3%	46,1%	-50,0%*
<i>S. enterica</i>	DMS	99,9%	98,8%	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%
	MCD	68,8%	66,7%	36,6%	45,5%	80,7%	98,7%
<i>S. mercencens</i>	DMS	- 50,0%*	98,2%	99,9%	99,8%	99,1%	99,1%
	MCD	-16,0%*	-57,1%*	50,0%*	91,7%	95,1%	90,7%
<i>Y. enterocolitica</i>	DMS	95,2%	87,6%	97,1%	99,8%	72,4%	97,8%
	MCD	93,7%	62,9%	77,7%	-4,8%*	72,4%	84,2%

\* Número de UFC/mL maior no ensaio tratado com o óleo essencial quando comparado ao experimento controle

DMS: CIM determinada pela técnica de difusão em meio sólido

MCD: CIM determinada pela técnica de microdiluição

**Tabela 6** - Percentual de inibição do número de células viáveis (UFC/mL) de leveduras de interesse em alimentos frente à CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. determinada através da técnica de difusão em meio sólido e microdiluição em relação ao experimento controle

Leveduras	CIM	Tempo (horas)					
		1	2	4	8	12	24
<i>C. albicans</i>	DMS	95,8%	95,5%	98,4%	98,9%	99,9%	99,9%
	MCD	46,2%	93,1%	57,0%	91,7%	-7,1%*	6,4%
<i>C. krusei</i>	DMS	5,2%	93,3%	99,5%	99,9%	99,9%	99,9%
	MCD	23,7%	-15,8%*	96,2%	99,6%	87,6%	32,4%
<i>C. tropicalis</i>	DMS	99,5%	99,3%	98,0%	99,9%	99,8%	99,7%
	MCD	67,9%	52,3%	79,6%	46,5%	14,9%	97,8%

\* Número de UFC/mL maior no ensaio tratado com o óleo essencial quando comparado ao ensaio controle

DMS: CIM determinada pela técnica de difusão em meio sólido

MD: CIM determinada pela técnica de microdiluição

A intensa atividade antimicrobiana mostrada por *O. vulgare* em alguns estudos está, muito provavelmente, relacionada com a sua fração óleo essencial (TSIGARIDA et al., 2000). Geralmente, os óleos essenciais que possuem as mais destacáveis propriedades antimicrobianas sobre patógenos veiculados por alimentos apresentam uma alta percentagem de compostos fenólicos (JULIANO et al., 2000). Por sua vez, o óleo essencial de *O. vulgare* possui uma riqueza em compostos fenólicos, os quais são acreditados como sendo os responsáveis por sua intensa atividade antimicrobiana. De fato, os compostos fenólicos são capazes de dissolverem-se na membrana microbiana, e, desta forma, penetrarem dentro da célula onde podem interagir com mecanismos essenciais para o metabolismo microbiano (MARINO et al., 2001). Carvacrol, um composto fenólico, reconhecido como um dos componentes majoritários do óleo essencial de *O. vulgare* pode,

possivelmente, ser o principal componente responsável pela intensa atividade antimicrobiana de tal produto (VALERO; SALMERÓN, 2003). Contudo, pesquisas têm sugerido que os componentes minoritários de óleos essenciais também podem exercer importante papel no desencadeamento dos fenômenos envolvidos na eficiência da atividade antimicrobiana (MILOS et al., 2000). Seguindo este pensamento, infere-se que cada componente do óleo essencial tem sua própria contribuição no desencadeamento de uma dada propriedade biológica.

Sabendo-se do grande número de diferentes constituintes químicos encontrados em óleos essenciais, possivelmente, sua atividade antimicrobiana não está relacionada com um mecanismo específico, de outra forma, acredita-se que ocorra uma ação concomitante de vários compostos sobre diferentes alvos na célula microbiana (CARSON et al., 2002). Perturbação da membrana citoplasmática, ruptura do fluxo de elétrons, perturbação do transporte ativo, inibição de atividade de enzimas e coagulação do conteúdo citoplasmático são alguns mecanismos envolvidos na promoção do poder antimicrobiano dos óleos essenciais. Acredita-se, que nem todos estes mecanismos ocorram de forma separada, de modo que alguns deles, possivelmente, possam ser ativados como consequência de outros mecanismos previamente desencadeados (SIKKEMA et al., 1995; COX, 2000).

Embora vários estudos tenham mostrado a atividade antimicrobiana de especiarias e seus produtos derivados (óleos essenciais, extratos, constituintes químicos) em meio laboratorial, o número de pesquisas com ênfase na atividade antimicrobiana destes produtos em alimentos ainda é considerado pequeno (POL et al., 2001). A partir da última década de 90, ocorreu um aumento no número de pesquisas com um enfoque na efetividade de óleo essenciais como inibidores do

crescimento de microrganismos em matrizes alimentares líquidas ou sólidas (PANDIT; SHELEF, 1994; HAO et al., 1998; SMITH-PALMER et al., 2001).

As Tabelas 7 e 8 mostram o efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *O. vulgare* sobre a contagem de bactérias aeróbias mesófilas e/ou anaeróbias facultativas viáveis e de fungos filamentosos e leveduriformes em carne moída armazenada sob refrigeração. A escolha das concentrações do óleo essencial (80, 40 e 20  $\mu\text{L/mL}$ ) baseou-se no intervalo de valores de CIM determinados através da técnica de difusão em meio sólido encontrados para a maioria das cepas inseridas nos testes antimicrobianos. Como discutido acima, os valores de CIM obtidos pela técnica de difusão em meio sólido foram capazes de apresentar destacável inibição da viabilidade das cepas de bactérias e de leveduras ensaiadas.

A carne e seus derivados apresentam alta suscetibilidade às contaminações microbianas, podendo causar depois de seu estabelecimento alterações de seus caracteres organolépticos, redução de suas propriedades nutritivas, além de representar um risco à saúde do consumidor (HUGAS, 2008). Os produtos cárneos estão expostos a contaminações microbianas em todas as fases de seu processamento, principalmente nas operações em que mais ocorre manipulação (ODOÑES, 2005). Particularmente, a microbiota presente na carne moída depende de vários fatores, a citar: qualidade da matéria-prima, condições higiênico-sanitárias do processamento, e tempo e temperatura de armazenamento (PARDI, 1993). Diante desta realidade, ao longo do tempo vêm se estudando elementos e processos que possam ser empregados no controle do crescimento e sobrevivência microbiana nestes alimentos, a citar: salga, defumação, uso adequado de embalagens, atmosferas modificadas, refrigeração, aditivos químicos, dentre outros procedimentos.

**Tabela 7** - Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o número de bactérias aeróbias mesófilas e/ou anaeróbias facultativas viáveis (UFC/g) em carne moída armazenada sob refrigeração

Tempo (horas)	Concentrações do óleo essencial					
	80 µL/mL <sup>a</sup>		40 µL/mL <sup>a</sup>		20 µL/mL <sup>a</sup>	
	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle
24	2,1x10 <sup>5</sup> (±0,28)	8,2x10 <sup>8</sup> (±0,05)	1,2x10 <sup>6</sup> (±0,16)	1,1x10 <sup>9</sup> (±0,18)	8,9x10 <sup>7</sup> (±0,03)	9,6x10 <sup>8</sup> (±0,05)
48	1,3x10 <sup>7</sup> (±0,10)	4,5x10 <sup>8</sup> (±0,01)	5,1x10 <sup>7</sup> (±1,1)	9,1x10 <sup>8</sup> (±0,74)	6,8x10 <sup>7</sup> (±0,84)	2,1x10 <sup>9</sup> (±0,32)
72	2,1x10 <sup>8</sup> (±0,18)	4,8x10 <sup>9</sup> (±0,06)	7,2x10 <sup>7</sup> (±0,04)	2,9x10 <sup>9</sup> (±0,26)	5,2x10 <sup>8</sup> (±0,11)	7,3x10 <sup>9</sup> (±0,07)

<sup>a</sup> concentração capaz de apresentar resultados (UFC/g) com diferenças significantes (p<0,05) determinadas pelo teste t de Student

**Tabela 8** - Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o número de fungos filamentosos e leveduriformes (UFC/g) em carne moída armazenada sob refrigeração

Tempo (horas)	Concentrações do óleo essencial					
	80µL/mL <sup>a</sup>		40 µL/mL <sup>a</sup>		20 µL/mL	
	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle
24	5,1x10 <sup>4</sup> (±0,21)	6,8x10 <sup>7</sup> (±0,07)	1,2x10 <sup>7</sup> (±0,12)	4,1x10 <sup>8</sup> (±0,09)	9,0x10 <sup>7</sup> (±0,06)	3,1x10 <sup>9</sup> (±0,09)
48	8,4x10 <sup>6</sup> (±0,05)	9,3x10 <sup>9</sup> (±0,03)	3,1x10 <sup>7</sup> (±0,35)	6,1x10 <sup>8</sup> (±0,07)	7,7x10 <sup>8</sup> (±0,03)	6,2x10 <sup>9</sup> (±0,06)
72	3,5x10 <sup>7</sup> (±0,04)	6,8x10 <sup>9</sup> (±0,09)	3,7x10 <sup>7</sup> (±0,08)	1,1x10 <sup>9</sup> (±0,07)	9,3x10 <sup>8</sup> (±0,03)	8,9x10 <sup>9</sup> (±0,04)

<sup>a</sup> concentração capaz de apresentar resultados (UFC/g) com diferenças significantes (p<0,05) determinadas pelo teste de Student



Verifica-se um destacável poder de inibição do óleo essencial de *O. vulgare* sobre o crescimento da microbiota nativa do substrato ensaiado. A atividade inibitória apresentou-se mais intensa sobre o número de bactérias aeróbias e/ou anaeróbias facultativas viáveis, pois os resultados de redução do número de UFC/g mostraram diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao experimento controle para todas as concentrações do óleo essencial testadas. Por sua vez, somente as soluções com as concentrações de 80 e 40  $\mu\text{L}/\text{mL}$  mostraram resultados com diferenças estatisticamente significantes sobre a população fúngica do substrato.

