



WANDERLEY JOSÉ MANTOVANI BITTENCOURT

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS
CONDIMENTARES COM POTENCIAL ANTI-
Shigella flexneri NA CONSERVAÇÃO DE CARNE
MOÍDA**

LAVRAS – MG

2014

WANDERLEY JOSÉ MANTOVANI BITTENCOURT

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONDIMENTARES COM
POTENCIAL ANTI-*Shigella flexneri* 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, área de concentração Bioatividade de Plantas Medicinais, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora:

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Co-Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Bittencourt, Wanderley José Mantovani.

Óleos essenciais de plantas condimentares com potencial anti-*Shigella flexneri* na conservação de carne moída / Wanderley José Mantovani Bittencourt. – Lavras : UFLA, 2014.

70 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Bibliografia.

1. Óleos essenciais. 2. Antimicrobianos naturais. 3. Plantas condimentares. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.82

WANDERLEY JOSÉ MANTOVANI BITTENCOURT

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONDIMENTARES COM
POTENCIAL ANTI-*Shigella flexneri* 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, área de concentração Bioatividade de Plantas Medicinais, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 08 de agosto de 2014

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

UFLA

Dr. Cleidir Rodrigues Santos

MINHO/BRAGA/PORTUGAL

Orientadora:

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

LAVRAS – MG

2014

A Deus pelo dom da vida.

Ao meu pai, minha mãe e toda a minha família, principalmente minha avó Marília pelo apoio incondicional nessa jornada.

Aos meus amigos, antigos e novos cujo apoio fora essencial nessa conquista.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares pela oportunidade de tamanho crescimento profissional.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

À Professora e amiga Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci pelo carinho, confiança e orientação.

Ao professor Dr. José Eduardo cujo profissionalismo e transparência me possibilitaram esse curso e pelos momentos de aprendizado e caráter aprendidos.

A professora Roberta pela disponibilidade, carinho, dedicação e amizade.

A minha irmã de horto Aurislaine pelos momentos de apoio quando o desânimo tentava se instaurar, pelas risadas altas e pela amizade que desde o início se fez presente.

Ao Professor Cledir pela disponibilidade e valiosa contribuição nessa banca examinadora.

Aos amigos do Horto Luizinho, Vanderleia, Paulinho e Dico e Annete pelos momentos de risadas e pela amizade durante todo o curso.

A Marly e Ana Luiza, pelo apoio, carinho e pelos apertos que passamos para que essa defesa fosse possível.

A minha família, dom de Deus, cuja confiança e amor permitiram minha formação como profissional e principalmente como pessoa.

A minha avó Marília, pelo amor, carinho e acima de tudo pelo incentivo e confiança que sempre me dedicou.

Aos meus colegas de curso que mesmo em áreas cada uma diversa, se fizeram presentes.

Ao Victor, Nayane e todos os colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos pelo apoio, auxílio e amizade.

A minha grande amiga Juliana Salimena, pelos momentos em que me ouviu, aconselhou e me deu apoio e principalmente pelas risadas.

A Valéria e a Vó Rosa que pelos sábios conselhos me fizeram mais humano e maduro frente aos obstáculos enfrentados.

Aos meus guias que sempre me acompanham, dando força, proteção e serenidade mesmo quando tudo parecia desabar.

Aos meus amigos, Mariana, Suely, Franciane, Leninha, Elaine, Maycon, Anderson e a Apania, Rafaelly, Priscila e Lucas que mesmo em pouco tempo de convivência já são essenciais e agradeço de coração.

Ao Arthur, meu alicerce cujo apoio, companheirismo e compreensão foram essenciais nessa etapa tão importante da minha caminhada. Essa dedicação me fez acreditar que nada nessa vida é impossível.

A todos o meu mais sincero e honesto agradecimento pois sem vocês com certeza esse trabalho ainda seria apenas um sonho talvez distante de se realizar.

“Aquilo que se faz por amor está
sempre além do bem e do mal.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Bactérias do gênero *Shigella* são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. *Shigella* sp. é transmitida pela água contaminada e por alimentos como saladas, vegetais crus, leite e produtos lácteos e carne principalmente a carne moída, estando diretamente ligada a surtos de toxiinfecções alimentares de rápida progressão, difícil tratamento e fácil contágio. O aumento da resistência bacteriana aos agentes antibacterianos empregados comumente na indústria é crescente, sendo que, os conservantes químicos não são bem aceitos pelos consumidores e, portanto, antimicrobianos de origem natural são de grande interesse atualmente. Os óleos essenciais são bem conhecidos por suas propriedades antimicrobianas e diversos estudos tem confirmado sua eficiência tanto como sanificante e desinfetante quanto como conservante. Objetivou-se determinar a concentração mínima inibitória (CMI) de óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Myristica fragans*, *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum*, *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Foeniculum vulgare dulce* contra *Shigella flexneri*, a fim de selecionar os óleos de maior atividade para avaliar o potencial anti-*Shigella* da combinação desses óleos quando em carne moída. Os óleos essenciais, puros e combinados, foram analisados por CG e CG-EM. A CMI dos óleos essenciais puros e combinados em diferentes concentrações foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 cavidades. Os óleos essenciais, puros e em mistura, foram incorporados a carne moída inoculada com *S. flexneri*. A quantificação da bactéria foi realizada nos tempos 0 h, 24 h e 48 h de armazenamento da carne a 12°C seguido de incubação por 24 h a 35 °C em meio *Shigella/Salmonella* para contagem das colônias. Os óleos essenciais que apresentaram maior inibição foram o de *Syzygium aromaticum* (0,33%) e o de *Cinnamomum cassia* (0,65%). Os óleos de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e *Myristica fragans* apresentaram CMI na faixa de 5 a 10%. As combinações dos óleos de folhas de *Origanum vulgare*, folhas e flores de *Thymus vulgaris*, botões florais de *Syzygium aromaticum* e partes aéreas de *Cinnamomum zeylanicum* obtiveram êxito no controle de *Shigella flexneri*, fato este que os torna possíveis adjuvantes na conservação de carne moída.

