



ALLINE APARECIDA SOUZA

**ANÁLISE QUÍMICA E POTENCIAL
ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS
ESSENCIAIS SOBRE *Escherichia coli*
ENTEROTOXIGÊNICA NA
CONSERVAÇÃO DE CARNE MOÍDA**

LAVRAS – MG

2015

ALLINE APARECIDA SOUZA

**ANÁLISE QUÍMICA E POTENCIAL
ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE
Escherichia coli ENTEROTOXIGÊNICA NA
CONSERVAÇÃO DE CARNE MOÍDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares do Departamento de Agricultura, área de concentração Bioatividade de Plantas Medicinais, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Prof. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Coorientadora

Prof. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS – MG
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados
pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Souza, Alline Aparecida.

Análise química e potencial antimicrobiano de óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica na conservação de carne moída / Alline Aparecida Souza. – Lavras : UFLA, 2015.

95 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Bibliografia.

1. *Escherichia coli*. 2. Doenças transmitidas por alimentos. 3. Patógeno alimentar. 4. Atividade bactericida. 5. Antimicrobianos naturais. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ALLINE APARECIDA SOUZA

**ANÁLISE QUÍMICA E POTENCIAL
ANTIMICROBIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE
Escherichia coli ENTEROTOXIGÊNICA NA
CONSERVAÇÃO DE CARNE MOÍDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares do Departamento de Agricultura, área de concentração Bioatividade de Plantas Medicinais, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2015.

Dra. Elisângela Elena Nunes de Carvalho UFLA

Dra. Máira Maciel Mattos de Oliveira IFES

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli UFLA

Prof. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

**LAVRAS – MG
2015**

A Aderson de Souza, meu pai;

a Nilvane Aparecida de Andrade Souza, minha mãe;

a Stefânia Priscilla de Souza, minha irmã e amiga.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pela possibilidade de mais uma existência, com saúde e boas oportunidades.

Aos meus pais Nilvane e Aderson, que sempre me deram total e irrestrito apoio, nos momentos felizes e principalmente nos momentos tristes e difíceis desta caminhada. Este trabalho só pôde ser realizado graças aos dois. Por todo amor, carinho e, acima de tudo, pelo incentivo e confiança que sempre me dedicaram, deixo aqui meus eternos agradecimentos.

À minha irmã Stefânia pela grande amizade, amor, apoio, incentivo e auxílio em vários momentos do trabalho.

À Pretinha e Niki, embora não saibam ler e não entendam, por estarem sempre ao meu lado acompanhando meus estudos e me alegrando todos os dias.

Às minhas orientadoras Suzan Kelly Vilela Bertolucci e Roberta Hilsdorf Piccoli pela orientação, confiança depositada, paciência, amizade e por terem possibilitado a realização deste trabalho.

À amiga Nayane pelo grande apoio, amizade e ensinamentos.

Às maravilhosas amigas que conquistei neste mestrado, Giselly, Nelma, Livia e Lucinda, pelo companheirismo, amizade sincera, apoio em todas as horas e por terem dividido comigo as aflições e satisfações de desenvolver cada etapa da pesquisa.

Às minhas amigas de longa data, Gabriela, Vanessa, Lais Ramos e Ana Paula, que vivem em meu coração e mesmo distantes fazem parte de cada conquista de minha vida.

À Naomi pela ajuda na extração dos óleos essenciais.

Aos amigos Diogo e Nayane pela ajuda estatística.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica do DAG, Annete, Juliana, Nelma, Diogo, Vauvenargues, Luizinho, Vanderleia, Aurislaine, Paulinho e Dico.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do DCA, Nayane, Pollyana, Silas, Heloísa, João Paulo, Victor, Tenille, Aline, Letícia e Eliane.

À todos os amigos do programa de pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e compreensão pelos momentos ausentes.

À Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares e aos professores pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz pela concessão da cepa bacteriana utilizada na pesquisa.

Enfim, a todos, mesmo àqueles que não tenham sido citados, mas que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Escherichia coli é considerada a principal bactéria representante da família *Enterobacteriaceae*, pertencendo ao grupo dos coliformes termotolerantes. Sua presença em alimentos indica contaminação direta ou indireta de origem fecal. *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), cepa patogênica da espécie *E. coli*, é importante causadora de episódios diarreicos, sendo o principal agente etiológico da doença denominada diarreia-dos-viajantes, frequentemente encontrada em alimentos obtidos em condições higiênico-sanitárias precárias. Dentre os vários alimentos associados a surtos de toxinfecções alimentares, destaca-se a carne moída, por ser comercializada *in natura* e muito manipulada. Por ser produto de origem animal, há elevada taxa de contaminação por *E. coli*, podendo conter ETEC. Assim, alternativas para a comercialização desse produto com garantia de segurança ao consumidor devem ser propostas. Neste contexto, destaca-se o uso dos óleos essenciais, que são compostos naturais de origem vegetal, apresentam composição química complexa que os torna capazes de desempenhar diversas atividades farmacológicas, como a ação antisséptica, que vem sendo explorada tanto na área medicinal e farmacológica como na área alimentícia, como conservantes de alimentos. Perante o exposto, objetivou-se analisar *in vitro* a atividade antimicrobiana de dezesseis óleos essenciais sobre ETEC, selecionando os mais eficazes para o estudo sinérgico de suas combinações *in vitro* e em carne moída. As concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais e de suas combinações foram determinadas empregando-se o método de microdiluição em caldo, utilizando-se caldo triptona de soja e microplacas de poliestireno de 96 poços, com posterior plaqueamento das culturas em ágar triptona de soja. As análises químicas dos óleos puros e de suas combinações foram feitas em CG-EM e CG-DIC. Para os ensaios *in situ*, foram selecionadas as combinações de menores proporções dos óleos de orégano, canela e tomilho e de orégano, cravo-da-índia e tomilho. Os dois tratamentos foram aplicados a porções de carne moída inoculadas com ETEC, que foi armazenada por cinco dias, a 7 °C. Nas análises por CG-EM dos tratamentos, observou-se, em ambos, a presença majoritária do composto carvacrol e de outros monoterpenos, como timol, *p*-cimeno e γ -terpineno. As análises colorimétricas indicaram variação significativa nos valores de média de L*, a*, b*, C* e h* da cor da carne tratada com as combinações de óleos essenciais. Isso indica que a adição dos tratamentos em carne moída permitiu que ela mantivesse boa aparência durante os cinco dias de estocagem. As combinações de óleos essenciais apresentaram efeitos sinérgicos suficientes para inibir ETEC em estudo *in vitro* e este resultado se repetiu, embora de forma reduzida, quando estas combinações foram adicionadas em carne moída.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Doenças transmitidas por alimentos, patógeno alimentar. Atividade bactericida. Antimicrobianos naturais.

ABSTRACT

Escherichia coli is considered the main representative bacteria of the family Enterobacteriaceae, belonging to the group of the thermotolerant coliform. Your presence in food shows directly and indirectly contamination of fecal origin. *E.coli* enterotoxigenic (ETEC), pathogenic strain of the species *E.coli*, is an important cause diarrhea episode, being the main etiological agent of the disease called traveler's diarrhea (TD), often found in food, obtained in poor sanitary conditions. Among the various foods associated to intoxications outbreaks, stands out the ground beef, to be commercialized in natura and very manipulated. Being an animal product, there is a high contamination rate by *E.coli*, and may contain ETEC. Therefore, safe alternatives to commercialize this product shall be proposed. In this context, is highlight the use of essential oils, which are natural compounds of plant origin, show complex chemical composition which makes them capable of performing various pharmacological activities, as the antiseptic action, that has been explored in both medical and pharmacology area as in the food industry, as food preservatives. In view of this, aimed to analyze in vitro the antimicrobial activity of sixteen essential oils over ETEC, selecting the most effective for the synergistic study of your combinations in vitro and in ground beef. The minimum bactericidal concentrations in the essential oils and their combinations was determined by the microdilution method using tryptone soy broth, and 96-well polystyrene microplates with subsequent plating of the cultures in tryptone soy agar. The chemical analyzes of pure oils and their combination were done on GC-MS and GC-FID. For tests in situ, were selected the combinations with the smaller proportions of oregano oil, cinnamon and thyme and oregano, clove and thyme. Both treatments were applied in ground beef portion inoculated with ETEC, which was stored for five days at 7°C. In the analyzes by CG-EM of the treatments, was observed, in both, the majority presence of the compound carvacrol and others as monoterpenes: thymol, p-cymene and γ -terpinene. The colorimetric analysis indicated significant variation in mean values of L *, a *, b *, C * h * in the color of the meat treated with the combination of essential oils. This indicates that the addition of the treatments in ground beef allowed keep the meat looking good during the five days of storage. The essential oils combination showed synergistic effects sufficient to inhibit ETEC in vitro study and this result was repeated, although in reduced form, when these combinations were added to ground beef.

Keywords: *Escherichia col.* Foodborne disease. Food pathogen. Bactericidal activity. Natural antimicrobials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	PRIMEIRA PARTE	
Figura 1	Estrutura química dos constituintes majoritários dos óleos essenciais.....	19
Figura 2	Mecanismos de ação e sítios alvos dos óleos essenciais em células microbianas.....	29
Figura 3	Esquema do ciclo de transmissão da bactéria <i>Escherichia coli</i>	32
	ARTIGO 2	
Figura 1	Variação da cor objetiva das porções de carne moída contendo combinações de óleos essenciais durante cinco dias de estocagem a 7°C.....	86
Gráfico 1	Efeito das combinações de óleos essenciais sobre <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica em carne moída bovina durante armazenamento à temperatura de 7°C por cinco dias.....	82

LISTA DE TABELAS

	ARTIGO 1	
Tabela 1	Óleos essenciais comerciais utilizados no estudo.....	54
Tabela 2	Concentração mínima bactericida (CMB) de óleos essenciais sobre a bactéria <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica <i>in vitro</i>	58
Tabela 3	Composição química majoritária dos óleos essenciais avaliados nos ensaios de efeito bactericida <i>in vitro</i> contra ETEC.....	59
	ARTIGO 2	
Tabela 1	Proporções utilizadas para o preparo das combinações dos óleos essenciais para avaliação da atividade bactericida <i>in vitro</i> sobre <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica.....	75
Tabela 2	Concentrações dos óleos essenciais utilizados na elaboração de dois conservantes para controle de ETEC em carne moída bovina.....	76
Tabela 3	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> das combinações dos óleos essenciais em diferentes proporções sobre <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica.....	81
Tabela 4	Constituintes químicos majoritários das combinações de óleos essenciais utilizadas nos ensaios de inibição do crescimento de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica <i>in situ</i>	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ANUALPEC	Anuário da Pecuária Brasileira
CG-DIC	Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DAG	Departamento de Agricultura
DCA	Departamento de Ciência dos Alimentos
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FDA	Food and Drug Administration
GMP	Golpes por minuto
GRAS	Generally Recognized as Safe
LABENT	Laboratório de Enterobactérias
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NIST	National Institute of Standards and Technology
OMS	Organização Mundial da Saúde
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Óleos essenciais de plantas medicinais e condimentares ...	16
2.1.1	Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	18
2.1.2	Anis estrelado (<i>Illicium verum</i> Hook.)	20
2.1.3	Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume)	20
2.1.4	Capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.)	21
2.1.5	Cravo da Índia (<i>Syzygium aromaticum</i> Thumb.)	21
2.1.6	Funcho doce (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.)	22
2.1.7	Limão Tahiti (<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle)	22
2.1.8	Mandarina (<i>Citrus nobilis</i> Lour.)	23
2.1.9	Manjerição (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	23
2.1.10	Menta (<i>Mentha piperita</i> L.)	24
2.1.11	Noz moscada (<i>Myristica fragans</i> Houtt.)	24
2.1.12	Orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	24
2.1.13	Pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L.)	25
2.1.14	Tomilho branco (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	25
2.2	Atividade antibacteriana de óleos essenciais	26
2.3	Bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos	30
2.3.1	<i>Escherichia coli</i>	30
2.3.1.1	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica	32
2.4	Carne moída	33
	REFERÊNCIAS	36
	SEGUNDA PARTE-ARTIGOS	
	ARTIGO 1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA DE DEZESSEIS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE <i>Escherichia coli</i> ENTEROTOXIGÊNICA	
1	INTRODUÇÃO	51
2	MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1	Obtenção dos óleos essenciais	53
2.2	Análise química dos óleos	54
2.3	Microrganismo, manutenção, padronização e obtenção do inóculo	56
2.4	Determinação da Concentração Mínima Bactericida	56
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4	CONCLUSÃO	65
5	AGRADECIMENTOS	65

	REFERÊNCIAS.....	66
	ARTIGO 2 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE	
	COMBINAÇÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE	
	<i>Escherichia coli</i> ENTEROTOXIGÊNICA NA	
	CONSERVAÇÃO DE CARNE MOÍDA	
1	INTRODUÇÃO.....	71
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1	Obtenção dos óleos essenciais.....	73
2.2	Microrganismo, manutenção, padronização e obtenção	
	do inóculo.....	73
2.3	Ação bactericida in vitro das combinações de óleos	
	essenciais sobre <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica.....	74
2.4	Ação bactericida das combinações de óleos essenciais	
	sobre <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica inoculada em	
	carne moída.....	76
2.5	Quantificação de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica em	
	carne moída.....	77
2.6	Análise química das combinações de óleos essenciais.....	78
2.7	Análises físico-químicas da carne moída.....	79
2.7.1	Ph.....	79
2.7.2	Cor.....	79
2.8	Análises estatísticas.....	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4	CONCLUSÃO.....	89
5	AGRADECIMENTOS.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são comumente utilizadas, por seus efeitos terapêuticos, sob a forma de chás, que é o modo mais usual de consumo pela população. A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para a sua atenção primária, tendo em vista que 80% das pessoas utilizam práticas tradicionais (como remédios caseiros e comunitários) nos seus cuidados básicos de saúde e 85% delas utilizam plantas ou preparações com essas plantas (BRASIL, 2006).

Dentre os principais usos das plantas medicinais, pode-se destacar o que visa à ação antimicrobiana. As bactérias são seres unicelulares que estão presentes em todos os ambientes. Podem ser de caráter patogênico ou não à saúde humana, dependendo do tipo, da sua dose infectante e de estarem em contato com o ambiente ideal para seu desenvolvimento e crescimento (SILVA et al., 2014). Uma importante atividade biológica apresentada por diversas substâncias produzidas no metabolismo secundário de espécies medicinais é a atividade antimicrobiana. Embora as indústrias farmacêuticas tenham produzido expressivo número de novos antibióticos nas últimas cinco décadas, a resistência microbiana a essas substâncias também aumentou, visto que as bactérias adquirem e transferem genes de resistência a antibióticos, bem como a defensivos agrícolas (SILVA, 2010).

Juntamente com este fato, o crescente interesse dos consumidores por alimentos naturais obriga a indústria a pesquisar novas alternativas de conservação de alimentos, no intuito de prevenir a ocorrência de toxinfecções alimentares, ocasionadas pela presença de microrganismos. Dentre os compostos vegetais que vêm sendo largamente estudados, os extratos e os óleos essenciais têm demonstrado possuir propriedades antioxidantes, antimicrobianas e

antiparasitárias (FERREIRA et al., 2006; OKPEKON et al., 2004; SACCHETTI et al., 2005; SOKMEN et al., 2004), propriedades estas que indicam uma alternativa na conservação de alimentos. De acordo com Persico et al. (2009), extratos naturais, como óleos essenciais ou seus componentes principais, que são classificados como *generally recognized as safe*, ou GRAS, pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA, podem ser considerados potenciais alternativas ao uso de aditivos sintéticos em alimentos.