A Tabela 9 mostra o percentual de redução do número de bactérias aeróbias mesófilas e/ou anaeróbias facultativas viáveis e de fungos filamentosos e leveduriformes em carne moída armazenada sob refrigeração, causada pelas diferentes concentrações do óleo essencial de *O. vulgare* em relação à contagem do experimento controle. Verifica-se, que as soluções do óleo essencial apresentaram, ao longo dos três tempos analisados, um destacável poder inibição da microbiota autóctone do substrato, mesmo quando observado os valores encontrados para a contagem de fungos filamentosos e leveduriformes no ensaio com a aplicação da solução com concentração de 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

A propriedade antimicrobiana do óleo essencial ensaiado torna-se mais proeminente quando se considera a alta carga microbiana do substrato utilizado no micromodelo de conservação de alimentos. É fato bem estabelecido que, quanto maior e mais diversificada a microbiota de um substrato, mais difícil será a instalação de uma ação antimicrobiana significativa por parte de uma dada substância (MENON; GAR, 2001; BAYDAR et al., 2004; NOSTRO et al., 2004).

**Tabela 9** - Inibição percentual do número (UFC/g) de bactérias aeróbias mesófilas e/ou anaeróbias facultativas viáveis e de fungos filamentosos e leveduriformes em carne moída armazenada sob refrigeração causada por diferentes concentrações do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em relação ao experimento controle

Microrganismos	μL/mL*	Tempo (horas)		
		24	48	72
BAM	80	99,9%	97,1%	95,6%
FFL		99,%	99,9%	99,4%
BAM	40	99,9%	94,4%	97,5%
FFL		97,1%	94,9%	96,6.%
BAM	20	90,7%	96,8%	92.9%
FFL		97,1%	87,6%	89.6%

\*concentração do óleo essencial de *O. vulgare*

BAM: bactérias aeróbias mesófilas e/ou anaeróbias facultativas viáveis

FFL: fungos filamentosos e leveduriformes

Em soma, foi observado que as amostras de carne moída utilizadas como experimentos controle apresentaram início de sinais de deterioração microbiana, caracterizado por alteração de seus caracteres organolépticas como mudanças de odor, cor e formação de limo, a partir de 48 horas de armazenamento, ficando tais alterações fortemente evidentes no tempo de 72 horas. Diferentemente, as amostra de carne moída que sofreram adição das soluções do óleo essencial não apresentaram sinais evidentes de deterioração microbiana nos tempos analisados.

A literatura relata que a maioria dos alimentos apresenta visíveis sinais de deterioração microbiana quando ocorre a presença de contagens de bactérias aeróbias mesófilas e/ou anaeróbias facultativas viáveis superiores a  $10^6$  UFC/mL ou g (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Observa-se, que em alguns tempos os valores de

contagem de UFC/mL ou g encontrados para os substratos tratados com as soluções do óleo essencial (Tabela 7 e 8) mostraram-se superiores a este valor de referência, de modo que tal fato pode ser tomado como um indicador do poder do óleo essencial de *O. vulgare* em “mascarar” as possíveis alterações organolépticas por ventura ocorrentes.

Alguns pesquisadores têm encontrado efetividade inibitória de óleos essenciais de especiarias sobre a microbiota autóctone de diferentes alimentos como carne bovina picada (TSIGARIDA et al., 2000; SKANDAMIS; NYCHAS, 2001), leguminosas (WAN et al., 1998), frutas (ROLLER; SEEDHAR, 2002), produtos lácteos (TASSOU et al., 1995), cereais (ULTEE et al., 2000) e queijos (SMITH-PALMER et al., 2001).

Mesmo encontrando satisfatório poder antimicrobiano da CIM do óleo essencial de *O. vulgare* quando aplicado em microsistema de conservação de alimento, vale ressaltar que, em geral, maiores concentrações de óleo essencial de especiarias são necessárias para que seja alcançada uma efetividade antimicrobiana em alimentos similar àquela obtida em experimentos em meio laboratorial. Encontraram-se valores de concentrações duas vezes maiores em leite semidesnatado (KARATZAS et al., 2001), dez vezes em salsicha suína (PANDIT; SHELEF, 1994), cinqüenta vezes em refeição tipo sopa (ULTEE; SMID, 2001) e de vinte e cinco a cem vezes em queijo (MENDOZA-YEPEZ et al., 1997).

Ainda não se tem bem estabelecido o mecanismo responsável pela menor efetividade antimicrobiana de óleos essenciais quando aplicados em alimentos. Sugere-se, que a grande variabilidade de nutrientes em alimentos comparada ao meio laboratorial poderia fornecer condições para que a célula microbiana se recupere de forma mais rápida do dano celular (GILL et al., 2002). Também, se

supõe que o alto conteúdo de gordura e/ou de proteína presente em certos alimentos poderia de alguma forma proteger os microrganismos da ação de óleos essenciais (TASSOU et al., 1995). Relata-se, a possibilidade do óleo essencial dissolver-se na fase lipídica do alimento, tornando-se assim menos disponível para agir sobre os microrganismos presentes na fase aquosa (MEJLHOLM; DALGAARD, 2002). Já se estabeleceu que a reação entre carvacrol, um composto fenólico presente em vários óleos essenciais, e proteínas é um fator limitante de sua atividade inibitória sobre *B. cereus* em leite (POL et al., 2001). O conteúdo de proteína foi reconhecido como fator limitante da ação do óleo essencial de cravo sobre *S. enteridis* em queijo com baixo teor de gordura (SMITH-PALMER et al., 2001). De outra forma, o conteúdo de carboidratos em alimentos parece não interferir na ação antimicrobiana de óleos essenciais (BURT, 2004).

Tanto as propriedades intrínsecas do alimento (conteúdo de proteínas, conteúdo de lipídeos, atividade de água, presença de antioxidantes, pH, conteúdo de sal) como os determinantes extrínsecos (temperatura de armazenamento, embalagem, características dos microrganismos) podem influenciar na efetividade antimicrobiana de óleos essenciais (TASSOU et al., 1995; POL et al., 2001). Geralmente, a susceptibilidade de microrganismos a óleos essenciais tende a aumentar com uma diminuição do pH do alimento, da temperatura de armazenamento e da quantidade de oxigênio dentro da embalagem (TASSOU et al., 1995; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000).

Um dos questionamentos acerca da possibilidade do emprego de óleos essenciais em sistemas de conservação de alimentos consiste na dúvida do comportamento destes produtos quando aplicados conjuntamente com outros agentes ou procedimentos utilizados para o alcance da segurança microbiológica de

alimentos. Alguns autores têm notado um comportamento sinérgico de óleos essenciais quando aplicados conjuntamente com NaCl (WENDAHOON; SAKAGUCHI, 1993; TASSOU et al., 1995), nitrito de sódio (ISMAEL; PIERSON, 1990), nisina (POL; SMID, 1999; PERIAGO et al., 2001), calor moderado (45°C por 30 minutos) (KARATZAS et al., 2000) e alta pressão hidrostática (KARATZAS et al. 2001).

Tomando como base o conceito de óleos essenciais, no qual os considera como a fração volátil presente em várias partes de um vegetal, suscita a indagação sobre a capacidade destas substâncias em manter suas propriedades biológicas, incluindo a propriedade antimicrobiana, quando submetidos a altas temperaturas. Em um pensamento de uso de óleos essenciais na conservação de alimentos, a disponibilidade de informações acerca da relação da atividade antimicrobiana e aquecimento torna-se de suma importância, quando considerado que o uso de altas temperaturas configura como um dos mais tradicionais métodos utilizados na conservação de alimentos. A Tabela 10 mostra a CIM do óleo essencial de *O. vulgare* após exposição a diferentes temperaturas sobre cepas de microrganismos de interesse em alimentos.