Palavras-chave: segurança alimentar; antimicrobianos naturais; sinergismo.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Shigella* are Gram-negative bacilli, non-spore forming, belonging to the *Enterobacteriaceae* family. *Shigella* sp. is transmitted by contaminated water and food such as salads, raw vegetables, milk and dairy and meat products mainly ground beef and are directly linked to outbreaks of food toxiiinfeco rapidly progressive, difficult to treat and easy contagion. The increase in bacterial resistance to sanitizing agents commonly employed in the industry is growing. On the other hand, the chemical preservatives are not well accepted by consumers and therefore naturally occurring antimicrobials are currently of great interest. Essential oils are well known for their antimicrobial properties, and several studies have confirmed its efficiency as both sanitizing and disinfectant or as a preservative. This study aimed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of essential oils of *Origanum vulgare*, *Myristica fragrans*, *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum*, *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Cinnamomum zeylanicum* and *Foeniculum vulgare dulce* against *Shiguela flexneri* to select oils increased activity to assess the anti-*Shiguela* potential of combining these oils in contamination of ground beef. The essential oils combined pure and were analyzed by GC and GC-MS. The IMC and combinations of pure essential oils in different concentrations were determined using the technique of microdilution in 96-well polystyrene plates. The essential oils pure and in mixture, were incorporated into the ground meat and then the meat was contaminated with *S. flexneri*. For bacterial counts dilutions in the 0 h, 24 h and 48 h and plating on medium Shiguela /Salmonella, followed by incubation for 24 h at 35 ° C for counting the colonies were used. The essential oils that showed greater inhibition were *Syzygium aromaticum* (0.33%) and of *Cinnamomum zeylanicum* (0.65%). The oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare Myristica fragrans* showed MIC in the range from 5 to 10%. The combinations of oils from leaves of *Origanum vulgare*, leaves and flowers of *Thymus vulgaris* flower buds of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* aerial parts were successful in controlling strains of *Shigella flexneri*, a fact that makes it possible aids in the conservation of ground beef.

Keywords: food safe; natural antimicrobial agents; synergism.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

Figura 1. Representação do ciclo biossintético das classes de constituintes químicos mais abundantes na composição química dos óleos essenciais.....26

Artigo 2

Figura 1 - Representação gráfica da Análise de Componente Principais (PCA) da atividade antimicrobiana das diferentes combinações dos óleos essenciais de orégano, tomilho, cravo da índia e canela sobre a inibição do crescimento de *Shigella flexneri*.....68

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. Concentrações mínimas inibitórias (CIM) *in vitro* de diferentes óleos essenciais de plantas condimentares sobre *S. flexneri*.....47

Tabela 2. Composição química dos constituintes principais dos óleos essenciais empregados nos ensaios de inibição do crescimento *in vitro* de *S. flexneri*.....49

Tabela 3. Composição química das classes de constituintes químicos presentes nos óleos essenciais empregados nos ensaios de inibição do crescimento *in vitro* de *S. flexneri*.....50

Artigo 2

Tabela 1. Planejamento experimental para avaliação da atividade bactericida *in vitro* contra *Shigella flexneri* de óleos essenciais combinados de três em três.60

Tabela 2. Combinação dos óleos essenciais para avaliação da atividade bactericida *in vitro* contra *Shigella flexneri*.....61

Tabela 3. Combinação e volume dos óleos essenciais utilizados na avaliação da atividade bactericida *in situ* contra *Shigella flexneri* inoculada em carne moída.62

Tabela 4. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de (O) *O. vulgare*, (T) *T. vulgaris*, (Ca) *C. zeylanicum* e (Cr) *S. aromaticum* em diferentes combinações e proporções sobre *Shigella flexneri*.....64

Tabela 5. Quantificação média do número de células viáveis de *Shigella flexneri* inoculada em carne moída adicionada de diferentes combinações de óleos essenciais de plantas condimentares após 0, 24 e 48 h de armazenamento a 12°C.65

Tabela 6. Composição química dos constituintes principais das misturas de óleos essenciais empregados nos ensaios de inibição do crescimento *in situ* de *S. flexneri*.....67

LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

1 Carvacrol	27
2 α -pineno.....	28
3 β -pineno.....	28
4 Miristicina.....	28
5 Timol.....	30
6 <i>p</i> -cimeno.....	30
7 Eugenol.....	30
8 β -cariofileno.....	30
9 Alcool Benzílico.....	30
10 <i>E</i> -cinamaldeído.....	32
11 Cânfora.....	32
12 Linalol.....	32
13 Acetato de <i>E</i> -cinamila.....	32
14 α -felandreno.....	32
15 Limoneno.....	32
16 Anetol.....	33
17 Fenchona.....	33
18 Estragol.....	33
19 Borneol.....	34
20 Canfeno.....	34
21 Veбенona.....	34
22 Acetato de Bornila.....	34
23 1,8 Cineol.....	34
24 β -mirceno.....	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 <i>Shigella flexneri</i>: um patógeno de origem limentar.....	18
2.2 Carne moída: um alimento acessível e de fácil contaminação microbiana.....	20
2.3 Uma nova abordagem na conservação de alimentos.....	21
2.4 Óleos essenciais: Química e Potencial Bactericida.....	24
2.5 Óleos Essenciais de Plantas Condimentares.....	27
2.5.1 Óregano (<i>Origanum vulgare</i> L.).....	27
2.5.2 Noz Moscada (<i>Myristica fragans</i> Houtt.).....	28
2.5.3 Tomilho Branco (<i>Thymus vulgaris</i> L.).....	29
2.5.4 Cravo da Índia (<i>Syzygium aromaticum</i> Thunb.).....	30
2.5.5 Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume).....	31
2.5.6 Funcho Doce (<i>Foeniculum vulgare dulce</i>).....	32
2.5.7 Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	33
2.5.8 Manjerição (<i>Ocimum basilicum</i> L.).....	35
REFERÊNCIAS.....	35
Artigo 1 Atividade bactericida de óleos essenciais de plantas condimentares sobre <i>Shigella flexneri</i>	41
Resumo.....	41
Abstract.....	41
1 INTRODUÇÃO.....	42
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
2.1 Obtenção dos Óleos Essenciais.....	44
2.2 Microrganismos, manutenção, padronização e obtenção do inóculo.....	45
2.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	45
2.4 Análises químicas.....	46
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4 CONCLUSÃO.....	51
5 AGRADECIMENTOS.....	51
REFERÊNCIAS.....	51
Artigo 2- Atividade anti- <i>Shigella flexneri</i> de combinação de óleos essenciais de plantas condimentares na segurança de carne moída.....	54
Resumo.....	54
Abstract.....	55
1 INTRODUÇÃO.....	56
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1. Óleos essenciais e caracterização química.....	57

2.2	Microrganismo, manutenção, padronização e obtenção do inóculo.....	59
2.3	Ação bactericida <i>in vitro</i> das combinações de óleos essenciais sobre <i>Shigella flexneri</i>	59
2.4	Ação bactericida das combinações de óleos essenciais sobre <i>Shigella flexneri</i> em carne moída	61
2.5	Enumeração de <i>Shigella flexneri</i> em carne moída.....	62
2.6	Análise estatística.....	63
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4	CONCLUSÃO.....	69
5	AGRADECIMENTOS.....	69
	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Shigella* são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (FRANCO; LANDGRAF, 2003). *Shigella* sp é transmitida pela água contaminada e por alimentos como saladas (batata, atum, camarão, macarrão e frango), vegetais crus, leite e produtos lácteos e carnes, principalmente, a carne moída (SHAECHTER, 2002). A contaminação destes alimentos é geralmente por via fecal-oral. Pesquisas mostram que duas espécies de *Shigella*, *S. flexneri* e *S. sonnei* na proporção de 3:1 estão envolvidas em surtos de toxinfecções alimentares, causando a shigelose.

De acordo com a Food and Agriculture Organization (2004) estima-se que a shigelose seja responsável por cerca de 600.000 mortes e dois terços dos casos de diarreia no mundo. A maioria das mortes ocorre em crianças menores de 10 anos de idade, em locais com precárias condições de higiene e problemas de saneamento básico (FAO, 2004).

A shigelose caracteriza-se por dor abdominal e cólica, diarreia com sangue, pus ou muco; febre, vômitos e tenesmo, em geral, iniciam-se, um ou dois dias após a exposição às bactérias. Agravos dessa infecção são manifestações de febre alta, podendo estar associada com convulsões em crianças menores de 4 anos de idade (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, CDC, 2013).

Nas indústrias de alimentos o controle de microrganismos patogênicos e deterioradores se dá empregando-se as boas práticas de fabricação, tendo grande importância o processo de sanitização de equipamentos e das mãos dos colaboradores e pela adição de conservantes aos alimentos. Contudo, trabalhos mostram a ocorrência do aumento da resistência das bactérias aos agentes

sanificantes empregados comumente na indústria (BORGES et al., 2013). Já os conservantes químicos não são bem vistos pelos consumidores assim, antimicrobianos alternativos e ditos “naturais” são de grande interesse atualmente.

Nesse contexto destacam-se os óleos essenciais, caracterizados por ser um complexo de constituintes químicos naturais e voláteis, caracterizados por um forte odor e oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Os óleos essenciais e alguns de seus componentes são usados em perfumes e na manufatura de diversos produtos sanitários, na odontologia, na agricultura, como preservativos e aditivos de alimentos e remédios naturais. Por exemplo, D-limoneno, acetato de geranila e D-carvona podem fazer parte da composição de perfumes, produtos de higiene pessoal e doméstica, cremes, sopas, como aditivos de sabores e aromatizantes (BAKKALI et al., 2008). Estudos sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem comprovado sua ação sanificante, desinfetante e conservante (OLIVEIRA; SOARES; PICCOLI, 2013; OLIVEIRA; PICCOLI; BRUGNERA, 2013; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2013).