Escherichia coli é a principal bactéria representante do grupo das enterobactérias. É uma bactéria gram-negativa que faz parte dos coliformes termotolerantes (resistem a elevadas temperaturas) e ocorre em fezes de animais de sangue quente, como, por exemplo, o homem. Quando encontrada em alimentos, indica provável contaminação por fezes, esgoto (CEBALLOS; KONIG, 1997; SILVA et al., 2014) ou por manipuladores de alimentos infectados. *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) causa a gastroenterite conhecida como diarreia-dos-viajantes e tem como quadro clínico diarreia líquida, dor abdominal, febre baixa, náusea e mal-estar. ETEC, normalmente não é responsável por toxinfecções alimentares em países com bom padrão sanitário e boas práticas de preparação dos alimentos. Porém, em países com precárias condições higiênico-sanitárias, a contaminação da água com esgoto pode levar à contaminação dos alimentos (SÃO PAULO, 2002).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de analisar a atividade antimicrobiana de dezesseis óleos essenciais frente à ETEC *in vitro* e, a partir dos resultados, selecionar os óleos mais eficazes para avaliar a atividade de combinações deles na conservação de carne moída.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Óleos essenciais de plantas medicinais e condimentares

Os óleos essenciais são compostos naturais caracterizados por odor forte e composição química complexa. São formados por diversas espécies vegetais oriundas do metabolismo secundário (BAKKALI et al., 2008). De modo geral, são misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. A designação de óleos essenciais é devido ao aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis (DE LA ROSA; ALVAREZ-PARRILLA; GONZALEZ-AGUILAR, 2010). Por algumas de suas características físico-químicas, podem receber outras denominações, como óleos voláteis (sua principal característica é a volatilidade, diferindo-os dos óleos fixos), óleos etéreos (por serem solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter) ou, ainda, essências (pelo aroma agradável e intenso da maioria desses óleos) (MATTOS et al., 2007; SIMÕES; SPITZER, 2007).

Estes compostos são produzidos por diversas estruturas especializadas nas plantas, tais como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, glândulas, canais oleíferos ou bolsas lisígenas ou esquizolisígenas, dependendo da família a que pertence a espécie em questão (MATTOS et al., 2007; OLIVEIRA; AKISSUE, 2009; OLIVEIRA; AKISSUE; AKISSUE, 2005). Os óleos essenciais podem estar presentes em diferentes órgãos da planta, como nas folhas, flores, frutos, cascas dos caules, brotos, rizomas ou, ainda, nas sementes. Porém, segundo Simões e Spitzer (2007), os óleos essenciais obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, características físico-químicas e odores bem distintos.

Os constituintes químicos dos óleos essenciais podem ser agrupados em duas grandes classes: (1) derivados de terpenoides, formados por meio da rota

do acetato-ácido mevalônico ou da via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) e (2) compostos aromáticos, formados por meio da rota do ácido chiquímico, os fenilpropanoides (DESCHAMPS et al., 2003; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). Estes compostos ocorrem em diferentes concentrações em um dado óleo essencial e, geralmente, um deles é o composto majoritário, chegando a representar 80% ou mais da composição do óleo essencial, existindo outros em menores teores e alguns aparecendo como constituintes traço (SIMÕES; SPITZER, 2007).

O grande desafio na química dos óleos essenciais é elucidar as estruturas dos constituintes do óleo essencial de interesse (CSEKE et al., 2006). Vários métodos podem ser utilizados para realizar a avaliação da qualidade dos óleos essenciais, sendo estes classificados em organolépticos, físicos, químicos ou físico-químicos. A escolha do método a ser utilizado depende do tipo e da quantidade da amostra, do rigor analítico requerido e da infraestrutura laboratorial disponível (SIMÕES; SPITZER, 2007). De acordo com Cseke et al. (2006), a ferramenta mais importante para a elucidação de estruturas dos componentes dos óleos essenciais é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

Os constituintes presentes nos óleos essenciais desempenham importantes funções ecológicas para a planta que as secreta, como proteção contra predadores, atração de polinizadores, inibição da germinação de outras plantas (alelopatia) e proteção contra a perda de água (SILVEIRA, 2012). Os óleos essenciais têm amplo potencial de aplicação, em áreas como a medicina, a farmacologia, a cosmética, a culinária e a agricultura (MATTOS et al., 2007).

Dentre as propriedades farmacológicas dos óleos essenciais, algumas já estão bem estabelecidas, como, por exemplo, ação carminativa (funcho, erva-doce, coentro, menta), antiespasmódica (camomila, macela), estimulante de secreções do sistema digestório (gingibre), estimulante (óleos essenciais

contendo cânfora) ou depressora do sistema nervoso central (melissa, capim-limão), secretolítica sobre o aparelho respiratório (eucalipto, anis-estrelado), anestésica local (cravo-da-índia), anti-inflamatória (camomila, salsão) e antisséptica, entre outras (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Para as análises da atividade antibacteriana foram utilizados, neste trabalho, os óleos essenciais das espécies vegetais citadas a seguir.

2.1.1 Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

O alecrim é uma planta que pertence à família *Lamiaceae*. É um subarbusto muito ramificado, sempre verde, com hastes lenhosas, folhas pequenas, sésseis, finas, opostas e lanceoladas, de sabor picante. A parte inferior das folhas é de cor verde-acinzentada, enquanto a superior é quase prateada. A planta exala aroma forte e agradável (MAY et al., 2010). É utilizado, mundialmente, como condimento de inúmeros alimentos e seu uso medicinal envolve casos de má digestão, gases no aparelho digestivo, dor de cabeça, hipertensão, problemas digestivos, perda de apetite, fraqueza e reumatismo, apresentando, ainda, ação cicatrizante, anti-inflamatória, antioxidante e antilipoperoxidante (LORENZI; MATOS, 2008; MAGALHÃES; CAMARGO; HIGUCHI, 2013).

Em estudos da composição química do óleo essencial de folhas da espécie, diversos autores identificaram como constituintes majoritários 1,8-cineol (**1**), cânfora (**2**), mirceno (**3**), α -pineno (**4**) e cariofileno (**5**), listados na Figura 1 (ANGIONI et al., 2004; BLANCO, 2001; CELIKTAS et al., 2007; GACHKAR et al., 2007; MAY et al., 2010; PORTE, 2000).

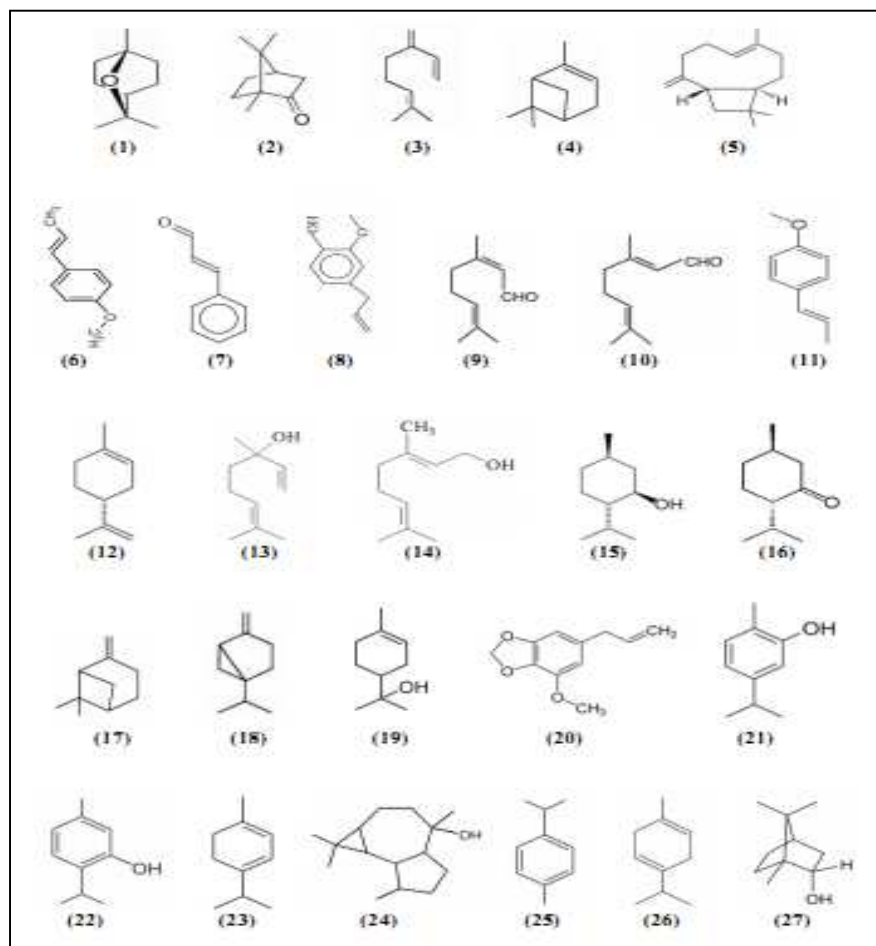


Figura 1. Estrutura química dos constituintes majoritários dos óleos essenciais. (1) 1,8-cineol; (2) cânfora; (3) mirceno; (4) α -pineno; (5) cariofileno; (6) (*E*)-anetol; (7) aldeído cinâmico; (8) eugenol; (9) neral; (10) geranial; (11) anetol; (12) limoneno; (13) linalol; (14) geraniol; (15) mentol; (16) mentona; (17) β -pineno; (18) sabineno; (19) terpineol; (20) miristicina; (21) carvacrol; (22) timol; (23) α -terpineno; (24) globulol; (25) *p*-cimeno; (26) γ -terpineno; (27) borneol.

2.1.2 Anis estrelado (*Illicium verum* Hook.)

O anis-estrelado é uma planta arbórea ou arbustiva, de ciclo perene, que pode atingir de 2,5 a 4 m de altura. O tronco é ereto, homogêneo, com casca lisa e madeira branca. As folhas são inteiras, lanceoladas e verdes; as flores são brancas a levemente cremes, agrupadas em inflorescência do tipo umbela; o fruto é marrom, deiscente, pedunculado e tem oito carpelos em formato de barco que, juntos, formam uma estrela; as sementes são ovais e marrom-amareladas (NEGRAES, 2003).

O óleo essencial do fruto de anis-estrelado apresenta o (*E*)-anetol (**6**) como constituinte majoritário, com cerca de 90% (LIMA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2003).

2.1.3 Canela (*Cinnamomum cassia* Nees ex Blume)

A canela é uma planta aromática e medicinal, pertencente à família *Lauraceae*, originária de algumas regiões da Índia e do Ceilão. É uma árvore perene, alcançando alturas de 6 a 12 m, com folhas perfumadas de cor verde-escura, sendo a parte inferior mais clara. Apresenta folhas opostas, ovadas ou ovado-lanceoladas, trinervadas; flores numerosas de cor esverdeado-amarelada; frutos do tipo drupa, com formato ovoide ou ovoide-oblongo, contendo uma semente elipsoide (LORENZI; MATOS, 2008).

O óleo essencial da canela pode ser obtido tanto das cascas como das folhas, sendo a composição completamente distinta. O óleo obtido das folhas é utilizado na cosmética e na aromaterapia, ao passo que o das cascas, na aromatização de alimentos. Koketsu et al. (1997) encontraram a presença do aldeído cinâmico (**7**) (55%), seguido do eugenol (**8**) (12%) no óleo essencial da casca, e o eugenol (**8**) (94%) e traços de aldeído cinâmico (**7**) (1%) no óleo das

folhas. Outros autores, como Freire (2008) e Oussalah et al. (2006), também encontraram os mesmos constituintes majoritários, em concentrações semelhantes, em estudos separados de óleo essencial de folhas e de cascas.

2.1.4 Capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.)

O capim-limão, pertencente à família *Poaceae*, é uma erva perene que forma touceiras compactas e robustas de até 1,2 m de altura, com rizoma semissubterrâneo. A espécie é largamente utilizada na medicina popular na forma de chá das folhas, podendo ser utilizada com finalidades agrônômicas para compor cercas-vivas e na contenção de encostas para evitar erosão. Mas, seu óleo essencial representa o principal produto de interesse econômico, largamente utilizado na indústria de alimentos e cosméticos (COSTA et al., 2005).

O constituinte majoritário do óleo essencial é o citral, uma mistura dos isômeros neral (**9**) e geranial (**10**), em concentração que varia de 70% a 80%, de acordo com autores de diferentes localidades (BAKKALI et al., 2008; GUIMARÃES, 2007; LIMA et al., 2008; MARTINAZZO et al., 2013).

2.1.5 Cravo da índia (*Syzygium aromaticum* Thumb.)

Pertencente à família *Myrtaceae*, o craveiro-da-índia é uma árvore de ciclo perene, que atinge altura que varia de 10 a 12 m, tem folhas ovais grandes e flores de cor vermelha que se apresentam em numerosos grupos de cachos terminais (ALMA et al., 2007; ASCENÇÃO; MOUCHREK FILHO, 2013).

A espécie é explorada, principalmente, para a extração industrial do óleo essencial obtido a partir dos botões florais, folhas e outras partes (LORENZI; MATOS, 2008). O óleo pode conter até 90% de eugenol (**8**), tendo o cariofileno

(5) como segundo maior constituinte (COSTA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2009).

2.1.6 Funcho doce (*Foeniculum vulgare* Mill.)

Uma das plantas medicinais mais utilizadas pela população brasileira é o funcho, espécie da família *Apiaceae*, também conhecida como erva-doce, falsa erva-doce ou anis-doce. Trata-se de uma erva aromática e condimentar (LORENZI; MATOS, 2008), perene e bienal, entouceirada, aromática, nativa da região mediterrânea que é encontrada em terrenos baldios. A variedade amarga é espontânea no norte e centro do continente europeu enquanto que a variedade doce é cultivada em todo o mundo (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2004).

Segundo a Farmacopéia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010), o óleo essencial deve estar presente na concentração mínima de 2% para o funcho, sendo seu principal constituinte o anetol (11) (85%).

2.1.7 Limão Tahiti (*Citrus aurantifolia* Swingle)

O limão-taiti é um fruto de origem tropical, de exploração econômica relativamente recente. A produção do gênero *Citrus* (limão), além de destinar-se ao consumo *in natura* e à indústria de sucos, destina-se também à extração do óleo essencial contido em sua casca (MENDONÇA et al., 2006). Apresenta folhagem verde densa, com folhas e flores de tamanho médio, flores com cinco pétalas e não apresentam pólen viável (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 1998).

De acordo com Demyttenaere, Belleghem e De Kimpe (2001), o limoneno (12) é o componente majoritário dos óleos essenciais das cascas de frutos do gênero *Citrus*.

2.1.8 Mandarina (*Citrus nobilis* Lour.)

A planta de mandarina é vigorosa, de tamanho médio a grande, crescimento ereto, com poucos espinhos, folhagem densa, com folhas médias, lanceoladas e de largura média. Tem grande tendência de produzir alternadamente. Os frutos são de tamanho médio, forma oblata, base com pescoço pequeno e ápice pouco deprimido. A casca é fina, firme, mas fácil de remover; superfície lisa, de cor laranja a vermelha, com 9 a 13 segmentos, facilmente separável e eixo médio e aberto. A cor da polpa é laranja, sucosa, às vezes aromática; poucas sementes, mono ou poliembriônicas e cotilédones usualmente verdes (DONADIO; STUCHI; CYRILLO, 1998). O limoneno (**12**) é o mais expressivo componente majoritário dos óleos essenciais dos cítricos em geral (GOMES, 2011).

2.1.9 Manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)

O manjeriço é um subarbusto aromático, anual, ereto, muito ramificado, apresentando de 30 a 50 cm de altura; folhas simples, medindo de 4 a 7 cm de comprimento, membranáceas com margens onduladas e nervuras salientes; flores brancas reunidas em racemos terminais curtos. Planta nativa da Ásia tropical, foi introduzida no Brasil pela colônia italiana (LORENZI; MATOS, 2008).

Avaliando a influência do processamento da folha e do tipo de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de manjeriço, Rosado et al. (2011) identificaram o linalol (**13**) e o geraniol (**14**) como constituintes majoritários.

2.1.10 Menta (*Mentha piperita* L.)

A menta, planta aromática da família *Lamiaceae*, popularmente conhecida por hortelã-pimenta, é uma erva perene, com caule ramificado, contendo folhas opostas pecioladas ovais e com margem serrilhada, apresentando cor verde mais escura na face superior da folha e mais pálida na inferior (HABER et al., 2005).

Produz óleo essencial com propriedades antiespasmódica, anti-inflamatória, antiúlcera e antiviral, sendo de grande importância farmacêutica. O óleo é rico em mentol **(15)** (30-50%) e mentona **(16)** (14-32%), segundo pesquisa de Cardoso et al. (2001).