Verifica-se que o óleo essencial de *O. vulgare* manteve sua potencialidade antimicrobiana após a exposição as diferentes temperaturas, evidenciada pela detecção de similares valores de CIM encontrados para a alíquota do óleo essencial mantido a temperatura ambiente e para as alíquotas submetidas as diferentes temperaturas de aquecimento. A exposição do óleo essencial às diferentes temperaturas não foi capaz de causar diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) entre os valores de CIM. Diferentes valores de CIM foram somente observados na interação com *Y. enterocolitica*, quando as alíquotas do óleo essencial expostas às

temperaturas de 100 e 120°C mostraram um valor de CIM (10 µL/mL) menor daquele apresentado quando submetido às demais temperaturas.

**Tabela 10** – Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. após exposição a diferentes temperaturas sobre microrganismos de interesse em alimentos

Microrganismos	CIM (µL/mL)				
	TA <sup>a</sup>	60°C <sup>a</sup>	80°C <sup>a</sup>	100°C <sup>a</sup>	120°C <sup>a</sup>
<i>B. cereus</i>	20	20	20	20	20
<i>E. coli</i>	40	40	40	40	40
<i>S. aureus</i>	20	20	20	20	20
<i>S. enterica</i>	40	40	40	40	40
<i>S. mercencens</i>	20	20	20	20	20
<i>Y. enterocolitica</i>	20	20	20	10	10
<i>C. albicans</i>	10	10	10	10	10
<i>C. krusei</i>	20	20	20	20	20
<i>C. tropicalis</i>	10	10	10	10	10

TA: temperatura ambiente

<sup>a</sup> tratamentos seguidos pela mesma letra não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0.05$ ) determinadas através do teste de Tukey para os valores de CIM

Nenhum relato na literatura tem sido encontrado acerca da interferência de altas temperaturas sobre a efetividade antimicrobiana de óleos essenciais. Tomaino et al. (2005) relataram que o aquecimento (80, 100, 120, 180°C por 3 horas) do óleo essencial de algumas especiarias não provocou alteração das suas propriedades antioxidantes. De outra forma, algumas pesquisas envolvendo o aquecimento de óleos essenciais em modelo mimético de fritura (180°C por 10 minutos) têm encontrado uma forte diminuição da capacidade antioxidante de óleos essenciais,

detectada através de uma diminuição de  $\alpha$ -tocoferol em óleo de oliva conseqüente à degradação oxidativa térmica (GORDON; KOURIMSKA, 1995; QUILEZ et al., 2002).

Estes dados acerca da manutenção do potencial antimicrobiano do óleo essencial de *O. vulgare* após aquecimento tornam-se um achado de alta relevância, pois aparece como um indicador do seu possível uso concomitante à aplicação de altas temperaturas, onde o óleo essencial poderia agir como agente coadjuvante potencializando o efeito antimicrobiano térmico, bem como poderia, possivelmente, agir como agente antimicrobiano principal. Faz-se necessário ressaltar que o princípio básico do controle microbiano em alimentos sustenta-se na utilização de um conjunto de forças (conceito dos obstáculos) que irá proporcionar a obtenção de produtos alimentícios estáveis, de prolongada vida de prateleira, e seguros à saúde do consumidor (RAY, 1996; RIEDEL, 2005).

A Tabela 11 mostra a composição qualitativa e quantitativa do óleo essencial de *O. vulgare* após exposição a diferentes temperaturas. A análise de composição do óleo essencial resultou na identificação de 14 componentes, representando valores entre 95.72% e 97.36% do total do óleo. A Figura 27, 28, 29, 30 e 31 mostram os cromatogramas dos íons totais das alíquotas do óleo essencial de *O. vulgare* submetidos à diferentes tratamentos térmicos.

Os principais componentes encontrados na alíquota do óleo essencial de *O. vulgare* mantido a temperatura ambiente foram carvacrol (68.06%), *p*-cimeno (15,91%),  $\alpha$ -pineno (2,56%), mirceno (2,03%),  $\gamma$ -terpineno (1,87%), trans-cariofileno (1,33%) e limoneno (1,28%), de modo que os demais componentes encontrados apresentaram percentual inferior a 1,0%. As alíquotas do óleo essencial expostas às diferentes temperaturas de aquecimento mostraram similar composição quando comparada com a alíquota mantida a temperatura ambiente, porém sendo notada

uma pequena diferença nos valores percentuais de seus componentes. A exposição do óleo essencial às diferentes temperaturas não foi capaz de causar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na sua composição.

**Tabela 11** - Composição qualitativa e quantitativa do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. após exposição a diferentes temperaturas \*

Componentes	IR**	IR***	Temperatura de exposição				
			TA <sup>a</sup>	60°C <sup>a</sup>	80°C <sup>a</sup>	100°C <sup>a</sup>	120°C <sup>a</sup>
triciclono	925	926	0,28	0,28	0,28	0,24	0,20
$\alpha$ -pineno	932	939	2,56	2,47	2,42	2,25	1,78
canfeno	946	953	0,26	0,29	0,20	0,23	0,20
$\beta$ -pineno	974	980	0,45	0,45	0,42	0,35	0,27
mirreno	988	991	2,03	1,90	1,74	1,83	1,40
<i>o</i> -cimeno	1014	1022	0,48	0,49	0,48	0,44	0,26
<i>p</i> -cimeno	1020	1026	15,91	15,63	15,16	14,90	12,85
limoneno	1026	1031	1,28	1,29	1,27	1,19	0,96
1,8-cineol	1028	1033	0,92	0,87	0,86	0,88	0,84
$\gamma$ -terpineno	1055	1062	1,87	1,76	1,65	1,60	1,34
borneol	1161	1165	0,38	0,39	0,37	0,40	0,37
diidrocarveol	1185	1192	0,29	0,27	0,31	0,29	0,26
carvacrol	1298	1298	68,06	69,02	70,27	70,60	74,58
trans-cariofileno	1417	1418	1,33	1,38	1,30	1,16	1,14
Total			95,72	96,49	96,73	97,36	96,45

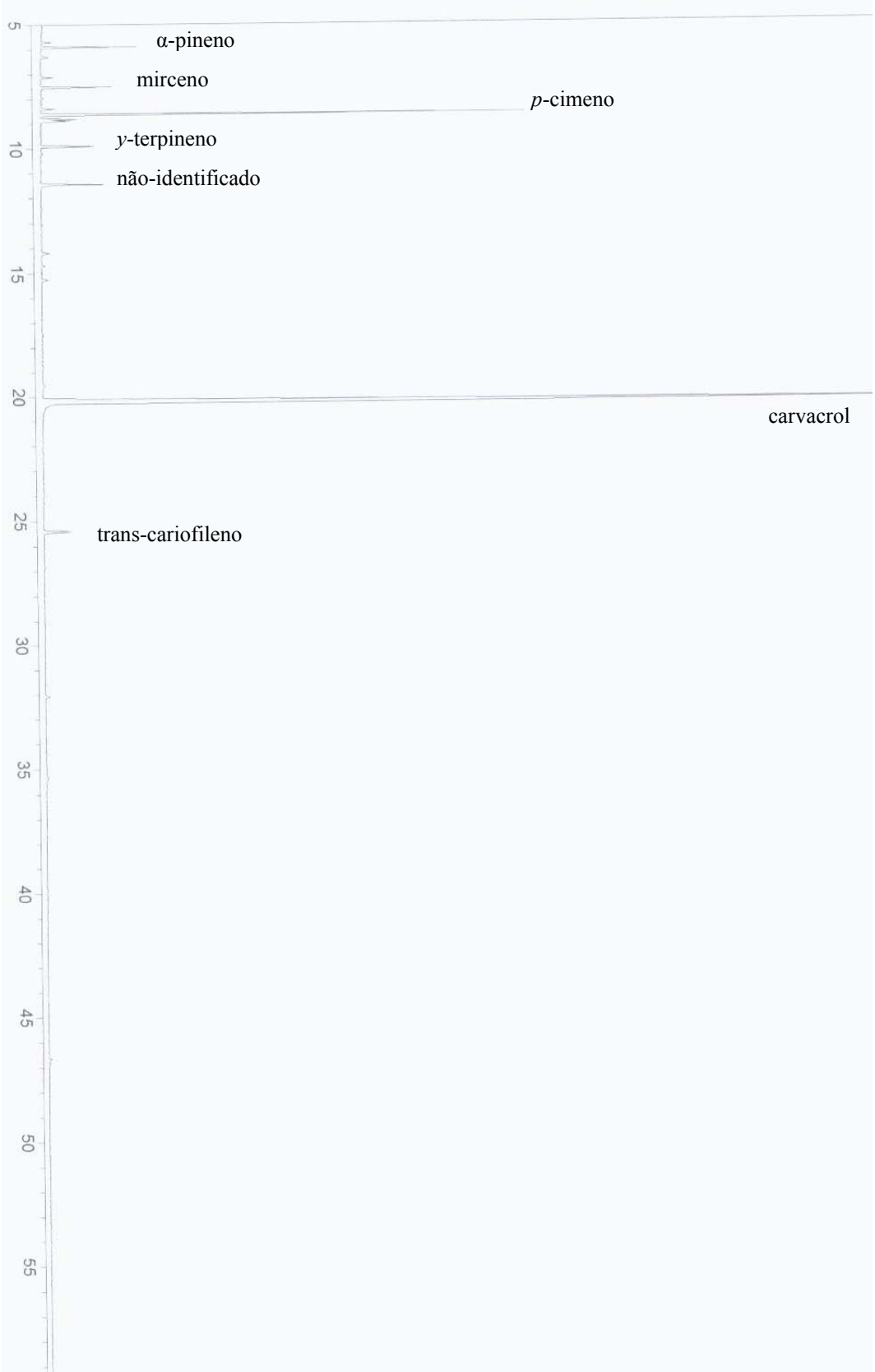
\*resultados expressos em conteúdo percentual dos componentes percentual de área dos componentes