Considerando o grande potencial antibacteriano existente nos óleos essenciais objetivou-se analisar os óleos essenciais de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), Manjericão (*Ocimum basilicum* L.), Óregano (*Origanum vulgare* L.), Noz Moscada (*Myristica fragans* L.), Tomilho Branco (*Thymus vulgaris*), Cravo Botão (*Syzygium aromaticum* (L.) Nerril), Canela Cássia (*Cinnamomum cassia*), Funcho Doce (*Foeniculum vulgare dulce*), e misturas com concentrações definidas desses óleos *in vitro* e em carne moída inoculada com *Shigella flexneri*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Shigella flexneri*: um patógeno de origem alimentar

Bactérias do gênero *Shigella* são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Este gênero, característico do trato digestivo humano, é constituído por quatro espécies e cada uma possui um sorogrupo distinto sendo: *S. dysenteriae* (sorogrupo A), *S. flexneri* (sorogrupo B), *S. boydii* (sorogrupo C) e *S. sonnei* (sorogrupo D) (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

As doenças de origem alimentar, ou transmitidas por alimentos, são de vital interesse para a saúde pública. *Shigella* sp é responsável por grande número de surtos, casos e óbitos (OUSSALAH et al., 2007). Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são definidas como qualquer doença infecciosa ou de natureza tóxica causada pelo consumo de alimentos ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados. A maioria, no entanto, é de origem microbiana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, 2004; BRASIL, 2005).

Casos de DTA ocorrem diariamente em todos os países, mas como a maioria não é relatado, a verdadeira dimensão do problema ainda é desconhecida (WHO, 2009).

A agência norte americana *Food and Drug Administration* (FDA) classifica, como principal preocupação em segurança alimentar, as doenças transmitidas por alimentos, visto que os episódios de toxinfecção alimentar ultrapassam em número qualquer outro tipo de contaminação por alimento (SIZER; WHITNEY, 2003).

Contaminação de alimentos geralmente resulta de uma pessoa infectada utilizando técnicas de preparação imprópria ou não asséptica, seja antes, durante ou depois do processamento do alimento (LAMPEL; MINTZBERG; AHLSTRAND, 2000). Os alimentos mais comumente contaminados incluem carne e produtos lácteos, ovos, peixe e vegetais crus. *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157: H7 e *Shigella* spp estão entre os principais patógenos de origem alimentar afetando pessoas em todo o mundo (CDC, 2010).

A shigelose caracteriza-se por dor abdominal e cólica, diarreia com sangue, pus ou muco; febre, vômitos e tenesmo, em geral, iniciam-se um ou dois dias após a ingestão da bactérias. Geralmente, trata-se de infecção auto limitada, durando de 4 a 7 dias. A infecção grave, com febre alta, pode estar associada com convulsões em crianças menores de 4 anos de idade. Algumas cepas são responsáveis por taxa de letalidade de 10 a 15% e produzem a enterotoxina tipo Shiga (semelhante à verotoxina da *E. coli* O157:H7), podendo causar a síndrome urêmica-hemolítica (SHU) e a doença de Reiter (artrite reativa) (CDC, 2013).

Os principais tratamentos incluem, reidratação com eletrólitos via oral e quando em casos mais severos via intravenosa e uso de alguns medicamentos antibióticos de amplo espectro como sulfametoxazol e trimetoprim (Bactrim), ampicilina, ciprofloxacino (Cipro) ou azitromicina. (GUIA DE REMÉDIOS, 2013).

A diarreia causada por *Shigella* spp continua a ser problema de saúde pública importante no mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a doença pode causar 167 milhões de episódios de diarreia e mais de um milhão de mortes anualmente (KOTLOFF et al., 1999). Segundo o Programa de Infecção Emergentes (CDC, 2006), *Shigella* foi o terceiro agente patogênico de origem alimentar mais relatado em 2005. *Shigella* spp. é transmitido por contato direto com uma pessoa infectada ou por ingestão de alimentos ou água contaminados (WHO, 2005).

2.2 Carne moída: um alimento acessível e de fácil contaminação microbiana

A carne é um dos produtos mais consumidos no mundo. Quanto ao aspecto nutricional, é uma fonte ideal de aminoácidos essenciais e, em menor extensão, de alguns minerais. Entre as características mais interessantes no consumo da carne está a sua habilidade de suprir o ferro, e aumentar a absorção desse íon de fontes não cárneas consumidas em conjunto sendo os vegetais de coloração verde escura como couve, brócolis, talos de beterraba os mais importantes, no entanto não tão bem absorvidos quando os íons presentes na carne. Seu grande consumo também se deve a grande variedade de técnicas de preparo a que pode ser submetida e ao seu sabor (VERRUMA-BERNARDI, 2001; LAWRIE, 2005). Pardi et al. (2001) também enfatiza-se às quantidades significativas de vitaminas do complexo B presentes na carne bovina.