2.1.11 Noz moscada (*Myristica fragans* Houtt.)

A árvore da noz-moscada, a moscadeira, é nativa de ilhas vulcânicas de extremidade meridional das ilhas Molucas. O fruto é redondo, de cor amarelo-esverdeada, com diâmetro de, aproximadamente, 5 cm, consistindo de pericarpo e semente. No interior do fruto, a semente grossa, a noz-moscada, é revestida por uma estrutura entrelaçada e avermelhada, o macis, sendo as duas partes utilizadas como especiarias (SALVADEGO, 2009).

A espécie contém de 5% a 15% de óleo essencial, sendo os constituintes majoritários o α -pineno **(4)**, o β -pineno **(17)**, o sabineno **(18)**, o terpineol **(19)** e a miristicina **(20)** (LE COUTEUR; BURRESON, 2006).

2.1.12 Orégano (*Origanum vulgare* L.)

Planta aromática, herbácea, perene, ereta, de 30 a 50 cm de altura, folhas esparso-pubescentes, com 1-2 cm de comprimento e flores esbranquiçadas,

róseas ou violáceas, reunidas em inflorescências paniculadas terminais (LORENZI; MATOS, 2008). O orégano, da família *Lamiaceae*, é um dos condimentos mais utilizados na culinária brasileira no preparo de carnes, panificação, ovos, peixes e frutos do mar.

Nos óleos essenciais de condimentos, dentre os diversos componentes, os compostos fenólicos são os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas. Os constituintes majoritários do óleo essencial de orégano são o carvacrol (**21**) e o timol (**22**) (CHI; ZIVANOVIC; PENFIELD, 2006; LAMBERT et al., 2001; SILVA, 2010), responsáveis pela atividade antimicrobiana deste.

2.1.13 Pimenta preta (*Piper nigrum* L.)

A pimenta-do-reino (Piperaceae) é uma planta perene, trepadeira, que necessita de tutores (mourões ou estacas) para a sua condução. É originária da Índia e, até os dias atuais, é a mais utilizada e valorizada dentre as especiarias. As folhas têm formas e tamanhos variados em função da variedade. As flores são produzidas em inflorescências (tipo espiga), longas ou curtas, são hermafroditas (têm os dois sexos na mesma flor) e autoférteis (ocorre a autofecundação) (PINO; AGUERO; FUENTES, 2003).

O óleo essencial dos frutos de *Piper nigrum* é composto, principalmente, por β -cariofileno (**5**) (19,5%), α -pineno (**4**) (19,3%), α -terpineno (**23**) (12,71%) e globulol (**24**) (12,6%) (PINO; AGUERO; FUENTES, 2003).

2.1.14 Tomilho branco (*Thymus vulgaris* L.)

O tomilho é um subarbusto perene, ereto, ramificado, entouceirado, medindo de 20 a 30 cm de altura, com a base dos ramos lenhosa e rasteira, muito

aromático. Apresenta folhas pequenas, opostas, de formas variadas e quase sésseis, levemente pubescentes e de coloração mais clara na parte inferior. As flores de cor esbranquiçada são pequenas e se encontram reunidas em inflorescências espigadas axilares (LORENZI; MATOS, 2008).

Jakiemiu et al. (2010) identificaram o timol (**22**) (50,43%-57,50%), seguido pelo *p*-cimeno (**25**) (12-21%), como os compostos majoritários de plantas frescas (haste e folhas) de tomilho. Os demais constituintes do óleo são γ -terpineno (**26**) (5%-7%), carvacrol (**21**) (2,35%-4,01%) e borneol (**27**) (1,59%-3,40%).

2.2 Atividade antibacteriana de óleos essenciais

A maior aplicação biológica dos óleos essenciais ocorre como agentes antimicrobianos. Essa capacidade, presente na maioria desses compostos, de certa maneira, irá representar uma extensão do próprio papel que eles exercem nas plantas, defendendo-as das bactérias e fungos fitopatogênicos. O modo de ação que provoca a inibição de microrganismos por óleos essenciais e seus compostos químicos envolve diferentes mecanismos, dependendo dos componentes majoritários do óleo essencial (CITÓ et al., 2003; SOUZA et al., 2005).

De acordo com estudos, os óleos essenciais são eficientes no controle do crescimento de ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (SANTOS, 2011), sendo promissor seu uso como aditivos alimentares, seja para retardar a deterioração dos alimentos ou para evitar o crescimento de patógenos alimentares resistentes a antibióticos (LIMA et al., 2014; SANTOS et al., 2012).

Diversos pesquisadores comprovaram a ação antimicrobiana dos óleos essenciais, como Hoferl, Buchbauer e Jirovetz (2009), que encontraram elevada

atividade do óleo de *Origanum vulgare* sobre *E. coli*, semelhante aos resultados encontrados por Poiana et al. (2008). Santurio et al. (2011) verificaram ação do óleo de *Rosmarinum officinalis* sobre *E. coli* e *Staphylococcus aureus*. Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008) observaram que os óleos de *O. vulgare* e *Thymus vulgaris* foram mais efetivos para a inibição de *Listeria* spp. Oliveira et al. (2012) encontraram concentração mínima bactericida de 0,06%, para óleo de *Cinnamomum cassia* e de 0,25%, para os óleos de *Melaleuca alternifolia* e *Cymbopogon flexuosus* sobre *E. coli* enteropatogênica (EPEC). Valeriano et al. (2012) observaram que o óleo essencial de *Mentha piperita* apresentou maior atividade antibacteriana para EPEC; o de *Cymbopogon citratus* apresentou maior atividade antimicrobiana frente a EPEC e atividade moderada frente a *Enterobacter sakazakii*, *Salmonella enterica Enteritidis* e *Listeria monocytogenes*; *Ocimum basilicum* apresentou maior atividade frente a EPEC e *E. sakazakii* e atividade moderada frente a *S. enterica Enteritidis*; *Origanum majorana* apresentou maior atividade frente EPEC e atividade moderada para *S. enterica Enteritidis* e *E. sakazakii*. Geromini et al. (2012) observaram que os óleos essenciais de *Lippia alba* e *Ocimum gratissimum* demonstram alto potencial inibitório sobre *E. coli*, *Candida albicans* e *S. aureus*.

Entende-se que a inibição do crescimento microbiano pelos óleos essenciais seja devido ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que acaba por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos (COWAN, 1999; SHYLAJA; PETER, 2004). Em se tratando de bactérias, as gram-negativas, geralmente, são mais resistentes aos óleos essenciais que as gram-positivas (TROMBETTA et al., 2005), devido às diferenças estruturais das paredes celulares destas (NAZZARO et al., 2013).

Em células bacterianas, a alteração da permeabilidade da membrana provoca perda de íons e redução do potencial da membrana, colapso da força próton motriz, depleção do *pool* de ATP (DI PASQUA et al., 2006; ULTEE; BENNINK; MOEZELAAR, 2002) e perda do conteúdo intracelular, o que modifica o equilíbrio celular, podendo levar à liberação de macromoléculas e à lise celular (COX et al., 2000; LAMBERT et al., 2001; NAZZARO et al., 2013; OUSSALAH et al., 2006).

Os óleos essenciais ainda são capazes de causar coagulação do citoplasma, danificar lipídios e proteínas e afetar a atividade geral da célula, como controle da pressão de turgor, transporte de solutos e regulação do metabolismo, como síntese de RNA, DNA, proteínas e polissacarídeos (BURT, 2004; LANCIOTTI et al., 2004; ULTEE; BENNINK; MOEZELAAR, 2002).

Alguns mecanismos de ação relatados para os óleos essenciais e seus componentes e a localização na célula bacteriana estão esquematizados na Figura 2. É importante salientar que nem todos os mecanismos atuam separadamente; alguns locais são afetados em consequência de outro previamente atacado (BURT, 2004; NAZZARO et al., 2013).

Segundo Rahman e Kang (2009), o risco de que microrganismos patogênicos desenvolvam resistência aos óleos essenciais e extratos vegetais é muito baixo, uma vez que estes produtos contêm uma mistura de substâncias antimicrobianas que atuam por meio de diversos mecanismos. Esta é uma característica benéfica e vantajosa dos produtos derivados de plantas sobre outros agentes antimicrobianos, e pode vir a aumentar a segurança alimentar e a vida útil dos alimentos, sendo potente alternativa na conservação de alimentos.

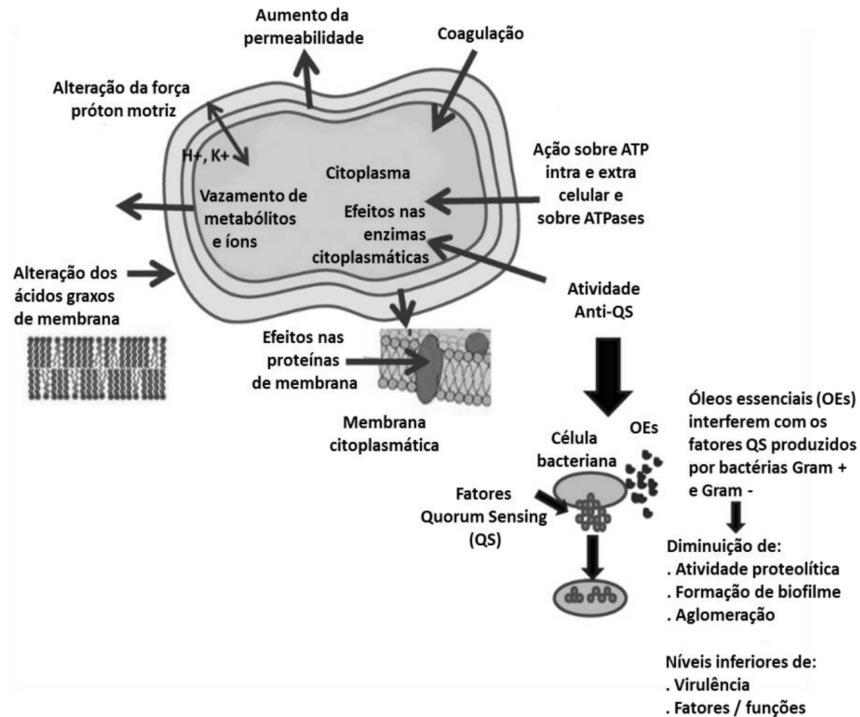


Figura 2. Mecanismos de ação e sítios alvos dos óleos essenciais em células microbianas. Fonte: Traduzida de Nazzaro et al. (2013).

A presença de microrganismos em alimentos tem como consequência importante a ocorrência de toxinfecções alimentares. As bactérias são os principais microrganismos envolvidos nos processos de contaminações de alimentos, pois atuam sob numerosos tipos de substratos, sob diferentes faixas de temperatura e de pH, bem como de condições do meio ambiente. São agentes importantes na etiologia das doenças transmitidas por alimentos de origem microbiana, sendo responsáveis pelo maior número de surtos e de mortes, seja como causadoras de infecções ou toxinoses (JAY, 2005; SOUSA, 2003).

2.3 Bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos

Diarreias infecciosas têm sido reconhecidas como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento e em regiões desprovidas de adequadas condições de saneamento básico (RODRIGUES, 2009). As bactérias patogênicas são as responsáveis pela maioria dos surtos e casos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), não só em número como em frequência, embora outros agentes, como vírus, fungos ou parasitas, também as possam provocar. Devido à sua estrutura muito simples e por serem microrganismos unicelulares, as bactérias replicam-se muito rapidamente, caso encontrem nutrientes, temperatura, pH, umidade e concentração de oxigênio adequados (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003; EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL - ECDC, 2011; NEWELL et al., 2010).

Entre as bactérias patogênicas que podem vir a ocasionar DTAs, têm-se, como exemplos, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, alguns sorogrupos do gênero *Salmonella* e *Escherichia coli* (FORSYTHE, 2005; JAY, 2005; SILVA et al., 2005). Dentre os gêneros mais comumente encontrados na carne, carne moída em especial, estão *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Staphylococcus*, além de fungos filamentosos e leveduriformes (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

2.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é o mais importante e mais comum membro do gênero *Escherichia*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, estando associado a uma grande variedade de doenças. É um bacilo gram-negativo, não esporulado, aeróbio facultativo, catalase negativo, oxidase negativo, capaz de fermentar a

glicose, com produção de ácido e gás. É considerada a principal bactéria representante do grupo das enterobactérias e faz parte do grupo dos coliformes termotolerantes, que têm a característica de resistirem a elevadas temperaturas. Esta bactéria ocorre em fezes de animais de sangue quente, como, por exemplo, o homem (SANTURIO, 2011).

A presença de cepas, patogênicas ou não, em alimentos indica contaminação direta ou indireta de origem fecal, uma vez que é transmitida via fecal-oral (SÃO PAULO, 2002) como esquematizado na Figura 3, sendo considerado o indicador clássico da possível presença de microrganismos patogênicos (JAY, 2005). Contagens elevadas de *E. coli* relacionam-se também à falta de higiene e a falhas no processamento de alimentos (YUCEL; ULUSOY, 2006).

E. coli se refere a um grupo de diversas bactérias em constante evolução que incluem tanto cepas patogênicas quanto comensais. A diversidade patogênica de *E. coli* é resultante da inserção e deleção de genes que determinam diferentes propriedades de virulência para cada isolado bacteriano, sendo que apenas as combinações mais bem sucedidas perduraram e se tornaram patótipos específicos de *E. coli* (WILLIAMS; TORRES; LLOYD, 2010).

Segundo estudos de Murray, Rosenthal e Pfaller (2009), as cepas de *E. coli* causadoras de gastroenterites podem ser divididas em cinco principais grupos que são: *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterro-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC).

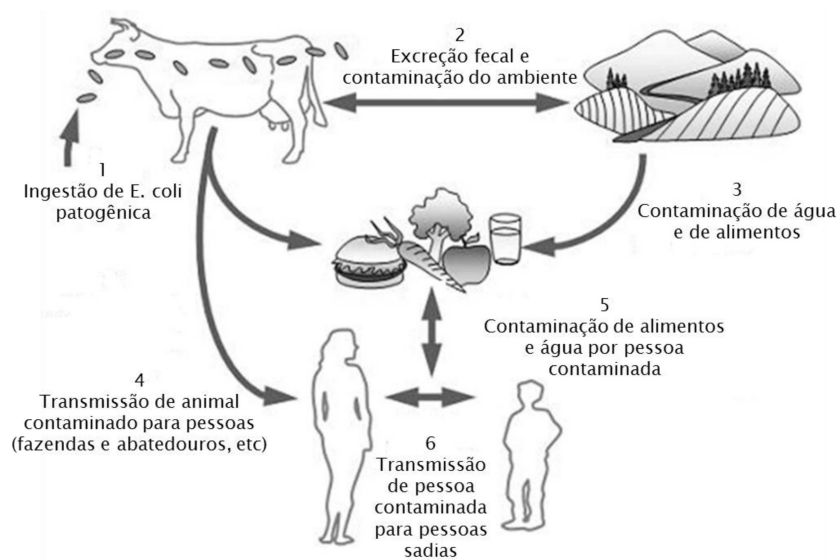


Figura 3. Ilustração do ciclo de transmissão da bactéria *Escherichia coli*. Fonte: Adaptado de Google Imagens.

2.3.1.1 *Escherichia coli* enterotoxigênica

Segundo a World Health Organization - WHO (2014), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é importante causadora de episódios diarreicos em crianças de 1 a 5 anos de idade, em países em desenvolvimento, ocasionando cerca de 380 mil óbitos anuais. A bactéria ainda pode acometer adultos imunocomprometidos e é o principal agente etiológico causador da diarreia-dos-viajantes em adultos de países desenvolvidos visitando áreas endêmicas, onde os casos de infecções por ETEC são frequentemente assintomáticos (ARDUINO; DUPONT, 1993; MATTILA, 1994; WOLF, 1997).

As infecções causadas por linhagens de ETEC em humanos induzem a quadros clínicos muito diversificados, variando de diarreia aquosa leve e autolimitante a episódios diarreicos, tipo cólera desidratante e fatal (BLACK,

1993), podendo ser acompanhados de cólicas, náuseas, vômitos e febra baixa (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Animais domésticos também podem ser acometidos por diarreias provocadas por linhagens de ETEC, o que ocasiona importantes perdas econômicas na criação de bovinos, suínos, caprinos e aves (HIRST, 1999).

A patogenicidade das linhagens de ETEC é resultante da produção de enterotoxinas termolábeis e termoestáveis e fatores de colonização. Esses fatores são proteínas presentes na superfície das bactérias capazes de reconhecer receptores específicos na superfície de células epiteliais ou eritrócitos, permitindo a colonização da mucosa do intestino delgado pela bactéria (COHEN; GIANNELLA, 1995).