\*\*índice de retenção experimental;

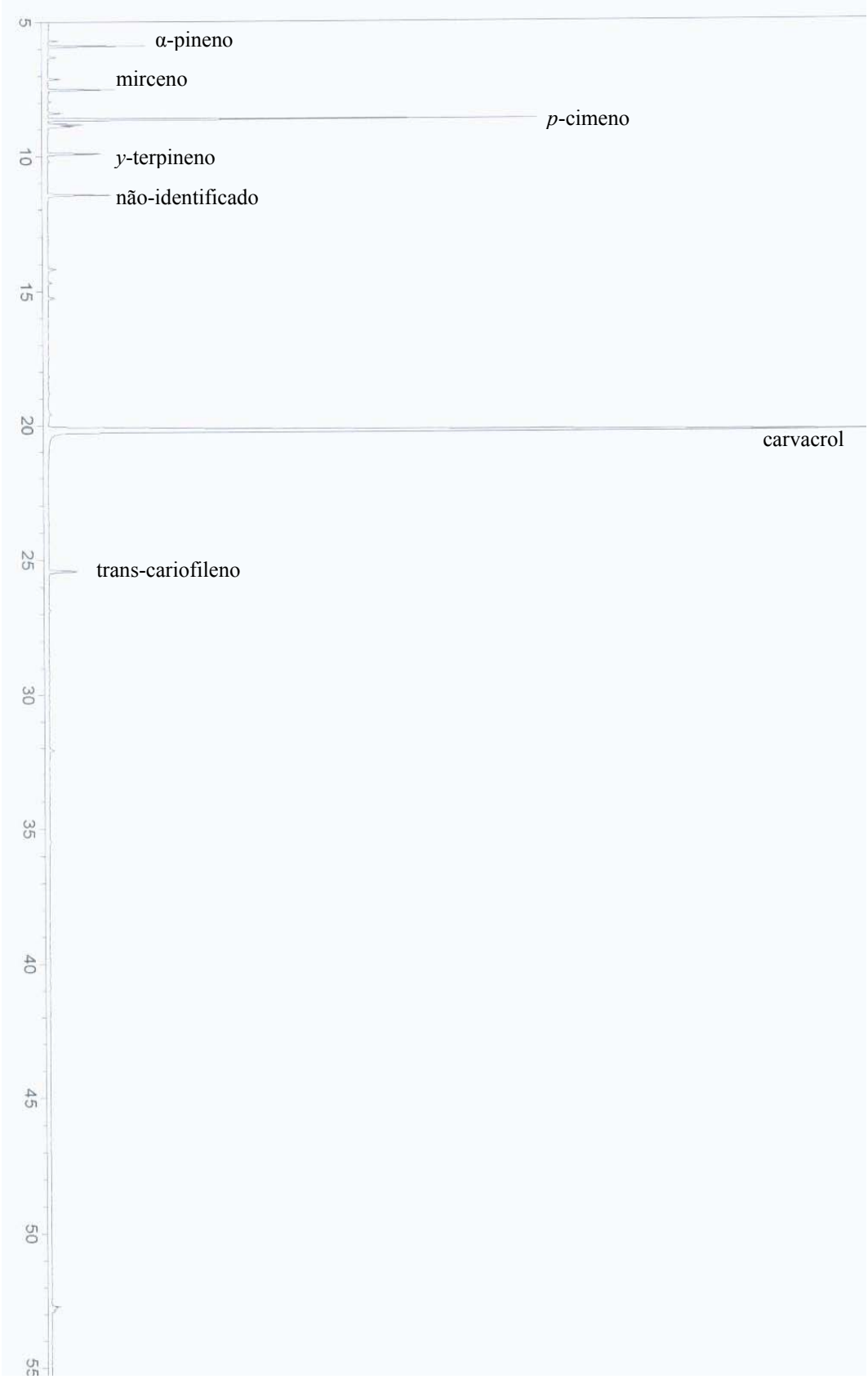
\*\*\* índice de retenção da literatura;

TA: temperatura ambiente; <sup>a</sup> tratamentos seguidos da mesma letra não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) determinada através do teste de Tukey na composição do óleo essencial





**Figura 27** - Cromatograma dos íons totais do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. exposto à temperatura ambiente por 1 hora



**Figura 28** - Cromatograma dos íons totais do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. exposto a 60°C por 1 hora



**Figura 29** - Cromatograma dos íons totais do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. exposto a 80°C por 1 hora



**Figura 30** - Cromatograma dos íons totais do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. exposto a 100°C por 1 hora



**Figura 31** - Cromatograma dos íons totais do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. exposto a 120°C por 1 hora

Particularmente, observou-se uma maior concentração de carvacrol à medida que a temperatura de exposição foi aumentada (TA: 68,06%, 60°C: 69,02%, 80°C: 70,27%; 100°C: 70,6%; 120°C: 74,58%). Este aumento na quantidade de carvacrol ocorreu de forma mais significativa após a exposição do óleo essencial a temperatura de 120°C, de modo que concomitantemente observou-se uma diminuição considerável dos demais componentes. O aumento na quantidade relativa de carvacrol no óleo essencial proporcional ao aumento na temperatura de exposição pode ser tomado como um indicador de maior estabilidade térmica de tal componente.

Entre os compostos identificados em maior percentual, alguns foram previamente relatados como possuidores de propriedades antimicrobianas, incluindo carvacrol (RUBERTO; BARATA, 2000; FERRARA et al., 2003; SALGUEIRO et al., 2003), *p*-cimeno (BURT, 2004), mirceno (NOVAK et al., 2003; DUARTE et al., 2005),  $\gamma$ -terpineno (JUVEN et al., 1994; MARINO et al., 2001; MARÍN et al., 2004) e limoneno (MAZZANTI et al., 1998; FABIO et al., 2003). Ademais, alguns dos componentes minoritários identificados, como  $\beta$ -pineno e 1,8 cineol, também são citados como possuidores de potencial antimicrobiano (FERRARA et al., 2003; NAKATANI, 2003).

A análise da composição do óleo essencial mostrou a presença de monoterpenos (*o*-cimeno, *p*-cimeno,  $\alpha$ -pineno, mirceno,  $\gamma$ -terpineno, canfeno, limoneno), sesquiterpenos (trans-cariofileno) e compostos terpênicos (carvacrol, borneol, diidrocarveol, cineol). Os monoterpenos e sesquiterpenos são constituídos de carbono e hidrogênio (hidrocarbonetos) possuindo, respectivamente, 10 e 15 átomos de carbono na molécula. Os compostos terpênicos resultam ser moléculas constituídas de uma estrutura de terpeno e um grupamento funcional (ou

sesquiterpênica, se for o caso), ou seja, são hidrocarbonetos modificados pela inserção de um grupamento funcional na sua molécula. Este grupamento funcional pode dar origem a cetonas (carvona, turjona), aldeídos (citrinal, citronelal), ésteres (eugenil acetato, acetato bornílico), álcoois (borneol, linalol), fenóis (timol, carvacrol) e óxidos (cineol, óxido linalol) (LAVABRE, 1992; MATOS, 1994). Os terpenos e compostos terpênicos, bem como os sesquiterpenos e compostos sesquiterpênicos são facilmente encontrados nos óleos essenciais, pois são suficientemente voláteis para serem destilados com o vapor (MATOS et al., 1996).

A presença de carvacrol como componente majoritário do óleo essencial de *O. vulgare* confirma os resultados de outros estudos (BURT, 2004; NOSTRO et al., 2004; CHUN et al., 2005). Faz-se relevante citar a detecção de *p*-cimeno (12,85%-15,63%) e  $\gamma$ -terpineno (1,34%-1,76%), os quais são reconhecidos como precursores naturais de carvacrol.