A Instrução Normativa nº 83 de 21 de novembro de 2003, define carne moída como produto obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos, ou bufalinos, seguido de imediato resfriamento ou congelamento, com teor máximo de 15% de gordura (BRASIL, 2003). Nesse contexto, trata-se de produto cru, sem nenhum preparo adicional.

O consumo da carne moída destaca-se dentre os produtos cárneos, pela sua aceitabilidade e por caracterizar-se como produto popular, sendo acessível à faixa da população com menor poder aquisitivo, além de poder ser usada em refeições de maneira prática e variada (MOTTA; BELMONTE; PANETTA, 2000).

No contexto dos produtos frequentemente envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares, as carnes merecem destaque, pois possuem elevada atividade de água e pH favorável ao crescimento de microrganismos. Além de elevado percentual de proteínas, minerais e vitaminas, tornando-as excelentes

meios de cultura para o desenvolvimento de patógenos e deteriorantes (CARDOSO; ARAÚJO, 2003). A carne moída, em particular, apresenta maiores problemas microbiológicos que os cortes, por sofrer maior manipulação e possuir maior relação área/volume (CONCEIÇÃO; FARIA; GANDARA, 2003).

A carne é um alimento muito perecível e o aumento da sua vida útil é muito importante para o produtor e para o consumidor final. A perda de frescor da carne após moagem é resultado, principalmente, da atividade de enzimas endógenas e exógenas, oxidação dos lipídios e pigmentos e putrefação bacteriana. Em geral, a deterioração bacteriana da carne é causada por microrganismos psicrotróficos (FIK; SUROWKA; FIREK, 2008).

O potencial de crescimento dos microrganismos psicrotróficos, seguido de alteração das qualidades organolépticas também são aspectos considerados bastante preocupantes. Com períodos de tempo suficientes sob temperatura de refrigeração, várias espécies de bactérias psicrotróficas podem atingir níveis que promovem a deterioração da carne (DJENANE et al., 2005).

Oliveira et al. (2008), em estudos sobre fontes contaminantes de carne moída demonstraram que o maior índice de contaminação desse produto em açougues e frigoríficos ocorreram, principalmente, por contato com moedores de carne e com as mãos dos manipuladores.

2.3 Uma nova abordagem na conservação de alimentos

As observações do homem em relação aos alimentos disponíveis e o ambiente em que viviam, muito provavelmente, possibilitaram o desenvolvimento das primeiras técnicas de conservação como, por exemplo, a desidratação, a salga ou mesmo o resfriamento (BARUFALDI; OLIVEIRA, 1998).

Atualmente, percebe-se grande evolução destas técnicas, que embora antigas ainda sejam empregadas isoladamente ou em associações com outras mais recentes. Assim, tais procedimentos possibilitam a construção de barreiras efetivas para controle de microrganismos e também no aumento da vida útil de vários produtos alimentícios (SOUZA; LIMA; NARAIM, 2003).

A conservação do alimento pode ser conseguida pelo uso de métodos drásticos como a esterilização, que mata os microrganismos capazes de se desenvolverem em alimentos. Entretanto, estes procedimentos acarretam numa série de interações e reações entre substâncias constituintes dos alimentos que podem dar ao produto final gosto e aroma alterados. Por outro lado, quando se empregam métodos mais suaves de conservação, estes muitas vezes não bastam para ampliar a vida útil dos produtos, sendo assim necessárias duas ou mais operações ou processos para alcançar êxito. Por isso, busca-se o emprego de métodos mais suaves, associados ou não para a conservação, visando abrir possibilidades de colocar no mercado produtos cada vez mais frescos e processados ao mínimo (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998).

A medida que a exigência dos consumidores aumenta, o mercado também deve se adequar no oferecimento de produtos cada vez mais frescos, nutritivos, com alta qualidade sensorial e vida útil viáveis. Novos tratamentos ganham destaque como as tecnologias não térmicas e os derivados vegetais (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004).

Em relação aos vegetais, sabe-se que todos são possuidores de vias metabólicas secundárias que dão origem a compostos incluindo alcaloides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos, óleos fixos e essenciais, dentre outros, que por sua vez são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies vegetais (SOUZA; LIMA; NARAIM, 2003).

Os derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido *p*-coumárico, ferulico, cafeico e clorogenico), encontrados em frutas, verduras, legumes, chás e outras fontes de origem vegetal são reconhecidos por apresentar atividade antibacteriana e antifúngica. Já nas plantas crucíferas (repolho, couve, brócolis, nabo, entre outros), encontram-se os glucosinolatos, os quais produzem isotiocianatos após sofrerem algum tipo de injúria mecânica, tendo alguma atividade antifúngica e antibacteriana. Outras plantas são conhecidas por possuir óleos essenciais com atividade antimicrobiana, como por exemplo o eugenol do cravo-da-índia; a alicina do alho; o aldeído cinâmico da canela e o timol no orégano (JAY, 2005).

As especiarias são os produtos constituídos de partes (raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes, talos) de espécies vegetais, tradicionalmente utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 2007). No que diz respeito a atividade antimicrobiana em alimentos, estes podem servir como substrato para o crescimento microbiano e produção de toxinas e, de acordo com a forma tradicional de uso, as especiarias e ervas adicionadas aos alimentos são geralmente em quantidades insuficientes para evitar a deterioração por microrganismos (CEYLAN; FUNG, 2004).