Segundo o Manual de Doenças Transmitidas por Alimentos da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SÃO PAULO, 2002), entre as cepas de ETEC, os sorogrupos mais comuns incluem O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O114, O115, O128ac, O148, O153, O159 e O167. Estudos em voluntários adultos sobre dose infectiva indicaram que é necessária uma dose alta – em torno de 100 milhões a 10 bilhões da bactéria – para se estabelecer a colonização do intestino delgado, no qual elas proliferam e produzem as toxinas que induzem a secreção de fluidos. Nestas doses, a diarreia é induzida dentro de um período de 24 horas. Em crianças, é provável que a dose necessária para o desenvolvimento do quadro diarreico seja menor.

2.4 Carne moída

Representante de importante fonte de proteínas de alto valor biológico, devido à sua riqueza em aminoácidos essenciais, riqueza em vitaminas do complexo B e em minerais de alta biodisponibilidade como ferro e zinco, a carne é um dos alimentos de origem animal mais consumido no mundo

(SCHNEIDER; DURO; ASSUNÇÃO, 2014). Seu grande consumo também se deve à grande variedade de técnicas de preparo a que pode ser submetida e ao seu sabor (LAWRIE, 2005).

Andrighetto et al. (2014) observaram que a carne bovina é a mais consumida do total de carnes da alimentação, com 51,90% do consumo, seguida da carne de frango (29,60%). Segundo o Anuário da Pecuária Brasileira de 2013 (ANUÁRIO..., 2013), o Brasil foi o segundo maior produtor e exportador de carne bovina do mundo, no ano de 2012 e apresentou um consumo per capita de 39,6 kg/pessoa/ano, dados que mostram ser um país com grande potencial para a produção de carne bovina.

Dentre os produtos cárneos, a carne moída se destaca por sua aceitabilidade e por se caracterizar como produto popular, visto que pode ser utilizada nas refeições de maneira prática e diversificada, além de ser acessível a uma faixa da população de menor poder aquisitivo (MOTTA; BELMONTE; PANETTA, 2000).

De acordo com o Anexo II da Instrução Normativa nº 83/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2003), entende-se por carne moída o produto cárneo obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos, seguida de imediato resfriamento ou congelamento.

A carne apresenta alta atividade de água e seu pH (5,4 a 5,80) favorece o crescimento da maioria dos microrganismos. De maneira geral, apresenta composição química abundante em nutrientes necessários para o crescimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (BAPTISTA et al., 2013; FRANCO; LANDGRAF, 2008; JAY, 2005).

Do ponto de vista microbiológico, Sousa et al. (2012) afirmam que a carne moída apresenta maiores problemas em relação aos outros cortes, por sofrer maior manipulação e apresentar maior relação área/volume, além de

alterar o poder de oxirredução. Sendo favoráveis as condições ao desenvolvimento microbiano, como por bactérias deteriorantes e patogênicas, a carne moída e os alimentos a ela misturados podem representar risco à saúde daqueles que a consumirem (KHALAFALLA; GERGIS; EL-SHERIF, 1993).

Analisando as condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída de cinco estabelecimentos comerciais, Oliveira et al. (2008) encontraram ausência de UFC de *Escherichia coli* nas carnes inteiras e nas mãos de manipuladores, enquanto nas análises de carne moída e máquinas de moer foram encontrados $0,23 \times 10^1$ UFC/g e $4,00 \times 10^1$ UFC/g e $0,30 \times 10^1$ UFC/cm² e $0,23 \times 10^1$ UFC/cm², respectivamente, em dois estabelecimentos, indicando falta de higiene com os equipamentos.

Com o passar dos anos, os consumidores estão se tornando mais exigentes e atentos em relação aos produtos que consomem e, assim, os aspectos relacionados à segurança alimentar permitem obter maior qualidade do produto (ANDRIGHETTO et al., 2014). Por ser a carne um alimento muito perecível, o aumento de sua vida útil é de extrema importância para o pecuarista e para o consumidor final.

REFERÊNCIAS

ALMA, M. H. et al. Chemical composition and content os essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). **BioResources**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 265-269, 2007.

ANDRIGHETTO, C. et al. Consumo de carne bovina na comunidade acadêmica da UNESP - Dracena. **Revista Ciência em Extensão**, Assis, v. 10, n. 3, p. 133-142, 2014.

ANGIONI, A. et al. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 11, p. 3530-3535, 2004.

ANUÁRIO da pecuária brasileira 2013. São Paulo: FNP, 2013. 357 p.

ARDUINO, P. C.; DUPONT, H. L. Traveler's diarrhoea Baillieres. **Clinical Gastroenterology**, New York, v. 7, n. 2, p. 365-385, June 1993.

ASCENÇÃO, V. L.; MOUCHREK FILHO, V. E. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (Cravo da índia). **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 20, p. 137-144, jul. 2013. Número especial.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. **Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos**. Lisboa: Forvisão, 2003. 109 p.

BAPTISTA, R. I. A. A. et al. Aspectos qualitativos da carne moída comercializada na região metropolitana do Recife-PE. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 7, n. 1, p. 38-47, 2013.

BLACK, R. E. Epidemiology of diarrhoeal disease: implications for control by vaccines. **Vaccine**, Kidlington, v. 11, n. 2, p. 100-106, Jan. 1993.

BLANCO, M. C. S. G. **Preparado biodinâmico, épocas de colheita, temperaturas de secagem, tempo de armazenamento e tipos de embalagem na produção e conservação de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)**. 2001. 76 p. Tese (Doutorado em Horticultura) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 83**, de 21 de novembro de 2003. Anexo II – Regulamento técnico de identidade e qualidade de carne moída de bovino. Brasília, 2003. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1902>>. Acesso em: 8 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, 2006. 60 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância. Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 5 abr. 2010. Seção 1, p. 85-87.

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

CARDOSO, M. G. et al. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral química e medicinal**. Lavras: UFLA, 2001. 81 p.

CEBALLOS, B. S. O.; KONIG, A. **Análise de água de mananciais e residuária: aspectos hidro e microbiológicos**. Fortaleza: Escola Técnica Federal do Ceará, 1997.

CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, Oxford, v. 1, n. 100, p. 553-559, Feb. 2007.

CHI, S.; ZIVANOVIC, S.; PENFIELD, M. P. Application of chitosan films enriched with oregano essential oil on bologna: active compounds and sensory attributes. **Food Science and Technology International**, London, v. 12, n. 2, p. 111-117, 2006.

CITÓ, A. M. G. L. et al. Resina de protium heptaphyllum march (Burseraceae): composição química do óleo essencial e avaliação citotóxica frente a artemia salina leach. **Anais da Associação Brasileira de Química**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 2, p. 74-76, 2003.

COHEN, M. B.; GIANNELA, R. A. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: BLASER, M. J. et al. (Ed.). **Infection of gastrointestinal tract**. New York: Raven, 1995. p. 691-707.

COSTA, A. R. T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.

COSTA, L. C. B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 956-959, 2005.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, Oct. 1999.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 170-175, Jan. 2000.

CSEKE, L. J. et al. **Natural products from plants**. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. 632 p.

CUNHA, A. P.; SILVA, P. A. da; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004. 310 p.

DE LA ROSA, L. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. v. 1, 382 p.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; BELLEGHEM, K. van; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 57, n. 2, p. 199-208, May 2001.

DESCHAMPS, C. et al. Avaliação higiênica-sanitária de cozinhas industriais instaladas no município de Blumenau, SC. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 112, p. 12-15, 2003.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, 2006.

DONADIO, L. C.; STUCHI, E. S.; CYRILLO, F. L. L. Tangerinas ou mandarinas. **Boletim Citrícola**, Jaboticabal, n. 5, p. 5, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical. **A cultura do limão-taiti**. 2. ed. rev. e aum. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. 10 p.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. **EFSA Journal**, Parma, v. 9, n. 3, p. 1-238, 2011.

FERREIRA, A. et al. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 108, n. 13, p. 31-37, 2006.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 424 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 681 p.

FREIRE, M. J. **Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus***. 2008. 68 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

GACHKAR, L. et al. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, Oxford, v. 102, n. 3, p. 898-904, 2007.

GEROMINI, K. V. N. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 127-131, 2012.

GOMES, M. S. **Caracterização química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Citrus***. 2011. 98 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

GUIMARÃES, L. G. L. **Estudo da estabilidade e do efeito fungitóxico do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf)**. 2007. 72 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 91-97, May 2008.

HABER, L. L. et al. Diferentes concentrações de solução nutritiva para o cultivo de *Mentha piperita* e *Melissa officinalis*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 1006-1009, 2005.

HIRST, T. R. Cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxin. In: ALOUF, J. E.; FREER, J. H. (Ed.). **The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins**. London: Academic, 1999. p. 104-129.
HOFERL, M.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 21, n. 5, p. 459-464, Dec. 2009.

JAKIEMIU, E. A. R. et al. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 683-688, 2010.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

KHALAFALLA, F.; GERGIS, A. F.; EL-SHERIF, A. Effect of freezing and mincing on microbial load of minced meat. **Die Nahrung**, Berlin, v. 37, n. 5, p. 422-427, 1993.

KOKETSU, M. et al. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 281-285, 1997.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LANCIOTTI, R. et al. Use of natural aroma compounds to improve shelflife and safety of minimally processed fruits. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 15, n. 3/4, p. 201-208, 2004.

LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384 p.

LE COUTEUR, P.; BURRESON, J. **Os botões de Napoleão: as 17 moléculas que mudaram a história**. Rio de Janeiro: J. Zahar, 2006. 344 p.

LIMA, A. P. L. et al. Efeito antimicrobiano do Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de pacientes de um hospital escola do sul de Minas. **Revista Ciências em Saúde**, Itajubá, v. 4, n. 2, p. 55-63, 2014.

LIMA, R. K. et al. Composição dos óleos essenciais de anis-estrelado *Illicium verum* L. e de capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: avaliação do efeito repelente sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). **BioAssay**, Londrina, v. 3, n. 8, p. 1-6, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 576 p.

MAGALHÃES, B. H.; CAMARGO, M. F.; HIGUCHI, C. T. Indicação de uso de espécies vegetais para o tratamento da celulite com fins cosméticos. **Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 61-82, 2013.

MARTINAZZO, A. P. et al. Avaliação do óleo essencial folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf após o processo de secagem. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 12, n. 5, p. 523-536, 2013.

MATTILA, L. Clinical features and duration of traveler's diarrhea in relation to its etiology. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 728-734, Oct. 1994.

MATTOS, S. H. et al. **Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. 108 p. (Série BNB - Ciência e Tecnologia, 2).

MAY, A. et al. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 195-200, 2010.

MENDONÇA, L. M. V. L. et al. Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do Limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 870-874, 2006.

MOTTA, M. R. A.; BELMONTE, M. A.; PANETTA, J. C. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados da região oeste de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 78/79, p. 59-62, 2000.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 948 p.

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NEGRAES, P. **Guia A-Z de plantas, condimentos**. São Paulo: Bei Comunicações, 2003. 254 p.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases: the challenges of 20 years ago still persist while new ones. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 139, n. 2, p. S3-S15, 2010.

OKPEKON, T. et al. Antiparasitic activities of medicinal plants used in ivory coast. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 90, n. 1, p. 91-97, 2004.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica e de morfologia vegetal**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 228 p.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G.; AKISSUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 2005. 412 p.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1893-1898, nov./dez. 2008.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. **Food and Bioproducts Processing**, Davis, v. 9, n. 4, p. 809-818, Oct. 2012.

OLIVEIRA, R. A. et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2006.

PERSICO, P. et al. Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging. **Polymer Engineering & Science**, Malden, v. 49, n. 7, p. 1447-1455, July 2009.

PINO, J. A.; AGUERO, J.; FUENTES, V. Composition of the aerial parts of *Piper nigrum* L. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 15, n. 3, p. 209-210, May/June 2003.

POIANA, M. et al. Antimicrobial effect of some essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 20, n. 4, p. 373-379, July/Aug. 2008.

PORTE, A. **Estudos de óleos essenciais de três plantas condimentares da família Lamiacea**. 2000. 216 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

RAHMAN, A.; KANG, S. Inhibition of foodborne pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (walt.) b.s.p. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 29, n. 2, p. 176-189, May 2009.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

RODRIGUES, J. F. **Diversidade genética do óperon *etx* em amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC):** determinação da variabilidade das sequências gênicas e capacidade de síntese da toxina termo-lábil (LT). 2009. 30 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RODRIGUES, V. N. et al. Supercritical extraction of essential oil from aniseed (*Pimpinella anisum* L.) using CO₂: solubility, kinetics, and composition data. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 6, p. 1518-1523, Mar. 2003.

ROSADO, L. D. S. et al. Influência do processamento da folha e tipo de secagem no teor e composição química do óleo essencial de manjeriço cv. Maria Bonita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 291-296, mar./abr. 2011.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.

SALVADEGO, W. N. C. **Investigando os componentes presentes nos condimentos**. Curitiba: Portal Educacional do Estado do Paraná, 2009. Disponível em: <<http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/539-4.pdf>>. Acessado em: 14 nov. 2014.

SANTOS, R. L. A. Investigação da atividade antimicrobiana do *Ocimum basilicum* (Manjeriço) sobre *Staphylococcus aureus*. **Revista Ciências em Saúde**, Itajubá, v. 3, n. 1, p. 33-42, 2011.

SANTOS, T. G. et al. Composição química e avaliação e da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012.

SANTURIO, D. F. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos sobre *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos**. 2011. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SANTURIO, D. F. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica. ***Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC): manual das doenças transmitidas por alimentos**. São Paulo, 2002. Disponível em:

<ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/ecoli_enterotoxi.pdf>. Acesso em: 16 set. 2014.

SCHNEIDER, B. C.; DURO, S. M. S.; ASSUNÇÃO, M. C. F. Consumo de carnes por adultos do sul do Brasil: um estudo de base populacional. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 8, p. 3583-3592, 2014.

SHYLAJA, M. R.; PETER, K. V. The functional role of herbal spices. In: PETER, K. V. (Ed.). **Handbook of herbs and spices**. Cambridge: Woodhead, 2004. v. 2, p. 348-370.

SILVA, M. L. Q. et al. Avaliação higiênico-sanitária dos restaurantes self-services e restaurantes populares da cidade de Juazeiro do Norte (CE) quanto a prevalência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp. **Revista Interfaces**, Juazeiro do Norte, ano 2, v. 2, p. 7-12, jun. 2014. Número especial.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. São Paulo: Varela, 2005. 164 p.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1059 p.

SILVEIRA, S. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo fresco**. 2012. 215 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. p. 467-496.

SOKMEN, S. et al. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 8, p. 627-634, 2004.

SOUSA, C. P. Pathogenicity mechanisms of prokaryotic cells: an evolutionary view. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 23-31, 2003.

SOUSA, T. M. et al. Microrganismos patogênicos e indicadores de condições higiênico-sanitária em carne moída comercializada na cidade de Barra do Garças, MT. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 6, n. 2, p. 124-130, 2012.

SOUZA, E. L. et al. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 4, p. 549-558, 2005.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

ULTEE, A.; BENNINK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

WILLIAMS, N. D.; TORRES, A. G.; LLOYD, S. J. Evolution and epidemiology of diarrheagenic *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. (Ed.). **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**. Tucson: University of Texas, 2010. p. 8-24.

WOLF, M. K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigênica *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, n. 4, p. 569-584, Oct. 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Iniciative for vaccine research (IVR)**. Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/e_e_coli/en>. Acesso em: 24 out. 2014.

YUCEL, N.; ULUSOY, H. A Turkey survey of hygiene indicator bacteria and *Yersinia enterocolitica* in raw milk and cheese samples. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 5, p. 383-388, 2006.