Carvacrol tem recebido grande ênfase na pesquisa de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, de forma que a sua presença tem sido reconhecida como marcador de potencial antimicrobiano (FARIAS-ALVES et al., 2003). Este componente apresenta capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática microbiana causando uma considerável perda de ATP citoplasmático (LAMBERT et al., 2001). Este aumento de permeabilidade pode estar relacionado com sua capacidade de interagir com a membrana citoplasmática, onde pode se dissolver na bicamada lipídica alinhando-se entre as cadeias de ácidos graxos (ULTEE et al., 2000). Tal distorção da estrutura física poderia causar a expansão e desestabilização da membrana citoplasmática, aumentando sua fluidez e resultando no incremento de sua permeabilidade passiva (ULTEE et al., 2002). Acredita-se que a efetividade antimicrobiana de compostos fenólicos, como

carvacrol e timol, está intimamente relacionada à presença de um grupo hidroxil (OH) no anel fenólico, particularidade que lhes confere um alto poder reativo (DORMAN; DEANS, 2000).

Ainda, a análise do óleo essencial mostrou um perfil qualitativo de seus componentes similar aos achados de outros pesquisadores (PLAUSE et al., 2001; NAKATANI, 2003; NOVAK et al., 2003). De uma forma geral, as pesquisas com ênfase na identificação dos componentes do óleo essencial de *O. vulgare* mostram uma tendência de similaridade qualitativa entre seus resultados, de forma que as maiores diferenças são encontradas quando considerados os aspectos quantitativos de seus componentes (SIVROPOULOU et al., 1996; D'ANTUONO et al., 2000; BURT, 2004). Sabe-se, que a composição química de um óleo essencial pode sofrer interferência de diversos fatores como condições climáticas, geográficas, sazonais, período de coleta e técnica de destilação (MARINO et al., 2001; BAYDAR et al., 2004).

Uma particularidade encontrada na análise da composição do óleo essencial, consiste na ausência do composto fenólico timol, o qual tem sido citado por alguns pesquisadores (MARINO et al., 2001; TOMAINO et al., 2005) como um dos componentes majoritários do óleo essencial de *O. vulgare*. Timol tem sido reconhecido como um dos fitoconstituintes com mais destacável poder antimicrobiano (CHARAI et al., 1996; LAMBERT et al., 2001; FERRARA et al., 2003). Marino et al. (2001) em análise da composição do óleo essencial de *O. vulgare* observaram ausência de carvacrol, enquanto Sahin et al. (2003) detectaram a presença de tal composto em baixa concentração (0,6%).



## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de análise da efetividade do óleo essencial de *O. vulgare* na inibição do crescimento e sobrevivência de microrganismos de importância de alimentos, bem como nos ensaios de identificação de seus constituintes químicos pode-se inferir que:

- O óleo essencial de *O. vulgare* mostrou intenso poder de inibição do crescimento de todas as cepas de bactérias e de leveduras utilizadas como microrganismos testes, de modo que as cepas de leveduras apresentaram um comportamento de maior sensibilidade ao óleo essencial ensaiado.

- A técnica de microdiluição mostrou uma maior sensibilidade na detecção da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* quando comparada à técnica de difusão em meio sólido;

- Os valores de CIM determinados através da técnica de difusão em meio sólido apresentaram uma significativa capacidade de inibição da viabilidade das cepas ensaiadas, sendo detectado um efeito bacteriostático e fungicida após 24 horas de interação;

- O óleo essencial de *O. vulgare* mostrou uma considerável propriedade de inibição da flora autóctone de amostras de carne moída armazenadas sob refrigeração;

- O óleo essencial de *O. vulgare* manteve sua efetividade anti-bacteriana e anti-leveduriforme após ser submetido a diferentes tratamentos térmicos (60, 80, 100 e 120°C por 1 hora);

- A análise da composição do óleo essencial de *O. vulgare* mostrou a presença de monoterpenos (*o*-cimeno, *p*-cimeno,  $\alpha$ -pineno, mirceno,  $\gamma$ -terpineno,

canfeno, limoneno), sesquiterpenos (trans-cariofileno) e compostos terpênicos (carvacrol, borneol, diidrocarveol, cineol), destacando-se o alto percentual de carvacrol;

- A exposição do óleo essencial de *O. vulgare* submetidos aos diferentes tratamentos térmicos não apresentou interferência sobre sua constituição.

Os resultados observados neste estudo evidenciam a potencialidade do óleo essencial de *O. vulgare* como fonte de agentes antimicrobianos capazes de serem utilizados como compostos alternativos para o alcance da segurança microbiológica de alimentos. Ainda, a detecção de considerável propriedade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* vem de encontro aos anseios de parte dos consumidores e da própria legislação de alimentos, os quais requerem a produção de alimentos com baixos níveis de aditivos químicos. Por fim, estes resultados estimulam futuras pesquisas com vistas à aplicação de óleos essenciais no combate do crescimento e sobrevivência microbiana em todas as áreas que necessitam de ações efetivas de controle do crescimento de microrganismos.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-HAFEZ, S.I.I.; EL-SAID, A.H.M. Effect of garlic, onion and sodium benzoate on the mycoflora of pepper, cinnamon and rosemary in Egypt. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.39, n.1, p.67-77, 1997.

ADAN, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activity of *Origanum vulgare* Subs. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.5, p.1739-1745, 1998.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1995.

AKGUL, A.; KIVANÇ, M. Inhibitory effect of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v.6, n.3, p.263-268, 1988.

ALIGIANS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.9, p.4168-4170, 2001.

AL-JEDAH, J.H., ALI, M.Z, ROBINSON, R.K. The inhibitory action of spices against pathogens that might be capable of growth in a fish sauce (mehiawah) from the Middle East. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, n.1/2, p.129-133, 2000.

ANNUK, H.,; HIRMO, S.; TURI, E.; MIKELSAAR, M.; ARAK, E.; WADSTROM, T. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. **FEMS Microbiology Letters**, v.172, n.1, p.41-45, 1999.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Resolução RDC n° 12 de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial. Brasília. 10 de janeiro de 2001, p.45-52.

ARORA, D.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.12, n.3, p.257-262, 1999.

BANERJEE, M.; SARKAR, P.K. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic microorganisms from spices. **Food Microbiology**, v.21, n.3, p.335-342, 2004.

BASILICO, M.Z.; BASILICO, J.C. Inhibitory effects of some spices essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, n.4, p.238-241, 1999.

BAUER, A.W.M.M.; KIRBY, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.3, p. 493-496, 1966.

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**, v.15, n.3, p.169-172, 2004.

BEDIN, C.; GUTKOSKI, S.B.; WIEST, J.M. Atividade antimicrobiana das especiarias. **Higiene Alimentar**, v.13, n.65, p.26-29, 1999.

BELÉM, L. F. **Estudo epidemiológico da pitiríase versicolor no Estado da Paraíba e avaliação química e antifúngica de produtos naturais e sintéticos contra seu agente etiológico**. 167p. 2001. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.

BENEZET, A.; OSA, J.M.; PEDREGAL, E.; BOTAS, M.; OLMO, N.; PEREZ-FLORES, F. Microbiological quality of spices used in meat products. *Alimentaria*, v.349, n.1, p.65-71, 2003.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology**, v.37, n.2, p.263-268, 2004.

BILLING, J.; SHERMAN, P.W. Antimicrobial functions of spices: why some like it hot? **Quarterly Review of Biology**, v.1, n.73, p.3-49, 1998.

BOYLE, W. Spices and essential oils as preservatives. **American Perfume and Essential Oils Review**, v.66, n.1, p.25-28, 1955.

BRULL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, n.1-2, p.1-17, 1999.

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.

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, n.3, p.162-167, 2003.

CAMPO, J.; NGUYEN-THE, C.; SERGENT, M.; AMITO, M.J. Determination of most bioactive phenolic compounds from rosemary against *Listeria monocytogenes*: influence of concentration, pH and NaCl. **Journal of Food Science**, v.68, n.6, p.2066-2071, 2003.

CANILAC, N.; MOUREY, A. Antimicrobial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**, v.18, n.3, p.261-268, 2001.

CARSON C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Malaleuca artemifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.6, p.1914-1920, 2002.

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

CHUN, S.S.; VATTEM, A.V.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Procces Biochemistry**, v.40, n.2, p. 809-816, 2005.

CHARAI, M.; MOSADDAK, M.; FAID, M. Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majoram* L. and *O. compactum* Benth. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, n.3, p.657-664.

CONCON, J.M. **Food Toxicology**. Part B: contaminants and additives. New York: Marcel Dekker, 1980. 672p.

CORREA, B.; DILKIN, P.; ORSI, R.B. Mycoflora and aflatoxigenic species in derivatives of milled rice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, p.54-59, 2000.

COX, S.D. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Malaleuca artemifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Bacteriology**, v.88, n.1, p.170-175, 2000.

CUTTER, C.N. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* associated with beef. **Journal of Food Protection**, v.63, n.5, p.601-607, 2000.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v.22, n.1, p.39-44, 2003.