Os compostos de natureza vegetal, em especial as especiarias e seus produtos derivados (óleos essenciais e extratos), apresentam potencial relevante como agentes de inibição do crescimento de microrganismos, mostrando que elementos que se apresentavam apenas como vetores de aromas e gostos característicos, apresentam perspectiva de emprego como agentes ou adjuvantes de produtos sanitizantes (SOUZA; LIMA; NARAIM, 2003).

Estudos realizados com óleos essenciais revelaram que as quantidades a serem empregadas como sanitizante variam muito, uma vez que em grandes quantidades pode alterar o sabor do produto. Além disso, a eficiência relativa

muda conforme a composição do produto, bem como a metodologia empregada nos ensaios que também geram dificuldades de comparação entre os resultados obtidos. Em geral bactérias Gram positivas são mais sensíveis que as Gram-negativas, enquanto as bactérias lácticas são as mais resistentes entre as Gram-positivas. Fungos parecem ser mais sensíveis que as bactérias Gram-negativas (JAY, 2005).

No Brasil, óleos essenciais e extratos estão compreendidos dentro da classe de aditivos como aromatizantes naturais. No entanto, excluem-se do regulamento da ANVISA, as matérias de origem vegetal ou animal que possuam propriedades aromatizantes intrínsecas, quando não são utilizadas exclusivamente como fonte de aromas (ANVISA, 2007).

2.4 Óleos essenciais: química e potencial bactericida

Os óleos essenciais são complexas misturas de constituintes químicos voláteis odoríferos, sintetizados em qualquer parte de uma planta aromática e armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células da epiderme ou tricomas glandulares. Eles são normalmente obtidos por meio de arraste a vapor ou hidrodestilação. Conhecido pela sua atividade bactericida, fungicida e virucida apresenta propriedades medicamentosas e flavorizantes. Tem sido empregados como conservantes de alimentos devido suas propriedades antibióticas (BAKKALI et al., 2008).

Do ponto de vista químico, a maioria dos óleos essenciais são constituídos por constituintes das classes dos fenilpropanóides ou dos terpenóides, havendo predominância desses últimos. Os fenilpropanóides são formados pela via do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico. Em seguida, por meio de reduções enzimáticas, produzem propenilbenzenos e/ou alilbenzenos; por oxidação com degradação

das cadeias laterais, formam aldeídos aromáticos e, por ciclizações enzimáticas intramoleculares, produzem cumarinas (SIMÕES et al., 2004).

A via do mevalonato (MVA) é a mais discutida. Por meio dela, são formados os sesquiterpenos e triterpenos, derivados do isopreno. Sua ocorrência dá-se no citoplasma da célula e a sua origem biossintética pode ser resumida pelo metabolismo da glicose pela via do acetato e reduzida a mevalonato, numa reação irreversível, em que o mevalonato é convertido em isopentil-pirofosfato (IPP) ou *isopreno ativo* (unidade básica na formação dos terpenos e esteroides, com 5 carbonos – C₅) e o seu isômero dimetilalil-pirofosfato (DMAPP). Outra rota existente dos terpenóides é a via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) de ocorrência nos cloroplastos das células. Nela o piruvato e o gliceraldeído 3-fosfato, formados durante o metabolismo primário formam o 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato e, em seguida, o 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato. Após sucessivas reações, são formados tanto o isopentil-pirofosfato quanto seu isômero, o dimetilalil-pirofosfato. Essa rota parece estar envolvida na biossíntese de carotenoides, fitóis, monoterpenos, diterpenos, tetraterpenos e plastoquinonas (DESCHAMPS et al., 2003).

Um esquema resumido do ciclo biossintético dos metabólitos secundários, com destaque para as vias do chiquimato, mevalonato e DXP é apresentado na Figura 1.

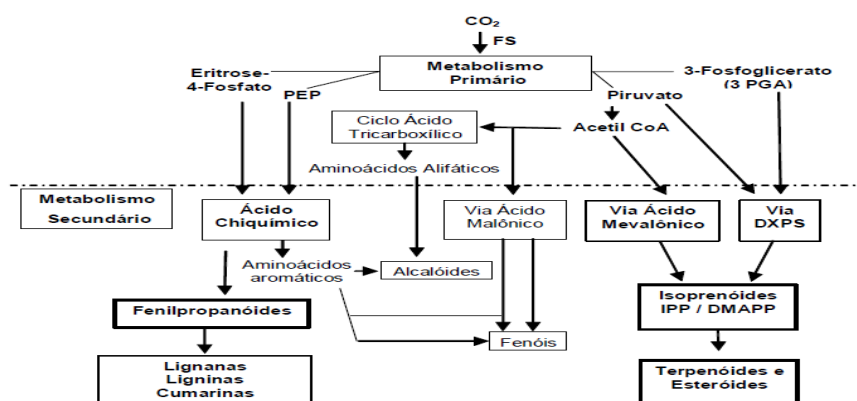


Figura 1. Representação do ciclo biossintético das classes de constituintes químicos mais abundantes na composição química dos óleos essenciais
Fonte: Deschamps (2005).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros. Eles também servem para atrair alguns insetos que favorecem a dispersão de pólen e sementes, ou mesmo para repelir outros insetos indesejáveis (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008).