**ARTIGO 1: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CONCENTRAÇÃO MÍNIMA
BACTERICIDA DE DEZESSEIS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE
Escherichia coli ENTEROTOXIGÊNICA**

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo analisar a composição química e verificar o efeito bactericida *in vitro* de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). Dentre os óleos essenciais estudados, três foram extraídos *in situ* por arraste a vapor e treze foram adquiridos comercialmente. Todos os óleos foram analisados por CG-EM e CG-DIC. A atividade bactericida foi avaliada pelo método de microdiluição utilizando-se caldo triptona de soja e microplacas de poliestireno de 96 poços, com posterior plaqueamento das culturas em ágar triptona de soja. Os óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* e de *Thymus vulgaris* apresentaram concentração mínima bactericida (CMB) de 0,12% e 0,25%, respectivamente. Já os óleos comerciais de *Syzygium aromaticum*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* e os óleos extraídos *in situ* de *Cymbopogon citratus* e *Origanum vulgare* apresentaram CMB de 0,50%, 2,00%, 0,50%, 1,00% e 1,00%, respectivamente. Os dezesseis óleos essenciais apresentaram composição química qualitativa e quantitativa distintas. As análises químicas dos óleos de *Cinnamomum cassia* e de *Thymus vulgaris* determinaram a presença majoritária de *E*-cinamaldeído (84,52%±0,07%) e timol (50,89%±0,31%). Portanto, os óleos de *C. cassia* e *T. vulgaris* foram os mais eficazes na inibição do crescimento *in vitro* dessa bactéria, a qual possui diferentes níveis de sensibilidade dependendo da composição química do óleo.

Palavras-chave: Patógeno alimentar. ETEC. Antimicrobianos naturais. Atividade bactericida. Cromatografia gasosa.

ABSTRACT

This study aims to analyze the chemical composition and verify *in vitro* bactericidal effect of sixteen essential oils on enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Among the essential oils, three were extracted *in situ* by steam distillation and thirteen were purchased commercially. All oils were analyzed by GC-MS and GC-FID. The bactericidal activity was evaluated by the microdilution method using tryptone soy broth, and 96-well polystyrene microplates with subsequent plating of the cultures in tryptone soy agar. *Cinnamomum cassia* and *Thymus vulgaris* essential oils showed minimal

bactericidal concentration (MBC) 0.12% and 0.25%, respectively. The commercial oils of *Syzygium aromaticum*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* and the oils extracted *in situ* *Origanum vulgare* and *Cymbopogon citratus* showed MBC of 0.50%, 2.00%, 0.50%, 1.00% and 1.00%, respectively. The sixteen essential oils showed distinct qualitative and quantitative chemical composition. Chemical analysis of *Cinnamomum cassia* and *Thymus vulgaris* oils led to the predominant presence of *E*-cinnamaldehyde ($84.52\% \pm 0.07\%$) and thymol ($50.89\% \pm 0.31\%$). Therefore, *T. vulgaris* and *C. cassia* oils were the most effective in inhibiting *in vitro* growth of this bacterium, which has different sensitivity levels depending on the chemical composition of the oil.

Keywords: Food pathogen. ETEC. Natural antimicrobial. Bactericidal activity. Gas chromatography.

1 INTRODUÇÃO

A presença de microrganismos nos alimentos pode, além de reduzir a vida de prateleira, causar toxinfecções nos consumidores (MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005). Bactérias do grupo dos coliformes fecais são utilizadas como indicadores de condições higiênico-sanitárias de água e alimentos. A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa que faz parte dos coliformes termotolerantes e ocorre em fezes de animais de sangue quente, assim como o homem (CEBALLOS; KONIG, 1997; SILVA et al., 2014). A presença de microrganismos indicadores como *Escherichia coli* em produtos processados indica, provavelmente, contaminação posterior ao processamento e pode sugerir uso de práticas inadequadas de manipulação e higiene (LIMA et al., 2007). *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) causa a gastroenterite conhecida como diarreia dos viajantes, que tem como quadro clínico diarreia líquida, dor abdominal, febre baixa, náusea e mal-estar. A ETEC, normalmente não é responsável por toxinfecções alimentares em países com bom padrão sanitário e boas práticas de preparação dos alimentos. Porém, em países com precárias condições higiênico-

sanitárias a contaminação da água com esgoto pode levar à contaminação destes (SÃO PAULO, 2002).

O interesse em antimicrobianos naturais tem se expandido nos últimos anos em resposta a demanda dos consumidores por aditivos naturais. Durante as duas últimas décadas, conservantes naturais têm sido investigados para aplicações práticas (TIWARI et al., 2009). Dentre diversos outros produtos naturais, extratos vegetais e óleos essenciais vêm sendo largamente estudados para uso como conservantes naturais de alimentos e, têm demonstrado promissoras propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antiparasitárias (BOULANOUAR et al., 2013; FERREIRA et al., 2006; OKPEKON et al., 2004; SACCHETTI et al., 2005; SOKMEN et al., 2004).

Em particular, os óleos essenciais podem afetar tanto o invólucro externo quanto o citoplasma das células bacterianas, sendo a membrana celular o primeiro alvo. Isto ocorre devido à hidrofobicidade destes e de seus componentes, que permitem que eles se difundam através da bicamada fosfolipídica (NAZZARO et al., 2013). O mecanismo de ação dos óleos essenciais sobre as bactérias está relacionado à perturbação da membrana citoplasmática, danos nas proteínas da membrana, coagulação do citoplasma, alteração no fluxo de elétrons, interrupção da força próton motriz, alteração do transporte ativo e redução do *pool* de ATP intracelular (BURT, 2004; NAZZARO et al., 2013).

O presente trabalho teve por objetivo analisar a composição química e o efeito bactericida *in vitro* de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos óleos essenciais

A atividade bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre ETEC foi avaliada. Destes, treze foram adquiridos da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda. e os demais extraídos *in situ* no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os óleos essenciais comerciais empregados no estudo estão listados na Tabela 1.

Os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (capim-limão), *Ocimum basilicum* L. (manjeriço) e *Origanum vulgare* L. (orégano) foram obtidos das folhas frescas. As três espécies vegetais foram cultivadas em solo com adubação orgânica (esterco bovino) em canteiros localizados no Horto de Plantas Medicinais do DAG/UFLA, Lavras (21°14' 43S 44 °59' 59W, média anual de precipitação de 1530 mm, temperatura média de 20,4°C e 919 m altitude), Minas Gerais, Brasil. As exsicatas de *C. citratus*, *O. basilicum* e *O. vulgare* estão depositadas no herbário ESAL sob os registros 18409, 18406 e 22156, respectivamente. Folhas das três espécies foram coletadas entre os meses de fevereiro a abril de 2014 às 9:00 h da manhã. As folhas de *C. citratus* foram cortadas em fragmentos de 1,0±0,2 cm² e as de *O. basilicum* e *O. vulgare* foram utilizadas inteiras. Os óleos essenciais das três espécies foram extraídos por destilação por arraste a vapor, em destilador Marconi® MA480, por 120 minutos. O óleo essencial foi purificado por decantação, e armazenado em refrigerador a 4°C, até a realização dos ensaios biológicos e análises químicas por GC-EM e GC-DIC.

Tabela 1. Óleos essenciais comerciais utilizados no estudo.

Nome científico	Nome comum	Parte usada para extração do óleo essencial*
<i>Cinnamomum cassia</i> Nees ex Blume	Canela	Folhas, casca
<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle	Limão tahiti	Pericarpo
<i>Citrus nobilis</i> Lour.	Mandarina	Pericarpo
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Funcho doce	Sementes
<i>Illicium verum</i> Hook.	Anis estrelado	Frutos e sementes
<i>Mentha piperita</i> L.	Menta	Folhas
<i>Myristica fragans</i> Houtt.	Noz moscada	Frutos
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Manjeriçã	Folhas
<i>Origanum vulgare</i> L.	Orégano	Folhas
<i>Piper nigrum</i> L.	Pimenta preta	Frutos
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Alecrim	Folhas
<i>Syzygium aromaticum</i> Thumb.	Cravo da Índia	Botões florais
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomilho branco	Folhas

*Com exceção dos frutos cítricos que foram extraídos por prensagem a frio, os demais, segundo a empresa Ferquima®, foram extraídos por destilação a vapor.

2.2 Análise química dos óleos

As análises químicas dos óleos essenciais foram realizadas por Cromatografia de Fase Gasosa empregando-se um Cromatógrafo Agilent® 7890A, operado com sistema de processamento de dados HP GC ChemStation Ver. A.01.14, equipado com injetor/amostrador automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) e um Detector de

Ionização em Chama (DIC). As amostras foram preparadas diluindo-se o óleo essencial em acetato de etila (1%, v/v). O volume de injeção foi de 1,0 μ L, no modo *split* a uma razão de injeção de 50:1. Empregou-se coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 250 μ m de diâmetro interno x 0,25 μ m de espessura do filme) (Califórnia, EUA). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240°C. Empregou-se uma rampa de temperatura de 3°C/ min de 60°C a 200°C, seguido de uma rampa de 10°C/min até 270°C, mantendo-se em condição isotérmica por 1 minuto. As concentrações dos constituintes foram expressas pela média da porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos \pm o desvio padrão de 3 amostras analisadas. Devido à complexidade química e o grande número de amostras (dezesseis óleos essenciais), os resultados analíticos foram apresentados apenas para os cinco constituintes de maior área relativa.

As análises qualitativas foram realizadas em Cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC. Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007).

2.3 Microrganismo, manutenção, padronização e obtenção do inóculo

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFPA. O microrganismo utilizado foi *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) cedida pelo Laboratório de Enterobactérias (LABENT) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ). A cultura estoque, armazenada em meio de congelamento (glicerol – 15 mL; peptona bacteriológica – 0,5 g; extrato de levedura – 0,3 g; NaCl – 0,5 g; água destilada – 100 mL; pH entre 7,2 e 7,4), foi ativada pela transferência de alíquotas da cultura para caldo triptona de soja (Tryptone Soya Broth – TSB, Himedia®) e incubada a 37°C por 24 horas. Após ativação, transferiu-se 40 µL da cultura para 200 mL de TSB, e incubou-se a 37°C, sendo o crescimento acompanhado por leituras periódicas de absorbância, a 600nm e quantificação de células viáveis em ágar triptona de soja (Tryptone Soya Agar – TSA, Himedia®) com incubação a 37°C por 24 horas. A cultura foi padronizada em 10^8 UFC.mL⁻¹ na absorbância de 0,5 a 1,0 nm.

2.4 Determinação da Concentração Mínima Bactericida

A determinação da concentração mínima bactericida (CMB) foi realizada empregando-se o método de microdiluição em caldo utilizando-se microplacas de poliestireno com 96 poços (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI, 2003). Soluções com diferentes concentrações dos óleos essenciais foram preparadas em TSB adicionado de 0,5% de Tween 80 nas concentrações: 2,00%; 1,00%; 0,50%; 0,25%; 0,12%; 0,06%; e 0,03%. Após as alíquotas de 150 µL das diferentes soluções serem transferidas para as cavidades das microplacas, 10 µL de cultura padronizada foram inoculadas em cada cavidade. As microplacas foram vedadas e incubadas

a 37°C por 24 horas com posterior plaqueamento por microgota em TSA e incubação a 37°C por 24 horas.

O experimento foi conduzido em triplicata com três repetições para cada réplica, utilizando-se controle positivo (TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 e cultura) para cada repetição.

A pureza da cultura foi avaliada periodicamente por coloração de Gram e plaqueamento em ágar eosina azul de metileno (EMB) com incubação a 37°C por 24 horas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os dezesseis óleos estudados, nove apresentaram CMB superior a 2% (v/v) sobre ETEC, maior concentração avaliada, sendo eles *C. aurantifolia*, *C. nobilis*, *F. vulgare*, *I. verum*, *M. fragans*, *O. basilicum* (comercial e UFLA), *P. nigrum* e *R. officinalis* (Tabela 2).

O óleo essencial com maior atividade biocida sobre ETEC foi o de *C. cassia*, com CMB de 0,12%, seguido pelo óleo essencial de *T. vulgaris* com CMB de 0,25%. Já os óleos essenciais de *S. aromaticum* e *O. vulgare* comercial apresentaram CMB de 0,50% e os de *O. vulgare* e *C. citratus* extraídos na UFLA, apresentaram CMB de 1,0%.

Tabela 2. Concentração mínima bactericida (CMB) de óleos essenciais sobre a bactéria *Escherichia coli* enterotoxigênica *in vitro*.

Óleos essenciais	Concentração mínima bactericida (%) (v/v)
<i>Cinnamomum cassia</i> Nees ex Blume	0,12
<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle	> 2,00
<i>Citrus nobilis</i> Lour.	> 2,00
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.	1,00
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	> 2,00
<i>Illicium verum</i> Hook.	> 2,00
<i>Mentha piperita</i> L.	2,00
<i>Myristica fragans</i> Houtt.	> 2,00
<i>Ocimum basilicum</i> L.	> 2,00
<i>Ocimum basilicum</i> L. (UFLA)	> 2,00
<i>Origanum vulgare</i> L.	0,50
<i>Origanum vulgare</i> L. (UFLA)	1,00
<i>Piper nigrum</i> L.	> 2,00
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	> 2,00
<i>Syzygium aromaticum</i> Thumb.	0,50
<i>Thymus vulgaris</i> L.	0,25

Os dezesseis óleos essenciais avaliados apresentaram como constituintes principais, substâncias químicas da classe dos terpenos e seus derivados, bem como constituintes da classe dos fenilpropanoides. Os cinco constituintes de maior área relativa presentes nos óleos essenciais comerciais totalizaram teores de 74,37% a 99,44%. Já os cinco constituintes de maior área relativa dos três óleos obtidos na UFLA totalizaram 56,03%, 66,57% e 71,28%, respectivamente, para os óleos de *O. vulgare*, *C. citratus* e *O. basilicum* (Tabela 3).

Tabela 3. Composição química majoritária dos óleos essenciais avaliados nos ensaios de efeito bactericida *in vitro* contra ETEC.

Óleo essencial	Compostos majoritários (%)	Total (%)
<i>Cinnamomum cassia</i> Nees ex Blume	<i>E</i> -cinamaldeído (84,52±0,07); (<i>E</i>)- <i>o</i> -Metoxi-cinamaldeído (8,79±0,06); Acetato de <i>E</i> -cinamila (1,44±0,02); Cumarina (1,01±0,07); Benzaldeído (0,88±0,03).	96,64
<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle	Limoneno (58,30±0,36); γ -Terpineno (14,00±0,12); Pinenos: (α) (2,42±0,04), (β) (12,05±0,02); Sabineno (1,78±0,20); β -Bisaboleno (1,71±0,01).	90,26
<i>Citrus nobilis</i> Lour.	Limoneno (74,46±0,06); γ -Terpineno (15,35±0,02); α -Pinenos (2,07±0,21); <i>o</i> -Cimeno (1,91±0,16); β -Mirceno (1,73±0,09).	95,52
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf. (UFLA)	Geranial (43,77±0,06); Neral (31,61±0,38); β -Mirceno (14,63±0,17); <i>cis</i> -Geraniol (2,51±0,05); Isogeranial (2,05±0,23).	66,57
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	<i>E</i> -anetol (77,89±0,10); Fenchona (5,16±0,03); <i>D</i> -limoneno (4,66±0,02); α -Pinenos (4,07±0,07); α -Felandreno (2,17±0,08).	93,95

Tabela 3, continua

Óleo essencial	Compostos majoritários (%)	Total (%)
<i>Illicium verum</i> Hook.	<i>E</i> -anetol (87,69±0,09); Metil-chavicol (3,48±0,05); Linalol (1,30±0,42); <i>p</i> -Anisaldeído (1,24±0,03); Foeniculin (1,23±0,26).	94,94
<i>Mentha piperita</i> L.	Cis- α -Diidro-terpineol (34,88±0,03); Mentona (26,37±0,10); Isomentona (9,23±0,42); 1,8-Cineol (8,36±0,37); Acetato de mentol (5,23±0,02).	84,07
<i>Myristica fragans</i> Houtt.	Pinenos: (α) (18,47±0,08), (β) (12,94±0,04); Sabineno (16,54±0,04); Miristicina (15,10±0,08); Silvestreno (5,88±0,06); Terpinen-4-ol (5,44±0,07).	74,37
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Estragol (86,74±0,59); 1,8-Cineol (3,60±0,04); α -Bergamoteno (2,47±0,02); β - <i>o</i> -Cimeno (1,30±0,08); Linalol (0,89±0,31).	95,00
<i>Ocimum basilicum</i> L. (UFLA)	Linalol (31,51±0,04); 1,8-Cineol (21,12±0,08); Canfora (12,28±0,19); α -Bergamoteno (2,47±0,04); Eugenol (3,90±0,11).	71,28