D'ANTUONO, L.F.; GALLETTI, G.C.; BOCHINI, P. Variability of essential oil content of *Origanum vulgare* L. populations from a north Mediterranean area (Liguria region, Northern Italy). **Annals of Botany**, v.86, n.3, p.471-478, 2000.

DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v.5, n.2, p.165-180, 1987.

DELLAQUIS, P.J.; MAZZA, G. Antimicrobial properties of isothiocyanate in food preservation. **Food Technology**, v.49, n.1, p.3-84, 1998.

DERMETZOS, C.; PERDETZOGLOU, D.K. Composition and antimicrobial studies of the essential oils of *Origanum calcaratum* Juss. and *O. scabrum* Boiss. et Heldr. From Greece. **Journal of Essential Oil Research**, v.13, n.6, p.460-462, 2001.

DEVLIEGHIERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Products**, v.14, n.4, p.273-285, 2004.

DÍAZ, T.M.L.; GONZÁLEZ, B.; MORENO, B.; OTERO, A. Effect of temperature water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium oslonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. **Food Microbiology**, v.19, n.1, p.1-7, 2002.

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.

DRUTZ, D.J. *In vitro* antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. **Review in Infectious Diseases**. v.9, n.2, p.392-397, 1987.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; GARCIA, V.L.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.2, p.305-311, 2005.

ELGAYYAR, M.; DRAUGHOM, F.A.; GOLDEN, D.A.; MOUNT, J.R. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, v.64, n.2, p.1019-1024, 2001.

ERNST, M.E.; KLEPSEK, E.J.; WOLFE, E.J.; PFALLER, M.A. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* spp. **Diagnostic in Microbial Infectious Diseases**, v.26, n.3-4, p.125-131, 1996.

ESPINEL INGROFF, A.; KERKERING, T.M.; GOLDSON, P.R.; SHADOMY, S. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.6, p.1089-1094, 1991.

ESPINELL INGROFF, A. et al. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.12, p.3128-3145, 1992.

FABIO, A.; CORONA, A.; FORTE, E.; QUALGLIO, P. Inhibitory activity of spices essential oils on psychrotrophic bacteria. **Microbiologica**, v.26, n.1, p.115-120, 2003.

FARIAS-ALVES, V.; SICCHIROL-LAVRADOS, M.A.; PEREIRA-DE-MARTINIS, E.C. Bacteriocins exposure and food ingredients influence on growth and virulence of *Listeria monocytogenes* in a model meat gravy system. **Journal of Food Safety**, v.23, n.3, p.201-217, 2003.

FERNADÉZ, J.E.; KRIVIRUCHOCO, D.D.; MITSCHLE, O.J. Estudio microbiológico de especiarías. **Revista Argentina de Microbiología**, v.16, n.1, p.11-16, 1984.

FEY, P.D.; SARANEK, T.J.; RUPP, M.E.; DUMME, E.F.; RIBOT, E.; IVEN, P.C. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. **New England Journal of Medicine**, v.342, n.6, p.1242-1249, 2000.

FIORENTINI, A.M.; ERNANI, S.S.; PORTO, A.C.S.; JACIARA, Z.M.; FRANCO, B.D.G.M. Influence of bacteriocins produced by *Lactococcus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.1, p.42-46, 2001.

I

FOREY, P.; LINDSAY, R. **Plantas medicinais**. Guia prático para identificar facilmente 150 plantas medicinais. Plátano Edições Técnicas: Lisboa, 1996.126p.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.424p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996.182p.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Food Microbiology**. New York: McGraw Hill, 1996. 182p.

FREIRE, F.C.O.; OFFORD, L. Bacterial and Yeasts counts in Brazilian commodities and spices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, n.2, p.145-148, 2003.

FROMTLING, R.A.; PUI-YU, H.; SHADOMY, S. *In vitro* inhibitory activities of 2 new orally absorbable imidazole, derivatives: BAYN 7133 and BAYI 913. **Sabouraudia**, v.21, n.4, p.179-184, 1983.

GAYOSO, C.W.; LIMA, E.O.; OLIVEIRA, V.T.; PEREIRA, F.O.; SOUZA, E.L.; LIMA, I.O.; NAVARRO, D.F. Efeito inibitório do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno sobre fungos isolados de onicomicoses. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.1, n.1-4, 25-29, 2004 .

GAYOSO, C.W.; LIMA, E.O.; OLIVEIRA, V.T.; PEREIRA, F.O.; SOUZA, E.L.; LIMA, I.O.; NAVARRO, D.F. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. **Fitoterapia**, 76, n.2, p.247-249, 2005.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Importância e riscos das especiarias. **Higiene Alimentar**, v.12, n.57, p.23-312, 1998.



GILL, A.O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R.A. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, n.1, p.83-89, 2002.

GOULD, G.W. **New methods of food preservation**. London: Chapman and Half. 1995. 455p.

GORDON, M.H.; KOURIMSKA, L. The effects of antioxidants on changes in oils during heating and deep frying. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.68, n.3, p.347-353, 1995.

GRAHAN, H.D. **The safety of foods**. Connecticut: AVI Publishing Company. 1982. 733p.

GROHS, B.M.; KUNZ, B. Use of spices for the stabilization of fresh portioned pork. **Food Control**, v.11, n.6, p.433-436, 2000.

GUNER, A.; OZHATAY, N.; EKIM, T.; BASER, K.H.C. **Flora of Turkey and the East Aegean Island**, vol. 11, Suplemento II. Edinburgh: Edinburgh University Press, 2000.

HAO, Y.Y.; BRACKET, R.E.; DOYLE, M.P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. **Journal of Food Protection**, v.61, n.3, p.307-312, 1998.

HARPAZ, S.; GLATMAN, L.; DRABKIN, V.; GELMAN, A. Effect of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bream fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.410-417, 2003.

HELANDER, L.M.; ALAKONI, H.L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDOHOLM, T.; POL, L.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.46, n.9, p.3590-3595, 1998.

HERNANDÉZ, T.; CANALES, M.; AVILA, J.G.; DURAN, A.; CABALLERO, A.; ROMO DE VIVAR, A.; LIRA, R. Ethnobotany and antibacterial activity of some medicinal plants used in traditional medicine of Zapolitán de las Salinas, Puebla (México). **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.2-3, p.181-188, 2003.

HOFFMAN, F.; GARCIA-CRUZ, C.H.; VINTURIM, T.M. Qualidade higiênico-sanitária de condimentos e especiarias produzidas por uma indústria da cidade de São José

do Rio Preto. **Boletim Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos**, v.12, n.1, p. 81-88, 1994.

HSIEH, P.C.; MAU, J.L.; HUANG, S.H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**, v.18, n.1, p.35-43, 2001.

HUGAS, M. Bacteriogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v.49, n.139-150, p.139-150, 1998.

HUSSAIN, M.S.; CHANDRASEKHARA, N. Influence of curcumin and capsaicin on cholesterol gallstone induction in hamsters and mice. **Nutrition Research**, v.13, n.4, p.349-357, 1993.

ISMAIEL, A.A.; PIERSON, M.D.; Effect of sodium nitrite and origanum oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. **Journal of Food Protection**, v.53, n.11, p.958-960, 1990.

ISMAN, B.M. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v.19, n.8, p.603-608, 2000.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI. Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. **Microbiology and Immunology**, v.45, n.4, p.201-208, 2001.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spices oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection**, v.65, n.4, p.638-687, 2002.

JULIANO, C.; MATTANA, J.; USAI, M. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herababona* Loisel growing in Sardinia. **Journal of Essential Oil Research**, v.12, n.4, p.516-522, 2000.

JUVEN, B.J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antimicrobial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, n.5, p.623-631, 1994.

KARATZAS, A.K.; BENNETT, M.H.J.; SMID, E.J.; KETS, E.P.W. Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Bacteriology**, v.89, n.2, p.296-301, 2000.

KARATZAS, A.K. KETS, E.P.W.; SMID, E.J.; BENNIK, M.H.J. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, n.5, p.463-469, 2001.

KIESSLING, C.R.; CUTTING, J.H.; LOFTIS, M. K.; KISSLING, V. W.; DATA, A.R.; SOFOS, J.N. Antimicrobial resistance of food retailled *Salmonella* isolates. **Journal of Food Protection**, v.65, n.4, p.603-608, 2002.

KIZIL, S.; SOGUT, T. Investigation of antibacterial effects of spices. **Crop Research**, v.3, n.1, p.86-90, 2003.

KONNING, G.H.; AGYARE, C.; ENNISON, B. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana. **Fitoterapia**, v.75, n.1, p.65-67, 2004.

LACAZ, C.S; PORTO, E.; MARTINS, J.E. **Micologia Médica**. 8ªed. São Paulo: Sarvier, 1991.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol, and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n.5, p.453-462, 2001.

LANCIOTTI, R.; GIANOTTI, A.; PATRIGNANI, N.; BELLETI, N.; GUERZONI, M.E.; GARDINI, F. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life of minimally processed fruits. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, n.3-4, p.201-208, 2004.