Segundo Bertini et al. (2005) a atividade antibacteriana de óleos essenciais pode ser influenciada por vários parâmetros, com destaque para o tipo, composição, concentração, processamento e estocagem do óleo essencial. Por outro lado, o tipo de microrganismo e composição do substrato utilizado para crescimento do microrganismo também podem fornecer resultados distintos para esta propriedade dos óleos.

Geralmente os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (BETTS, 2001; PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006). Embora sejam encontrados resultados diferentes em alguns estudos, a susceptibilidade dos microrganismos Gram-positivos parece

ser maior do que a dos Gram-negativos em relação aos óleos essenciais (BURT, 2004; HOLLEY; PATEL, 2005).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é clara, mas o mecanismo de ação antimicrobiana ainda não está completamente entendido. Há consenso de que a grande maioria dos compostos aromáticos e fenólicos exerce seus efeitos antimicrobianos diretamente na membrana citoplasmática provocando alterações na sua estrutura e funções (HOLLEY; PATEL, 2005).

Considerando o número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é muito provável que a sua atividade bactericida não seja atribuída a um mecanismo específico. Mas, parece existir vários alvos na célula, como as alterações da membrana citoplasmática, perturbações sobre a força próton motriz, no fluxo de elétrons, no transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Nem todos esses mecanismos atingem alvos separados, podendo alguns ocorrerem em consequência de outro mecanismo (BURT, 2004).

2.5 Óleos Essenciais de Plantas Condimentares

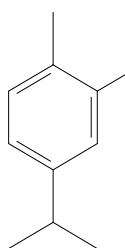
Para as análises de avaliação antibiótica e análise de constituintes, foram empregados os óleos abaixo. Os óleos estudados foram selecionados considerando potencial aceitação na utilização alimentar por parte dos consumidores, por essa razão, a utilização de óleos condimentares.

2.5.1 Óregano (*Origanum vulgare* L.)

Planta herbácea, perene, ereta aromática, de hastes algumas vezes arroxeadas, de 30 a 50 cm de altura, nativa de regiões montanhosas e pedregosas

do sul da Europa e cultivada no Brasil. Folhas esparso-pubescentes, de 1-2 cm de comprimento. Flores esbranquiçadas, róseas ou violáceas, reunidas em inflorescências paniculadas terminais (LORENZI; MATOS, 2008).

Apresenta teor de óleo em torno de 1% com cerca de 40 a 70% de carvacrol (**1**), acompanhado de borneol, 1,8-cineol, terpineol, terpineno e timol (GRUENWALD; BRENDLER; JAENICKKE, 2000).

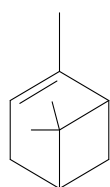
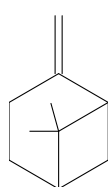
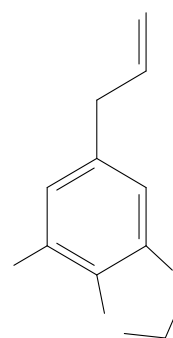


(1)

2.5.2 Noz Moscada (*Myristica fragans* Houtt.)

A noz-moscada é produzida pela planta denominada moscadeira. *Myristica fragans* pertencente à família das Miristicáceas, que atinge na maturidade até 12 m de altura. A fruta é redonda amarelo esverdeada com diâmetro de aproximadamente 5 cm e consiste de pericarpo e semente. Ao amadurecer a parte carnosa se divide em duas, descobrindo a semente. A semente é revestida por anel, de cor vermelho brilhante e que se chama macis ou 'flor de macis'. Estas duas partes são usadas como especiarias. A semente também é chamada de noz-moscada, denominação incorreta segundo a botânica, já que não se trata de uma noz. Estas podem pesar até 10g e formam a maior parte do fruto (CHOO; WONG; LIEW, 1999).

Análises químicas por CG-EM do óleo essencial das sementes de *M. fragans* obtido por hidrodestilação durante três horas indicaram a presença majoritária de α -pineno (17,2%) **(2)**; β -pineno (23,9%) **(3)** e miristicina (16,2%) **(4)**. Os derivados de alilbenzenos e propilbenzenos (miristicina, safrol, eugenol, metil eugenol, metil isoeugenol, elimicina) totalizaram 23,7% do teor total do óleo (JUKIC et al., 2006).

**(2)****(3)****(4)**

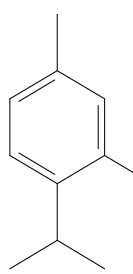
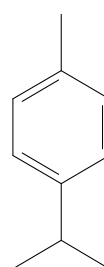
Corroborando, em partes, com a composição química relatada por Jukic et al. (2006), o óleo essencial das sementes de noz-moscada analisados por Muchtaridi et al. (2010) foram α -pineno (10,23%), sabineno (21,38%), 4-terpineol (13,92%) e miristicina (13,57%). A quantificação dos derivados de alilbenzenos e propilbenzenos correspondeu a cerca de 22,00% do teor total deste óleo.