Tabela 3, continua

Óleo essencial	Compostos majoritários (%)	Total (%)
<i>Origanum vulgare</i> L.	Carvacrol (73,11±0,20); <i>E</i> -cariofileno (4,32±0,04); γ -Terpineno (3,93±0,06); <i>p</i> -cimeno (3,92±0,04); Timol (2,97±0,03).	88,25
<i>Origanum vulgare</i> L. (UFLA)	γ -Terpineno (13,40±0,07); Hidrato de <i>trans</i> -sabineno (13,12±0,04); 4-Terpineol (10,86±0,37); Timol (10,56±0,02); <i>o</i> -Cimeno (8,09±0,23).	56,03
<i>Piper nigrum</i> L.	<i>E</i> -Cariofileno (25,49±0,39); Pinenos: (α) (12,09±0,28), (β) (11,44±0,16); Limoneno (13,88±0,08); Sabineno (11,22±0,07); 3-Careno (6,77±0,04).	80,89
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	1,8-Cineol (48,47±0,54); Pinenos: (α) (14,71±0,19), (β) (7,00±0,25); Canfora (14,03±0,13); Canfeno (3,41±0,08); Borneol (1,30±0,32).	88,92
<i>Syzygium aromaticum</i> Thumb.	Eugenol (80,67±0,04); Acetato de eugenila (11,92±0,01); <i>E</i> -cariofileno (5,51±0,03); α -Humuleno (0,68±0,08); Óxido de cariofileno (0,66±0,21).	99,44

Tabela 3, conclusão

Óleo essencial	Compostos majoritários (%)	Total (%)
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Timol (50,89±0,31); <i>p</i> -Cimeno (24,97±0,30); γ -Terpineno (5,91±0,05); Linalol (4,46±0,09); Carvacrol (2,93±0,20).	89,16

A atividade antimicrobiana exercida pelos óleos essenciais tem sido descrita para ampla variedade de microrganismos, tanto Gram-positivos quanto Gram-negativos, os quais respondem de forma distinta e dependente da composição química dos óleos (BOULANOUAR et al., 2013; BURT, 2004; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

A resistência de ETEC *in vitro* foi observada frente às diferentes doses dos óleos cítricos e dos de *R. officinalis* e *P. nigrum*, todos ricos em terpenos. Óleos ricos em fenilpropanoides como *I. verum*, *F. vulgare* e *O. basilicum* comercial também não apresentaram atividade inibitória do crescimento *in vitro* de ETEC. Por outro lado, os óleos de *C. cassia* e *S. aromaticum*, ricos em fenilpropanoides, e os óleos de *C. citratus*, *M. piperita*, *O. vulgare* comercial e *T. vulgaris*, ricos em terpenos, inibiram o crescimento de ETEC *in vitro*.

Não foram encontrados trabalhos de inibição de ETEC frente a óleos essenciais na literatura. Porém, estudos com outras cepas patogênicas de *E. coli* foram relatados, como os estudos de Oliveira et al. (2012), que observaram atividade inibitória de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) ao avaliarem os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Cymbopogon flexuosus*

(capim-limão da Índia Oriental) e *Cinnamomum cassia* (canela cássia) pelo mesmo método utilizado neste trabalho. A CBM determinada para estes óleos foram de 0,06% para óleo de *C. cassia* e 0,25% para os óleos de *M. alternifolia* e *C. flexuosus*.

Avaliando o efeito do carvacrol no controle de *E. coli* O157 inoculada em carcaça e retalhos de carne, McDonnell et al. (2012) verificaram que uma concentração de 30 mg/mL deste composto químico foi eficaz em reduzir o crescimento da bactéria. Santos et al. (2012) pesquisando a ação antibacteriana do óleo essencial de folhas de *Piper malacophyllum* (pariparoba) sobre *E. coli* ATCC 25922 pelo método de microdiluição em caldo, encontraram uma CMB de 3700 µg/mL.

Os óleos que apresentaram maior atividade contra ETEC, *C. cassia*, *T. vulgaris*, *S. aromaticum* e *O. vulgare* comercial, apresentaram como constituintes majoritários o *E*-cinamaldeído (84,52%), timol (50,89%), eugenol (80,67%) e carvacrol (73,11%), respectivamente. Estes resultados corroboram com os estudos de Holley e Patel (2005), que relataram que os óleos essenciais e seus constituintes, como eugenol, cinamaldeído, timol e carvacrol, foram eficazes contra muitos agentes patogênicos de origem alimentar, incluindo a *E. coli* O157: H7.

O cinamaldeído é um aldeído aromático, já bem conhecido como antimicrobiano natural de patógenos contaminantes de alimentos. Seu mecanismo de ação tem sido associado à formação de base de Schiff com proteínas de membrana pela reação com seu grupo carbonílico livre, o que provoca danos na membrana celular (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2011; WEI et al., 2011). Já o modo de ação de compostos fenólicos em bactérias patogênicas ainda não está bem estabelecido. Acredita-se que fenóis hidrofóbicos, como timol e carvacrol também possam agir por alterações na permeabilidade da membrana celular. No entanto, mais pesquisas são

necessárias para esclarecer os mecanismos de ação desses compostos (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2011).

Conforme Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008), a ação antimicrobiana apresentada pelos óleos essenciais não depende unicamente da composição química, mas também das propriedades lipofílicas, da solubilidade em água, da potência dos grupos funcionais e da mistura de compostos com diferentes propriedades bioquímicas. De acordo com alguns autores, há evidências de que alguns constituintes presentes em pequenas quantidades nos óleos essenciais, como γ -terpineno e *p*-cimeno, interferem na atividade antimicrobiana dos óleos facilitando a permeabilidade do carvacrol e timol na célula bacteriana (ROMERO et al., 2009; SILVA et al., 2010), o que nesse caso explicaria a atividade bactericida dos óleos de *O. vulgare* comercial e *T. vulgaris* sobre ETEC.

Comparando a composição química dos óleos essenciais de orégano e de manjeriço comercial e da UFLA, observaram-se marcantes diferenças qualitativas (Tabela 3). O óleo de manjeriço oriundo da UFLA apresentou elevados teores de linalol (31,51%), 1,8-cineol (21,12%) e canfora (12,28%), enquanto o óleo comercial apresentou elevado teor de estragol (86,74%). O óleo de orégano comercial, que apresentou atividade inibitória de ETEC em 50% a mais que o óleo extraído na UFLA, apresentou como constituintes majoritários o carvacrol (73,11%), o β -cariofileno (4,32%), o γ -terpineno (3,93%), o *p*-cimeno (3,92%) e o timol (2,97%), enquanto que o γ -terpineno (13,40%), o hidrato-de-trans-sabineno (13,12%), o 4-terpineol (10,86%), o timol (10,56%) e o *o*-cimeno (8,09%) foram os constituintes majoritários do óleo extraído na UFLA. Esta diferença de inibição pode ter ocorrido devido a vários fatores, como a origem geográfica das plantas, variações de temperatura às quais as plantas foram expostas durante seu crescimento, estação do ano em que ocorreu a coleta das plantas e o método de extração do óleo essencial, fatores que podem interferir na

composição química dos óleos voláteis (BURT, 2004; CELIKTAS et al., 2007), o que remete à importância de se relacionar a composição química com a atividade biológica dos óleos essenciais.

Embora a atividade antibacteriana dos óleos essenciais utilizados neste trabalho seja bem conhecida, estes ainda não haviam sido avaliados contra a cepa ETEC. Os resultados mostraram diferentes níveis de sensibilidade desta cepa de *Escherichia coli* frente aos óleos essenciais. Estudos futuros podem ser realizados objetivando correlacionar a atividade anti-ETEC com a composição química dos óleos essenciais, visto que diversos fatores podem interferir no crescimento e desenvolvimento bacteriano.

4 CONCLUSÃO

Escherichia coli enterotoxigênica apresenta diferentes níveis de sensibilidade frente à faixa de concentração de 0,03% a 2,00% dos dezesseis óleos essenciais estudados. A atividade anti-ETEC também depende da composição química do óleo essencial. Os óleos de *C. cassia* e *T. vulgaris* foram os mais eficazes na inibição do crescimento *in vitro* de ETEC, o que indica potencialidades na conservação microbiológica de alimentos.

5 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Illinois: Allured, 2007. 803 p.

BOULANOUAR, B. et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, London, v. 46, p. 85-96, Apr. 2013.

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

CEBALLOS, B. S. O.; KONIG, A. **Análise de água de mananciais e residuária: aspectos hidro e microbiológicos**. Fortaleza: Escola Técnica Federal do Ceará, 1997.

CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, Oxford, v. 1, n. 100, p. 553-559, Feb. 2007.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico: norma aprovada**. 6. ed. Pensilvania, 2003. 23 p.

DOOL, H. van den; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, p. 463-471, 1963.

FERREIRA, A. et al. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 108, n. 1, p. 31-37, 2006.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. et al. Natural antimicrobial compounds to preserve quality and assure safety of fresh horticultural produce. In: RAI, M.; CHIKINDAS, M. (Ed.). **Natural antimicrobials in food safety and quality**. Cambridge: CABI International, 2011. p. 277-282.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 91-97, May 2008.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 4, p. 273-292, Aug. 2005.

LIMA, C. P. S. et al. Presença de microrganismos indicadores de qualidade em farinha e goma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista de APS**, Juiz de Fora, v. 10, n. 1, p. 14-19, 2007.

MCDONNELL, M. J. et al. Evaluation of carvacrol for the control of *Escherichia coli* O157 on cattle hide and carcass cuts. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 9, n. 11, p. 1049-1052, 2012.

MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 52, n. 303, p. 921-938, 2005.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH mass spectral library**. Gaithersburg, 2008. Software.

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

OKPEKON, T. et al. Antiparasitic activities of medicinal plants used in ivory coast. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 90, n. 1, p. 91-97, 2004.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. **Food and Bioproducts Processing**, Davis, v. 90, n. 4, p. 809-818, Oct. 2012.

ROMERO, A. L. et al. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 11, n. 4, p. 15-18, 2009.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.

SANTOS, T. G. et al. Composição química e avaliação e da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC)**: manual das doenças transmitidas por alimentos. São Paulo, 2002. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/ecoli_enterotoxi.pdf>. Acesso em: 16 set. 2014.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 136-141, 2010.

SILVA, M. L. Q. et al. Avaliação higiênico-sanitária dos restaurantes self-services e restaurantes populares da cidade de Juazeiro do Norte (CE) quanto a prevalência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, Juazeiro do Norte, ano 2, v. 2, p. 7-12, jun. 2014. Número especial.

SOKMEN, S. et al. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 8, p. 627-634, 2004.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 23, n. 2, p. 1-6, Apr. 2012.

TIWARI, B. K. et al. Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 14, p. 5987-6000, June 2009.

WEI, Y. et al. Mechanism of *Vibrio cholerae* autoinducer-1 biosynthesis. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 6, n. 4, p. 356-365, Jan. 2011.

ARTIGO 2: POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE COMBINAÇÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA NA CONSERVAÇÃO DE CARNE MOÍDA

RESUMO

Avaliou-se a atividade antibacteriana de combinações de óleos essenciais de canela (*Cinnamomum cassia* Nees ex Blume), cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* Thumb.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho branco (*Thymus vulgaris* L.) sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), um patógeno de origem alimentar que causa séria gastroenterite, conhecida como “diarreia dos viajantes”. A atividade antibacteriana *in vitro*, realizada com combinações de óleos essenciais, foi avaliada pelo método de microdiluição em TSB e plaqueamento por microgota em TSA. A atividade antibacteriana *in situ* foi avaliada em carne moída inoculada com ETEC acondicionada em sacos plásticos estéreis e estocadas a 7°C por cinco dias, utilizando-se as duas combinações de óleos que foram efetivas na inibição do crescimento *in vitro* de ETEC e envolviam as menores porcentagens de óleos essenciais. Foram analisados o pH inicial e a cor da carne durante o período de estocagem. Nas análises por CG-EM dos tratamentos, observou-se em ambos os tratamentos a presença majoritária do composto carvacrol, e de outros monoterpenos como o timol, *p*-cimeno e γ -terpineno. O pH inicial da carne foi de 5,74. As duas combinações de óleos essenciais testadas apresentaram ação bactericida frente à ETEC *in situ*, com redução significativa de 1 LogUFC/g em relação ao controle. Visualmente, os tratamentos testados não comprometeram a coloração da carne moída, de forma semelhante, as análises colorimétricas indicaram variação significativa nos valores de média dos parâmetros L*, a*, b*, C* e h*. A utilização das combinações de óleos essenciais promoveram alterações benéficas na cor da carne moída, apresentaram efeitos sinérgicos suficientes para inibir ETEC em estudo *in vitro* e este resultado se repetiu, embora de forma reduzida, quando estas combinações foram adicionadas em carne moída.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, doenças transmitidas por alimentos, carne, patógeno alimentar, antimicrobianos naturais.

ABSTRACT

Was evaluated the antibacterial activity of essential oils of combinations of cinnamon (*Cinnamomum cassia* Nees ex Blume), cloves (*Syzygium aromaticum* Thumb.), Oregano (*Origanum vulgare* L.) and white thyme (*Thymus vulgaris*

L.) against Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), a pathogen of foodborne, cause serious gastroenteritis known as traveler's diarrhea. The in vitro antibacterial activity, carried out with combinations of essential oils was evaluated by microdilution method in TSB and plating by microdrop in TSA. The in situ antibacterial activity was evaluated in ground beef inoculated with ETEC packed in sterile plastic bags and stored at 7 ° C for five days, using the two combinations of oils were effective in inhibition in vitro growth of ETEC and involved minor percentages of essential oils. The initial pH and meat color during days of the experiment were analyzed. In the analyzes by GC-MS of the treatments was observed in both the majority presence of the compound carvacrol, and other monoterpenes such as thymol, *p*-cymene and γ -terpinene. The initial pH of meat was 5.74. The two combinations tested of essential oils showed bactericide action to ETEC in situ, with significant reduction of 1 log CFU / g in relation to control. Visually, the tested treatments didn't compromise the color of the ground beef, similarly, the colorimetric analyzes indicated significant variation in the values of average of parameters of L *, a *, b *, C *and h*. The use of combinations of essential oils promoted beneficial changes in the color of ground beef, show sufficient synergistic effects to inhibit ETEC in in vitro study and this result was repeated, although smaller form, when these combinations were added to ground beef.

Keywords: *Escherichia coli*, foodborne diseases, meat, food pathogen, natural antimicrobial.

1 INTRODUÇÃO

A carne é um dos alimentos de origem animal mais consumidos no mundo, sendo importante fonte de proteínas, vitaminas do complexo B e minerais de alta biodisponibilidade. Segundo Andrighetto et al. (2014), a carne bovina é a mais consumida do total de carnes da alimentação da população brasileira, com 51,90% do consumo. Dentre os produtos cárneos, a carne moída se destaca por sua aceitabilidade e por se caracterizar como produto popular, visto que pode ser utilizada nas refeições de maneira prática e diversificada. De maneira geral, apresenta composição química abundante em nutrientes, atividade de água e pH ideais ao crescimento de microrganismos (BAPTISTA et al.,

2013). Devido ao excesso de manipulação, a carne moída está sujeita tanto à contaminação por bactérias deteriorantes quanto por patogênicas.

Dentre as bactérias patogênicas causadoras de toxinfecções alimentares que podem estar presentes na carne e seus derivados, incluem-se diversas cepas de *Escherichia coli* (DAMER et al., 2014; FORSYTHE, 2005; JAY, 2005; SILVA et al., 2005). Esta bactéria é considerada uma das principais representantes do grupo das enterobactérias e faz parte do grupo dos coliformes termotolerantes (SANTURIO, 2011), os quais são preocupação constante das indústrias de alimentos, consumidores e órgãos responsáveis pela saúde pública.

A espécie *E. coli* inclui tanto cepas patogênicas quanto comensais. A cepa de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é o principal agente etiológico causador da diarreia-dos-viajantes, podendo ser acompanhada de cólicas, náuseas, vômitos e hipertermia leve (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). A patogenicidade das linhagens de ETEC é resultante da produção de enterotoxinas termolábeis e termoestáveis e fatores de colonização (COHEN; GIANNELLA, 1995).