LAVABRE, M. **Aromaterapia**. A cura pelos óleos essenciais. Rio de Janeiro: Record, 1992.

LEMAY, W.J.; CHOQUETTE, J.; DELAQUIS, P.J.; GARIÉPY, C.; RODRIGUE, N.; SAUCIER, L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooled and acidified chicken meat model. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, n.3, p.217-226, 2002.

LEUSCHNER, R.G.K.; ZAMPARINI, J. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella enterica* serovar *enteridis* in broth model systems and mayonnaise. **Food Control**, v.13, n.6-7, p.399-404, 2002.

LIMA, E.O.; GOMPERTZ, O.F.; GIESBRECHT, A.M.; PAULO, M.Q. "In vitro" antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v.36, n.9-10, p.333-336, 1993.

LIMA, E.O. **Estudo das dermatofitoses em João Pessoa - Paraíba e da atividade antifúngica de plantas medicinais da região contra alguns dos agentes isolados**. 180p. 1996. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

LIMA, E.O. **Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica**. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Agros, 2002. p.482-501.

LOPÉZ-DÍAZ, T.M.; GONZALEZ, C.J.; MORENO, B.; OTERO, A. Effect of temperatura, water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium oslonii* isolated from the surface of Spanish fermented sausage. **Food Microbiology**, v.19, n.1, p.1-7, 2002.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil**. 2ª ed. São Paulo: Plantarum, 1991.

MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, n.5, p.538-544, 1998.

MARÍN, S.; VELLUTI, A.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Effect of essential oils on zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterilized maize grain. **Food Microbiology**, v.21, n.4, p.313-318, 2004.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, n.3, p.187-195, 2001.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas**. 2ª ed. Fortaleza: Ed. UFC, 1994.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.E. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, n.3, p.695-698, 1996.

MAZANTI, G.; BATTINELLI, L.; SALVATORE, G. Antimicrobial properties of the linalool-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var. *decumbens* (Lamiaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v.13, n.2, p.143-147, 1998.

McLAFFERTY, F. W.; STAUFFER, D. **The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data**. New York: John Wiley Sons, 1989.

MEJHOLM, O.; DALGAARD, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organisms *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, n.1, p.27-31, 2002.

McKEEGAN, K.S.; BORGES-WALMSLEY, I.; WALMSLEY, A. Microbial and viral drug resistance mechanisms. **Trends in Microbiology**, v.10, n.1, p.8-13, 2002.

MELO, E.A.; MANCINI FILHO, J.; GUERRA, N.B. Characterization of antioxidants compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum* L.). **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.38, n.1, p.15-19, 2005.

MENDOZA-YEPEZ, M.J.; SANCHEZ-HIDALGO, L.E.; MAERTENS, G.; MARIN-INIESTA, F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by plant essential oil (DMS) on Spanish soft cheese. **Journal of Food Safety**, v.17, n.1, p.47-55, 1997.

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.

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

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, v.13, n.4-5, p.289-292, 2002.

MOUSUYMI, B.; SARKAT, P.K. Microbiological quality of some retail spices in India. **Food Research International**, v.36, n.5, p.469-474, 2003.

NAIR, M.K.N.; VASUDEVAN, P.; VENKITANARAYANAN, K. Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.16, n.5, p.395-398, 2005.

NAKATANI, N. Biologically functional constituents of spices and herbs. **Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science**. v.56, n.6, p.389-395, 2003.

NEGI, P.S.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JAGAN RAO MOHAN, L.; SAKARIAH, K.K. Antibacterial activity of turmeric oil a byproduct from curcumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.10, p.4297-4300, 1999.

NGANE, A.N.; BIYITI, L.; BOUCHET, P.; NKENGFAK, A.; ZOLLO, P.H.A. Antifungal activity of *Pipper guineense* of Cameron. **Fitoterapia**, v.74. n,5, p.464-468, 2003.

NIELSEN, P.V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile compounds from spices and herbs, and possible application in active packaging with special emphasis on mustard essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, n.2-3, p. 219-229, 2000.

NOTERMANS, S.; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, A. Existing and emerging foodborne diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, n.3-4, p.197-205, 1992.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A.S; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v.230, n.2, p.191-195, 2004.

NOVAK, J.; CHRISTINA, B.; LANGBEHN, B.; PARK, F.; SKOULA, M.; GORSIOU, Y.; FRANZ, C.M. Ratios of cis- and trans- sabinene hydrate in *Origanum marjorana* L. and *Origanum midrophyllum* (Bentham). **Biochemical Systematics and Ecology**, n.28, v.7, p.697-704, 2000.

NOVAK, J.; ZAMBORI-NEMETH, E.; HORVATH, H.; SEREGELY, Z.; 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.

ODY, P. **O guia das plantas medicinais**. Livros e Livros: Lisboa, 2001. 350p.

ODOÑEZ, J.A. **Características gerais das carnes e componentes fundamentais**. In: ODOÑEZ, J.A.Tecnologia de alimentos. Alimentos de origem animal. Porto Alegre, Editora Artmed, 2005. p.129-141.

OLIVEIRA, L.A.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J.C.A.P. *Enterobacteriaceae* em especiarias utilizadas na elaboração de embutidos cárneos. **Higiene Alimentar**, v.6, n.22, p.27-33, 1992.

OUTTARA, B.; SIMARD, R .E.; HOLLEY, R.A.; PIETTE, G.J.P.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat

spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, n.2-3, p.155-162, 1997.

OZCAN, M.; ERKMEN, O. Antimicrobial activity of essential oils of Turkish plant spices. **European Food Research Technology**, v.212, n.6, p.658-660, 2001.

PANETTA, J.C. Alimentos e maior ambiente. As reações do consumidor. **Higiene Alimentar**, v.189, n.132, p.3-4, 2005.

PANDIT, V.A.; SHELEF, L.A. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Microbiology**, v.11, n.1, p.57-63, 1994.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: Editora UFG, 1993. 510p.

PEREIRA, M.S.; OLIVEIRA, L.A.T.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J.C.A.P. Contagem, isolamento e identificação de *Bacillus cereus* em condimentos preparados, utilizados em embutido cárneo (mortadela). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.6, n.3, p.137-140, 1999.

PERIAGO, P.M.; PALOP, A.; FERNANDEZ, P.S. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. **Food Science and Technology International**, v.7, n.6, 4187-492, 2001.

PINTORE, G.; USAI, M.; BRADESI, P.; JULIANO, C.; BOATTO, G.; TOMI, F.; CHESSA, M.; CERRI, R.; CASANOVA, J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavor and Fragrance Journal**, v.17, n.1, p.15-19, 2002.

PLATEL, K.; SRIVASAN, K. Lack of antidiabetic influence of cumin (*Cuminum cyminum*) seeds and bitter ground (*Momordica charantia*) juice in experimental rats. **Journal of Food Science and Technology**, v.41, n.1, p.91-94, 2004.

PLAUSE, E.A.; FLORES, G.S. ; ATAUCUSI, S.G. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano). **Revista de Medicina**, v.12, n.1, p.16-19, 2001.

POL, L.E.; SMID, E.J. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, n.3, p.166-170, 1999.

POL, L.E.; MASTWIJK, H.C.; SLUMP, R.A.; POPA, M.E.; SMID, E.J. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric fields treatment and carvacrol. **Journal of Food Protection**, v.64, n.7, p.1012-1018, 2001.

PONTES, Z.B.V.S. **Atividade antifúngica de produtos naturais e sintéticos sobre espécies de *Trichosporun behrend***. 2002. 178p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB.

PRASSAD, M.M.; SEENAYYA, G. Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt. **Food Research International**, v.33, n.9, p.793-798, 2000.

PROCTOR, M.E.; DAVIS, J.P. *Escherichia coli* 0157:H7 infection in Wisconsin, 1992-1999. **Wisconsin Medical Journal**, v.99, n.1, p.32-37, 2000.

QUILES, J.L.; RAMÍREZ-TORTOSA, M.C.; GÓMEZ, J.A.; HUERTAS, J.R.; MATAIX, J. Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. **Food Chemistry**, v.76, n.3, p.461-478, 2002.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. Boca Raton: CRC Press, 1996. 515p.

REDDY, A.C.P.; LOKESH, B.R. Studies on the anti-inflammatory activity of spice principles and dietary *n*-3 fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rat. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.38, n.4, p.349-358, 1994.

RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. Atheneu: Rio de Janeiro, 2005. 455p.

RISTORI, C.A.; PEREIRA, M.S. AND GELLI, D.S. O efeito da pimenta do reino moída frente a contaminação *in vitro* com *Salmonella rubislaw*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n.3, p. 131-133, 2002.

ROLLER, S.; COVILL, N. The fungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, n.1-2, p.67-77, 1999.



ROLLER, S.; SEEDHAR, P. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4°C and 8°C. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, n.5, p.390-394, 2002.