Uma alternativa na conservação de alimentos que vem sendo bastante estudada nos últimos anos é o uso de óleos essenciais, formados por diversas espécies vegetais e oriundos do metabolismo secundário (BAKKALI et al., 2008). São misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (DE LA ROSA; ALVAREZ-PARRILLA; GONZALEZ-AGUILAR, 2010). Em diversas pesquisas constatou-se a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (HOFERL; BUCHBAUER; JIROVETZ, 2009; OLIVEIRA; SOARES; PICCOLI, 2013; POIANA et al., 2008; SANTURIO et al., 2011).

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito antimicrobiano de combinações dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Cinnamomum cassia* e *Origanum vulgare* L., e de *T. vulgaris*, *Syzygium aromaticum* e *O. vulgare* frente à *Escherichia coli* enterotoxigênica

inoculada em carne moída bovina refrigerada e suas interferências sobre a cor da carne durante os dias de armazenamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios de Fitoquímica do Departamento de Agricultura (DAG) e de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da UFLA.

2.1 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados foram adquiridos comercialmente da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda. Empregaram-se os óleos essenciais de folhas e cascas de *Cinnamomum cassia* Nees ex Blume (canela), botões florais de *Syzygium aromaticum* Thumb. (cravo da Índia), folhas de *Origanum vulgare* L. (orégano) e folhas e flores de *Thymus vulgaris* L. (tomilho). Estes óleos foram escolhidos com base nos melhores resultados observados para concentração mínima inibitória *in vitro* sobre ETEC em estudo anterior.

2.2 Microrganismo, manutenção, padronização e obtenção do inóculo

O microrganismo utilizado foi *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) cedida pelo Laboratório de Enterobactérias (LABENT) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ). A cultura estoque, armazenada em meio de congelamento (glicerol – 15 mL; peptona bacteriológica – 0,5 g; extrato de levedura – 0,3 g; NaCl – 0,5 g; água destilada – 100 mL; pH entre 7,2 e 7,4), foi ativada pela transferência de alíquotas da cultura para caldo tripton de soja

(Tryptone Soya Broth – TSB, Himedia®) e incubada a 37°C por 24 horas. Após ativação, transferiu-se 40 µL da cultura para 200 mL de TSB, e incubou-se a 37°C, sendo o crescimento acompanhado por leituras periódicas de absorbância, a 600nm e quantificação de células viáveis (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005) em ágar triptona de soja (Tryptone Soya Agar – TSA, Himedia®) com incubação a 37°C por 24 horas. A cultura foi padronizada em 10^8 UFC.mL⁻¹.

2.3 Ação bactericida *in vitro* das combinações de óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica

Foram avaliadas as atividades antimicrobianas de diferentes combinações dos óleos essenciais de canela, cravo da Índia, orégano e tomilho sobre ETEC.

Os óleos essenciais combinados, três a três, foram avaliados em diferentes proporções (Tabela 1), expressas em porcentagem relativa à concentração mínima bactericida (CMB) de 0,12% do óleo de canela, 0,25% do óleo de tomilho e de 0,50% dos óleos de cravo da Índia e orégano.

Tabela 1. Proporções utilizadas para o preparo das combinações dos óleos essenciais para avaliação da atividade bactericida *in vitro* sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica.

Proporções*	Combinações dos óleos essenciais ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	T: Ca: O (%)	T: Cr: O (%)
100:0:0	0,25: 0: 0	0,25: 0: 0
0:100:0	0: 0,12: 0	0: 0,50: 0
0:0:100	0: 0: 0,50	0: 0: 0,50
50:50:0	0,12: 0,06: 0	0,12: 0,25: 0
50:0:50	0,12: 0: 0,25	0,12: 0: 0,25
0:50:50	0: 0,06: 0,25	0: 0,25: 0,25
67:17:17	0,16: 0,02: 0,08	0,16: 0,08: 0,08
17:67:17	0,04: 0,08: 0,08	0,04: 0,33: 0,08
17:17:67	0,04: 0,02: 0,33	0,04: 0,08: 0,33
33:33:33	0,08: 0,03: 0,16	0,08: 0,16: 0,16

*Porcentagem relativa à concentração mínima bactericida (CMB) de 0,12% do óleo de canela, 0,25% do óleo de tomilho e de 0,50% dos óleos de cravo da Índia e orégano. **T:Ca:O** –Tomilho:Canela:Orégano; **T:Cr:O** –Tomilho:Cravo da Índia:Orégano.

Na determinação da CMB das combinações de óleos essenciais, empregou-se o método da microdiluição em caldo utilizando-se microplacas de poliestireno com 96 poços (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI, 2003). As combinações de óleos foram preparadas em TSB adicionado de 0,5% de Tween 80 nas proporções apresentadas na Tabela 1. A seguir, 150 μL das soluções preparadas foram adicionadas aos poços das microplacas e acrescidos de 10 μL da cultura padronizada. As microplacas foram vedadas e incubadas em B.O.D. a 37°C por 24 horas com posterior plaqueamento por microgota em TSA, seguido de incubação a 37°C por 24 horas.

O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições, utilizando-se controles positivos (TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 e cultura) para cada repetição.

2.4 Ação bactericida das combinações de óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica inoculada em carne moída

De acordo com a maior atividade bactericida in vitro das combinações dos óleos essenciais, foram selecionadas as duas combinações que apresentaram melhor ação bactericida com menores concentrações de óleos essenciais, sendo descritos na Tabela 2. As soluções de óleos essenciais foram preparadas em glicerol, partindo de soluções a 1% de cada óleo devido às baixas quantidades necessárias dos óleos.

Tabela 2. Concentrações dos óleos essenciais utilizados na elaboração de dois conservantes para controle de ETEC em carne moída bovina

Tratamento	Óleo essencial (%)				Total
	Canela	Cravo da Índia	Orégano	Tomilho	
Conservante 1	0,03	0	0,16	0,08	0,27
Conservante 2	0	0,08	0,33	0,04	0,45

O corte bovino empregado para o processamento da carne moída foi o acém, adquirido em estabelecimento comercial da cidade de Lavras, MG, em condições de refrigeração. Após desinfecção da superfície da embalagem com álcool 70%, a peça foi aberta e retirado cerca de 1 cm de toda superfície da peça, que foi descartada, utilizando-se apenas a parte interna. De forma asséptica, a

carne foi cortada em pedaços de, aproximadamente, 16 cm² e triturada em multiprocessador previamente lavado e sanitizado com álcool 70%.

Porções de 25 g de carne moída foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e 2,5 mL de conservante foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas em homogeneizador tipo Stomacher (490 GPM), durante 3 minutos. Após homogeneização, as porções foram inoculadas com 25 µL de cultura padronizada de ETEC (5 LogUFC/g), os sacos plásticos foram selados e novamente homogeneizados. Foram preparados dois controles, um constituído de carne moída para controle negativo, e outro com carne moída e inóculo, para o controle positivo.

Os tratamentos foram armazenados, a 7 °C, por 5 dias, sendo retiradas amostras para análise, após 6 horas, no 1º, 3º e no 5º dia de armazenamento. O experimento foi realizado em triplicata e foram feitas três repetições.

2.5 Quantificação de *Escherichia coli* enterotoxigênica em carne moída

A quantificação de ETEC em carne moída durante o período de estocagem das amostras foi realizada acrescentando-se 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v) aos sacos plásticos contendo as porções de carne moída, seguido por homogeneização em Stomacher por 3 minutos a 490 GPM. A seguir, foram preparadas diluições decimais em água peptonada 0,1% (p/v). Alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas foram inoculadas na superfície de ágar seletivo e diferencial Hecktoen Enteric (Himedia®), e incubadas a 37°C por 24 horas e as colônias típicas foram quantificadas.

2.6 Análise química das combinações de óleos essenciais

As análises químicas dos óleos voláteis foram realizadas em sistema de Cromatografia de Fase Gasosa empregando-se um Cromatógrafo Agilent® 7890A, operado com sistema de processamento de dados HP GC ChemStation Ver. A.01.14, equipado com injetor/amostrador automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) e um Detector de Ionização em Chama (DIC). Uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 250 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA) foi usada para a separação com um intervalo de aquecimento de 60°C a 200°C, empregando-se uma rampa de temperatura de 3°C.min⁻¹, seguido de uma rampa de 10 °C.min⁻¹ até 270°C, mantendo-se em condição isotérmica por 1 minuto. As amostras foram preparadas na mesma diluição do ensaio *in situ*, porém, em acetato de etila. O volume de injeção foi de 1,0 µL, no modo *split* a uma razão de injeção de 50:1. Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240°C. Os óleos combinados foram analisados em triplicata e as concentrações dos constituintes foram expressas pela média das porcentagens de área relativa dos picos cromatográficos ± o desvio padrão. Os resultados analíticos foram apresentados apenas para os dez constituintes de maior área relativa.

As análises qualitativas foram realizadas em Cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC.

Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007).

2.7 Análises físico-químicas da carne

2.7.1 pH

As leituras de pH foram realizadas na peça de acém antes de ser moída com o auxílio de um potenciômetro portátil (Digimed®, modelo DM 20) equipado com eletrodo de penetração com resolução de 0,01 unidades de pH. O eletrodo de vidro e o potenciômetro foram calibrados com solução tampão de pH 4,00 (HCl 0,1M) e pH 7,00 (NaOH 0,1M). Para a introdução do eletrodo no interior da carne foram feitas perfurações com auxílio de uma faca de corte. Foram realizadas três leituras por peça, totalizando nove leituras. O resultado foi expresso pela média \pm o desvio padrão de todas as leituras.

2.7.2 Cor

A determinação objetiva da cor final da carne moída foi realizada com o uso de um colorímetro espectrofotométrico portátil Konica Minolta® modelo CM-600D. Para o cálculo dos índices de cor, foi estabelecido o ângulo do observador de 10°, iluminante D65 e o sistema de cor CIELAB.

Os índices de cor L^* , a^* e b^* foram obtidos considerando-se o valor médio de três leituras realizadas em diferentes pontos de carne moída de, aproximadamente, dois milímetros de espessura. Os índices de saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (h^*) foram calculados pelas seguintes fórmulas (RAMOS; GOMIDE, 2007):

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$
$$h^* = \tan^{-1} (b^*/a^*)$$

Na análise da cor, o parâmetro L^* representa a luminosidade, que caracteriza o grau de claridade da cor, variando do preto ao branco, indo de 0 (escuro) a 100 (claro); o parâmetro a^* representa a variação da intensidade da cor do verde ao vermelho, valores positivos de a^* , de 0 a +50, representam a cor vermelha da amostra, enquanto valores negativos de a^* , de 0 a -50 representam coloração verde do produto; o parâmetro b^* ou índice de amarelo representa tonalidades que vão do azul (valores negativos) ao amarelo (valores positivos); o índice de saturação (C^*) corresponde à intensidade ou quantidade de uma tonalidade, indicando o nível de mistura com o branco, preto ou cinza; e o ângulo de tonalidade (h^*) é representado como a grandeza que caracteriza a qualidade da cor (vermelho, verde, amarelo e azul), permitindo diferenciá-la (RAMOS; GOMIDE, 2007).

2.8 Análises estatísticas

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foram realizadas análises de regressão no tempo para cada tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi estabelecida pelo teste Scott Knott, a 5% de

significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software STATISTICA versão 5.0, da STATSOFT. Todos os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antibacteriana *in vitro* e *in situ* das combinações dos óleos essenciais de *C. cassia*, *S. aromaticum*, *O. vulgare* L. e *T. vulgaris* não foram relatadas na literatura para ETEC.

A ação antimicrobiana das combinações de óleos testadas *in vitro* em diferentes proporções sobre ETEC estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana *in vitro* das combinações dos óleos essenciais em diferentes proporções sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica

Proporções em relação a CMI (%)*	Combinações dos óleos essenciais	
	T:Ca:O	T:Cr:O
100:0:0	-	-
0:100:0	-	-
0:0:100	-	-
50:50:0	-	+
50:0:50	-	-
0:50:50	-	+
67:17:17	+	+
17:67:17	+	+
17:17:67	+	-
33:33:33	-	+

*Porcentagem relativa à concentração mínima inibitória (CMI) de 0,12% para o óleo de canela, 0,25% para o óleo de tomilho e de 0,50% para os óleos de cravo da Índia e orégano. **T:Ca:O** - Tomilho:Canela:Orégano; **T:Cr:O** - Tomilho:Cravo da Índia: Orégano. (-) Inibição do crescimento. (+) Crescimento.

A partir deste resultado, foram selecionadas, para os estudos *in situ*, as combinações que reuniram as tríades que utilizaram as menores porcentagens de óleos essenciais e foram efetivas na inibição do crescimento *in vitro* de ETEC. Esta escolha, das menores concentrações, foi realizada por ser amplamente documentado na literatura atual que a aplicação de óleo essencial em concentrações elevadas pode promover alterações sensoriais indesejáveis na carne (GOVARIS et al., 2010; HAYOUNI et al., 2008). Sendo assim, foram selecionadas as combinações dos óleos de tomilho/canela/orégano e de tomilho/cravo-da-índia/orégano, nas proporções de 33:33:33 e 17:17:67, respectivamente, para a análise em carne moída.

O efeito das combinações de óleos essenciais sobre ETEC em carne moída podem ser observados no Gráfico 1.

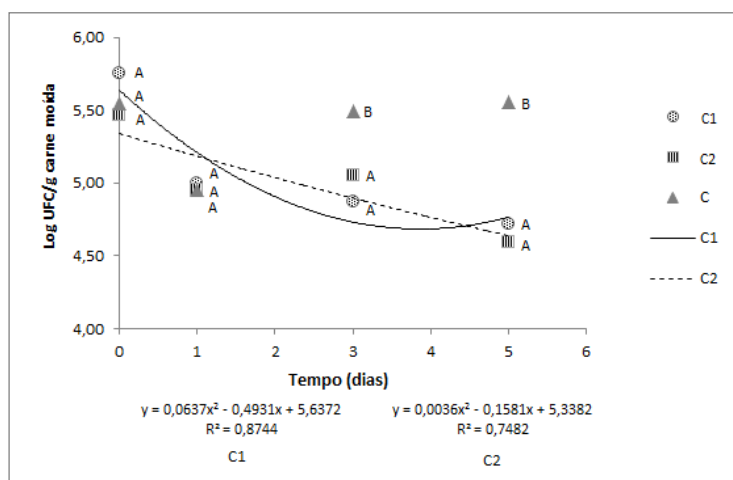


Gráfico 1. Efeito das combinações de óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica em carne moída bovina durante armazenamento à temperatura de 7°C por cinco dias. C1 = tomilho (0,08%), canela (0,03%) e orégano (0,16%); C2 = tomilho (0,04%), cravo da Índia (0,08%) e orégano (0,33%); C = controle (0% de óleo). Letras iguais no tempo não diferem entre si.

Observou-se que os tratamentos apresentaram ação bactericida significativa ($p < 0,05$) sobre ETEC em relação ao controle positivo (carne moída com inóculo e sem adição de óleos). Isso indica que, apesar de as combinações de óleos essenciais não terem sido eficientes em eliminar 100% das células viáveis de ETEC, estas foram capazes de reduzir de 5,54 LogUFC/g para 4,66 LogUFC/g. Este valor se encontra abaixo da dose infectante de cepas patogênicas de *E. coli*, que varia de 6,0 a 10,9 LogUFC/g, de acordo com Baptista e Venâncio (2003).

A redução do potencial antibacteriano das combinações de óleos essenciais *in situ* ocorreu devido a fatores relacionados à composição da carne moída. Em geral, pesquisas mostram que alimentos com teores de gordura mais elevados necessitam de maiores concentrações de óleos essenciais para que sua atividade antimicrobiana seja efetiva, uma vez que seja possível que os óleos migrem para as porções hidrofóbicas do alimento, contudo, é conhecido que proteínas da carne exercem efeito protetor sobre os microrganismos diminuindo a eficiência dos óleos essenciais (GILL et al., 2002; TSERENNADMID et al., 2010).

Nas amostras de controle positivo (com inóculo e sem adição de óleo essencial) observou-se crescimento constante de ETEC (5,55 LogUFC/g a 5,56 LogUFC/g). Isto indica que a temperatura de 7°C foi apenas fator limitante do crescimento da bactéria e não bactericida, visto que o crescimento de *E. coli* varia de 7°C a 46°C, sendo 37°C sua temperatura ótima de crescimento (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003). Enquanto que nas amostras de controle negativo (sem inóculo e sem adição de óleo essencial) não houve crescimento de ETEC, comprovando a inexistência deste microrganismo na carne utilizada.