ROOSTITA, R., FLEET, G.H. The occurrence, and yeast growth in Camembert and blue-vinned cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, n.3, p.393-404, 1996.

ROWAN, N.J. Evidence that inimical food-preservation barriers alter microbial resistance, cell morphology and virulence. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, n.5, p.251-270, 1999.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model system. **Food Chemistry**, v.69, n.2, p.167-174, 2000.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T.; DEANS, S.G.; DORMAN, H.J.D. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. **Planta Medica**, v.66, n.4, p.687-693, 2000.

SAGDIÇ, O.; KUSÇU, A.; OZCAN, M.; OZÇELİK, S. Effects of Turkish spices extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v.19, n.5, p.473-480, 2002.

SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogens pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrossols. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.36, n.5, p.467-473, 2003.

SAGDIÇ, O.; KUSÇU, A.; OZCAN, M.; OZÇELİK, S. Effect of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *E. coli* O157:H7. **Food Protection**, v.19, n.3, p.473-480, 2003.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v.15, n.7, p.549-557, 2004.

SAKAGAMI, Y.; KAJOH, S.; KAJIMURA, K.; YOKOYAMMA, H. Inhibitory effect of clove extract on vero-toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Biocontrol Science**, v.5, n.1, p.47-49, 2000.

SALIMATH, B.P.; SUNDERESH, C.S.; SRINIVAS, L. Dietary components inhibit lipid peroxidation in erythrocyte membrane. **Nutrition Research**, v.6, n.12, p.1171-1178, 1986.

SALGUEIRO, L.R.; CAVALEIRO, C.; PINTO, E.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species. **Planta Medica**, v.69, n.9, p.871-874, 2003.

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E.Y.; GODOY, H.M. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, n.3, p.293-297, 2001.

SCHWAB, A.H.; HARPESTAD, A.D.; SWARTZENTRUBER, A.; LAINER, J.M.; WENTZ, B.A.; DURAN, A.P.; BARNAD, A.J.; READ JR., R.B. Microbiological quality of some spices and herbs in retail markets. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n.5, p.627-630, 1982.

SELLAR, W. **Óleos que curam**. O poder da aromaterapia. Rio de Janeiro: Nova Era, 2002. 230p.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Review**, v.59, n.2, p.201-222, 1995.

SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAU, E.; NICOLAU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and citotoxic activities of *Origanum vulgare* essential oil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.44, n.11, p.1202-1205, 1996.

SKANDAMIS, P.N.; NYCHAS, G.J.E. Development and evaluation of a model predicting the survival of *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.4, p.1646-1653, 2000.

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

SKANDAMIS, P.; TSIGARIDA, E.; NICHAS, G.J.E. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. **Food Microbiology**, v.19, n.1, p.97-108, 2002.

SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M. Natural antimicrobials for food preservation. In: RAHMAN, M.S. **Handbook of food preservation**. New York: Marcel Decker. 1999. p.285-308.

SMITH-PALMENR, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Food Microbiology**, v.26, n.1, p.118-122, 1998.

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.

SOUSA, C.P. Pathogenicity mechanisms of prokaryotic cells: an evolutionary view. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.7, n.1, p.26-31, 2003.

SOUZA, E.L.; LIMA, E.O.; FREIRE, K.R.L.; SOUSA, C.P. Inhibition action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v.2, n.2, p.245-250, 2005.

SRINIVASAN, K.; SAMBAIAH, K.; CHANDRASEKHARA, N. Spices as beneficial hypo-cholesterolemic food adjuncts: a review. **Food Review International**, v.20, n.2, p.187-220, 2004.

SRINIVASAN, K. Spices influence of body metabolism: an overview of three decades of research. **Food Research International**, v.38, n.1, p.77-86, 2005.

STECHINI; M.L.; SARAIS, L.; GIAVEDONI, P. Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophilla* in a culture media and in cooked pork. **Journal of Food Protection**, v.56, n.5, p.406-409, 1993.

SUBRAMONYAN, A.; SATAYANARAYANA, M.N. Influence of certain dietary plant constituents on platelet aggregation. **Journal of Food Safety**, v.9, n.2, p.201-210, 1989.

TAKIKAWA, A.; ABE, K.; MAKIKO, Y. ISHIMARU, S.; YASUI, M.; OKUBO, Y.; YOKOIGAWA, K. Antimicrobial activity of nutmeg against *Escherichia coli* O157. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.94, n.4, p.315-320, 2002.

TASSOU, C.; DORINOS, E.H.; NYCHAS, G.J.E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteridis* and *Listeria monocytogenes* in model food system at 4°C and 10°C. **Journal of Applied Microbiology**, v.78, n.6, p.593-600, 1995.

TASSOU, C.C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G.J.E. Inhibition of *Salmonella enteridis* and *Staphylococcus aureus* on nutrient both by mint essential oil. **Food Research International**, v.33, n.1-4, p. 273-280, 2000.

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. **Cellular and Molecular Life Science**, v.56, n.4, p.755-763, 1999.

THEREFALL, E.J. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104-a truly international multiresistant clone. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.46, n.1, p.7-10, 2000.

THYAGARAJA, N.; HOSONO, A. Effect of spice extract on fungal inhibition. **Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie**, v.29, n.3, p.286-288, 1996.

TOMAINO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTTI, V.; SULFARO, V.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v.89, n.4, p.549-554, 2005.

TORO SANTA MARIA, M.A.; DÍAZ, S.R.; PIAZZE, M.P.F. Microhongos filamentosos y levaduriformes asociados a pimienta negra (*Pipiper nigrum*). **Boletín de Micología**, v.8, n.1-2, p.77-83, 1993.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002.

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NICHES, G.J.E. Behavior of *Listeria monocytogenes* and *authothonous flora* on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of essential oil at 5°C. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, n.8, p.901-909, 2000.

ULTEE, A.; SLUMP, R.A.; STEGING, G.; SMID, E.J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of Food Protection**, v.63, n.5, p.620-624, 2000.

ULTEE, A.; SMID, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Microbiology**, v.64, n.3, p.373-378, 2001.

UTAMA, J.M.S.; WILLS, R.B.H.; BEN-YEHOSHUA, S.; KUESK, C. *In vitro* efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetal decay microorganisms. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n.16, p.6371-6377, 2001.

VALERO, M.; SALMERÓN, M.C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, n.1-2, p.73-81, 2003.

VAN DE DOOL, H.; KRATZ, D.J.A. A generalization of the retention index system including line temperature programmed gas liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, n.2, p.463-467, 1963.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1992. 1219p.

VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; EGIDO, J.; Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v.89, n.2-3, p.145-154, 2003.

VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S.; ERNST, E.; KLEPSE, M.; DEMIRCI, B.; BASER, H.; VAN WYK, B.E. *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae) - the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.2-3, p.137-143, 2003.

WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M.J.; The effect of essential oil of basil on the growth of *Aeromonas hydrophilla* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, vol.84, n.2, p.152-158, 1998.

WEBB, M.; CRAZE, R. **O guia das plantas & especiarias**. Livros e Livros: Lisboa, 2001.

WELTHAGEN, J.J.; VILJOEN, B.C. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. **Food Microbiology**, v.16, n.1, p.63-73, 1999.

WENDA KOON, C.N.; SAKAGUCHI, M. Combined effect of sodium chloride and clove on the growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. **Journal of Food Protection**, v.65, n.5, p.410-413, 1993.

WENDA KOON, C.N.; SAKAGUCHI, M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, v.58, n.3, p.280-283, 1995.

WHITE, D.G.; ZHAO, S.; SIMJEE, S, WAGENR, D.D.; McDERMOTT. P.F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infections**, v.4, n.4, p.405-412, 2002.

WILKINSON, J.M.; HIPWELL, M.; RYAN, T.; CAVANAGH, H.M.A. Bioactivity of *Bachousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, n.1, p. 76-81, 2003.

WILLATGAMUWA, S.A.; PLATEL, K.; SARAXWATHI, G.; SRINIVASAN, K. Antidiabetic influence of dietary cumin seeds in streptozotocin induced diabetic rats. **Nutrition Research**, v.18, n.1, p.131-142, 1998.

WINOKUR, P.L.; BRUGGEMAN, A.; DE SALVO, D.L.; HOFFMAN, M.D.; UHLENHOOP, E.K. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant salmonella isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.11, p.2777-2783, 2000.

WOOLHOUSE, M.E.J. Population biology of emerging and re-emerging pathogens. **Trends in Microbiology**, v.10, n.1, p.3-7, 2002.

XAVIER, L.S. **Identificação de leveduras em queijos de coalho comercializados na cidade de João Pessoa-PB**. 68p. 2003. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.

ZAMBONI, C.D.; ALVES, H.I.; RODRIGUES, R.M.M.S.; SPITERI, N.; ATUI, M.C.; SANTOS, M.C. Fraudes e Sujidades em condimentos comercializados na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.51, n.1-2, p.19-22, 1991.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)