As análises por CG-EM das combinações dos óleos essenciais identificaram 21 e 24 constituintes, referentes às combinações dos óleos de orégano/canela/tomilho e orégano/cravo da Índia/tomilho, respectivamente. Na

Tabela 4 estão descritos os dez constituintes de maior área relativa da análise das combinações, que representaram 93,61% e 93,55% da composição química total. Ambas as combinações de óleos foram constituídas principalmente por monoterpenos, mais de 76% da composição química total. Essa classe de constituintes químicos apresentaram diversos relatos de atividade antimicrobiana na literatura (ROMERO et al., 2013; SANTOS et al., 2011; SOUZA et al., 2011).

Observou-se em ambos os tratamentos a presença majoritária de carvacrol, constituinte do óleo essencial de *O. vulgare* (73,11%), analisado em estudo anterior (Artigo 1). Este resultado coincide com o estudo de McDonnell et al. (2012), que comprovaram que o carvacrol em concentrações de 30 mg/mL reduziu *E. coli* O157 inoculada em carcaça e retalhos de carne. Outros autores verificaram que por contato gasoso, o carvacrol demonstrou resultados promissores na modulação da atividade de antibióticos contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (FREITAS et al., 2013).

A ação inibitória do crescimento de ETEC em carne moída tratadas com as combinações de tomilho/canela/orégano e de tomilho/cravo da Índia/orégano podem estar relacionadas à ação sinérgica de carvacrol e timol. Porém, Chorianopoulos et al. (2004) relataram em seus estudos que a atividade antimicrobiana não se deve somente à presença de carvacrol e timol, mas que a presença de outros componentes, mesmo que em baixas concentrações, pode provocar interações sinérgicas, aditivas ou antagônicas. Baydar et al. (2004) testando óleos essenciais com diferentes concentrações de timol e carvacrol verificaram que o óleo com menor porcentagem dos dois compostos apresentou uma ação antimicrobiana mais efetiva por causa da presença de *p*-cimeno e γ -terpineno, afirmando o efeito sinérgico dos quatro constituintes (ROMERO et al., 2009; SILVA et al., 2010). De forma semelhante, na análise das

combinações de óleos verificou-se a presença de carvacrol, timol, *p*-cimeno e γ -terpineno nos dois tratamentos.

Tabela 4. Constituintes químicos majoritários das combinações de óleos essenciais utilizadas nos ensaios de inibição do crescimento de *Escherichia coli* enterotoxigênica *in situ*.

Combinação/ Proporção	Constituintes principais (%)
Tomilho:canela:orégano 0,08%:0,03%:0,16%	Carvacrol (46,23±0,04); Timol (16,86±0,31); <i>p</i> -cimeno (10,61±0,02); <i>E</i> -cinamaldeído (9,15±0,09); Linalol (3,03±0,21); γ -terpineno (2,75±0,58); <i>E</i> -cariofileno (2,10±0,33); Borneol (1,02±0,07); Canfora (0,98±0,14); 1,8-cineol (0,88±0,03). Monoterpenos totais: 82,36%. Sesquiterpenos totais: 2,10%. Fenilpropanoides totais: 9,15%. Total de constituintes identificados: 93,61%
Tomilho:cravo da Índia:orégano 0,04%:0,08%:0,33%	Carvacrol (56,99±0,08); Eugenol (12,72±0,61); Timol (6,73±0,26); <i>p</i> -cimeno (6,18±0,04); <i>E</i> -cariofileno (3,29±0,42); Linalol (2,30±0,12); γ -terpineno (2,03±0,06); Acetato de eugenol (1,42±0,20); β -pineno (1,01±0,04); Borneol (0,88±0,06). Monoterpenos totais: 76,12%. Sesquiterpenos totais: 3,29%. Fenilpropanoides totais: 14,14%. Total de constituintes identificados: 93,55%

O pH médio da carne utilizada no experimento foi de $5,74 \pm 0,02$, valor dentro dos padrões de normalidade, visto que valores de pH acima de 6,0 indicam alto risco de contaminação microbológica (LUDTKE et al., 2012).

Em relação à cor, observou-se que os tratamentos testados não comprometeram a coloração da carne moída e, visualmente, manteve a carne com boa aparência, durante os cinco dias de estocagem. De forma semelhante, as análises feitas em colorímetro indicaram variação significativa ($p < 0,05$) nos valores de média de L^* , a^* , b^* , C^* e h^* da cor da carne tratada com as combinações de óleos essenciais (Figura 1). Este resultado é interessante, visto que a cor é a primeira característica sensorial apreciada pelo consumidor, e sua recusa ou aceitação determinam que a carne seja escolhida com mais ou menos agrado (ORDÓNEZ, 2005).

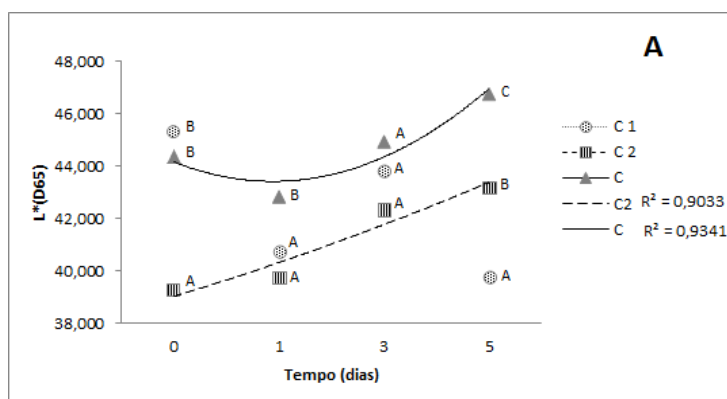


Figura 1. Variação da cor objetiva das porções de carne moída contendo combinações de óleos essenciais durante cinco dias de estocagem a 7°C. C1 = tomilho/canela/orégano (0,08%;0,03%;0,16%). C2 = tomilho/cravo da Índia/orégano (0,04%;0,08%;0,33%). C = controle negativo (carne com inóculo e sem adição de óleos). A = Índice de luminosidade (L^*); B = Índice de vermelho (a^*); C = Índice de amarelo (b^*); D = Índice de saturação (C^*); E = Ângulo de tonalidade. Letras iguais no tempo não diferem entre si. (continua...)

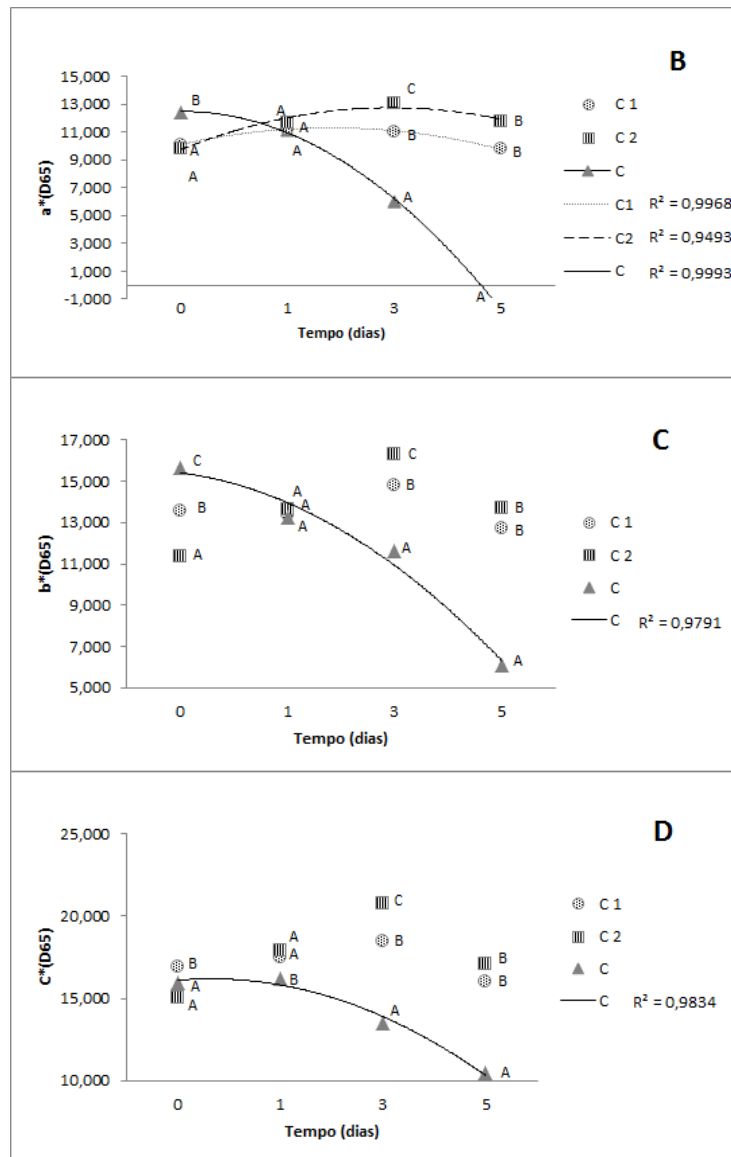


Figura 1. Variação da cor objetiva das porções de carne moída contendo combinações de óleos essenciais durante cinco dias de estocagem a 7°C. C1 = tomilho/canela/orégano (0,08%;0,03%;0,16%). C2 = tomilho/cravo da Índia/orégano (0,04%;0,08%;0,33%). C = controle negativo (carne com inóculo e sem adição de óleos). A = Índice de luminosidade (L^*); B = Índice de vermelho (a^*); C = Índice de amarelo (b^*); D = Índice de saturação (C^*); E = Ângulo de tonalidade. Letras iguais no tempo não diferem entre si. (continua...)

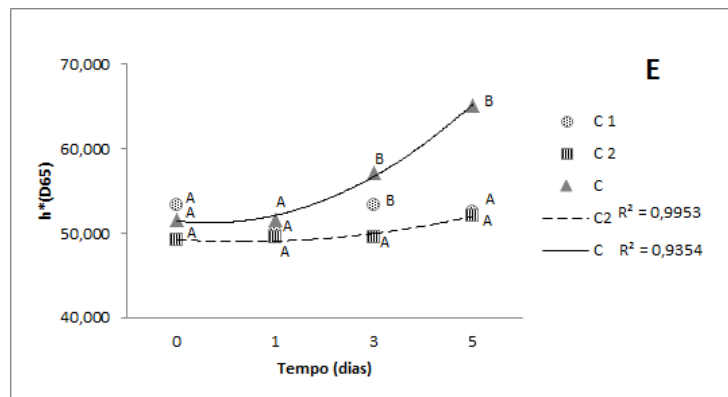


Figura 1. Variação da cor objetiva das porções de carne moída contendo combinações de óleos essenciais durante cinco dias de estocagem a 7°C. C1 = tomilho/canela/orégano (0,08%;0,03%;0,16%). C2 = tomilho/cravo da Índia/orégano (0,04%;0,08%;0,33%). C = controle negativo (carne com inóculo e sem adição de óleos). A = Índice de luminosidade (L*); B = Índice de vermelho (a*); C = Índice de amarelo (b*); D = Índice de saturação (C*); E = Ângulo de tonalidade. Letras iguais no tempo não diferem entre si.

Observaram-se variações significativas nos parâmetros de cor L*, a*, b* e C* nos tratamentos e no controle durante os dias de análises. A combinação de tomilho/canela/orégano apresentou redução apenas do parâmetro L*, indicando que a carne escureceu no decorrer dos cinco dias. A combinação de tomilho/cravo da Índia/orégano apresentou aumento da luminosidade (L*) e dos índices de vermelho (a*), amarelo (b*) e saturação (C*), no 5º dia a carne estava com aparência melhor do que no início do experimento. Já o controle positivo, que não continha óleo essencial, apresentou diferença positiva apenas quanto à luminosidade (L*), apresentando redução de todos os outros parâmetros e aparência marrom-esverdeada, típico de carne em estado de decomposição.

Verificou-se que as combinações de óleos essenciais sozinhas não podem proporcionar uma proteção totalmente eficiente contra ETEC em carne

moída. Novos estudos devem ser feitos para analisar a utilização destas e outras combinações em conjunto com técnicas de conservação, tais como temperaturas baixas de refrigeração, para aumentar a "barreira" bacteriana e desenvolver uma alternativa aos métodos atuais de conservação.

4 CONCLUSÃO

As combinações de óleos essenciais apresentaram efeitos sinérgicos suficientes para impedir o crescimento de *Escherichia coli* enterotoxigênica em estudo *in vitro* e, quando elas foram adicionadas em carne moída, este efeito se manteve, embora tenha sido reduzido. A utilização de combinações de óleos essenciais promoveu a conservação da cor da carne moída. Dessa forma, novos estudos são necessários para averiguar se estas e outras combinações de óleos essenciais seriam potentes e eficazes, na conservação de alimentos, como a carne moída, em impedir em 100% o crescimento desta bactéria.

5 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Illinois: Allured, 2007. 812 p.

ANDRIGHETTO, C. et al. Consumo de carne bovina na comunidade acadêmica da UNESP - Dracena. **Revista Ciência em Extensão**, Assis, v. 10, n. 3, p. 133-142, 2014.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. **Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos**. Lisboa: Forvisão, 2003. 109 p.

BAPTISTA, R. I. A. A. et al. Aspectos qualitativos da carne moída comercializada na região metropolitana do Recife-PE. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 7, n. 1, p. 38-47, 2013.

BAYDAR, H. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 3, p. 169-172, 2004.

CHORIANOPOULOS, N. et al. Essential oils of *satureja*, *origanum*, and *thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 26, p. 8261-8267, 2004.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico**: norma aprovada. 6. ed. Pensilvania, 2003. 23 p.

COHEN, M. B.; GIANNELA, R. A. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: BLASER, M. J. et al. (Ed.). **Infection of gastrointestinal tract**. New York: Raven, 1995. p. 691-707.

DAMER, J. R. S. et al. Contaminação de carne bovina moída por *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. **Revista Contexto e Saúde**, Ijuí, v. 14, n. 26, p. 20-27, 2014.

DE LA ROSA, L. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. v. 1, 382 p.

DOOL, H. van den; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, p. 463-471, 1963.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 424 p.

FREITAS, M. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do carvacrol através dos métodos de contato direto e gasoso. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 3, p. 781-786, 2013.

GILL, A. O. et al. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 83-92, 2002.

GOVARIS, A. et al. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2/3, p. 175-180, Feb. 2010.

HAYOUNI, E. A. et al. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against

Salmonella inoculated in minced meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 3, p. 242-251, July 2008.

HOFERL, M.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 21, n. 5, p. 459-464, Dec. 2009.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

LUDTKE, C. B. et al. **Abate humanitário de bovinos**. Rio de Janeiro: WSPA BRASIL, 2012. 148 p.

MCDONNELL, M. J. et al. Evaluation of carvacrol for the control of Escherichia coli O157 on cattle hide and carcass cuts. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 9, n. 11, p. 1049-1052, 2012.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 948 p.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH mass spectral library**. Gaithersburg, 2008. Software.

OLIVEIRA, T. L. C.; SOARES, R. A.; PICCOLI, R. H. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against Salmonella Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. **Meat Science**, Barking, v. 93, n. 3, p. 645-651, Mar. 2013.

ORDÓÑEZ, J. **A tecnologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 2, 280 p.

POIANA, M. et al. Antimicrobial effect of some essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 20, n. 4, p. 373-379, July/Aug. 2008.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 599 p.

ROMERO, A. L. et al. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 11, n. 4, p. 15-18, 2009.

ROMERO, A. L. et al. Efeito de monoterpenos naturais no crescimento micelial e germinação de conídios de *Corynespora cassiicola*. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, Recife, v. 18, n. 1, p. 3-7, 2013.

SANTOS, M. R. V. et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 21, n. 4, p. 764-771, 2011.

SANTURIO, D. F. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos sobre *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos**. 2011. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SANTURIO, D. F. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 136-141, 2010. Suplemento.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. São Paulo: Varela, 2005. 164 p.

SOUZA, A. B. et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytotherapy Research**, London, v. 25, n. 2, p. 215-220, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

TSERENNADMID, R. et al. Antibacterial effect of essential oils and interaction with food components. **Central European Journal of Biology**, London, v. 5, n. 5, p. 641-648, 2010.