2.5.3 Tomilho Branco (*Thymus vulgaris* L.)

Subarbusto perene, ereto, ramificado, entouceirado, muito aromático, de 20 -30 cm de altura, com a base dos ramos lenhosa e rasteira, nativo da região

mediterrânea e cultivado no Sul e Sudeste do Brasil. Folhas pequenas, opostas, de formas variadas e quase sésseis, levemente pubescentes e de coloração mais clara na face inferior. Flores pequenas, de cor esbranquiçada, reunidas em inflorescências espigadas axilares. Multiplicam-se por sementes (LORENZI; MATOS, 2008).

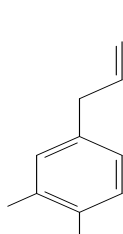
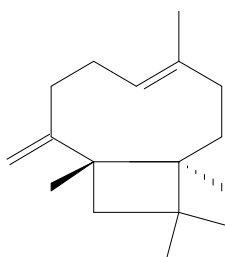
De acordo com Jakiemiu et al. (2010), o timol **(5)** é o constituinte majoritário do óleo essencial das hastes (54,00 a 57,50%) e folhas (50,43 a 55,00%) frescas de *T. vulgaris*, seguido pelo *p*-cimeno **(6)** com 12,00 a 15,00% e 17,00 a 21,00%, respectivamente. A concentração do γ -terpineno variou de 6,00 a 7,00% para a haste e de 5,00 a 7,00% para as folhas frescas. Carvacrol e borneol também foram detectados nos óleos obtidos desses órgãos da planta em teores que variaram entre 1,59% a 4,01%.

**(5)****(6)**

2.5.4 Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* Thunb.)

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* Thunb.) é uma planta arbórea, nativa das Ilhas Molucas (Arquipélago da Insulíndia, Indonésia) que possui odor fortemente aromático, sabor ardente e característico.

O principal componente do óleo de cravo é o eugenol (**7**), incluindo β -cariofileno (**8**) e outros constituintes em quantidades menores, tais como o álcool benzílico (**9**), mas as proporções variam amplamente. Por exemplo, Prashar et al. (2006) encontraram o teor 78% de eugenol e 13% de β -cariofileno, enquanto Pawar e Thaker (2006) observaram 47,64% de eugenol e 34,10% de álcool benzílico. Já Chaieb et al. (2007) em amostras de óleo essencial extraído dos botões florais secos de cravo por hidrodestilação, quantificaram por CG-EM um teor elevado de eugenol (88,58%) e baixa proporção de β -cariofileno (1,39%),

**(7)****(8)****(9)**

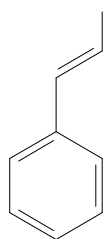
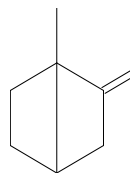
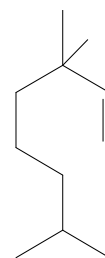
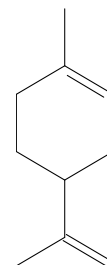
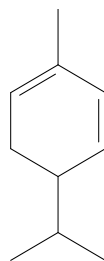
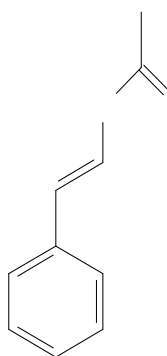
2.5.5 Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume)

Árvore aromática de 6 a 12 metros de altura, com folhas opostas, ovadas ou ovado-lanceoladas, tri nervadas. Flores numerosas, reunidas em racemos ramificados e dispostos em panículas terminais, de cor esverdeado-amarelada. Fruto do tipo drupa ovoide ou ovoide-oblonga, contendo uma semente elipsoide. É originária do Sri Lanka e do sudeste da Índia e cultivada em vários países inclusive o Brasil (LORENZI; MATOS, 2008).

Dos 22 compostos identificados por CG e CG-EM, *E*-cinamaldeído (79,3%) (**10**) e o eugenol (11,9%) (**7**) foram caracterizados como os componentes principais do óleo essencial da canela. Alguns compostos

terpênicos, tais α -pineno (**2**) e β -cariofileno (**8**) foram identificados e quantificados em menor proporção (Floris et al., 1996).

Lima et al. (2005) analisaram o óleo essencial extraído das folhas e dos galhos e obtiveram rendimentos de 0,4% e 0,3%, respectivamente. Neste óleo essencial os autores detectaram 23 constituintes químicos nas folhas e 36 nos galhos. O componente principal do óleo das folhas foi o eugenol (60,0 %) (**7**), seguido de β -cariofileno (8,3%) (**8**), cânfora (7,0%) (**11**) e linalol (7,0%) (**12**). Nos galhos, os principais componentes foram linalol (10,6%) (**12**), α -pineno (9,9%) (**2**), acetato de *E*-cinamila (9,7%) (**13**), α -felandreno (9,2%) (**14**), *E*-cinamaldeído (7,8%) (**10**), limoneno (7,9%) (**15**) e β -cariofileno (6,7%) (**8**).

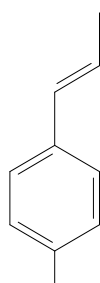
**(10)****(11)****(12)**

(13)**(14)****(15)**

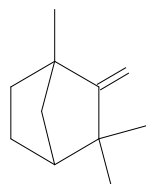
2.5.6 Funcho Doce (*Foeniculum vulgare dulce*)

Erva perene ou bienal, entouceirada, aromática, de 40 a 90 cm de altura, nativa da Europa e amplamente cultivada em todo o Brasil. Folhas inferiores alargadas de até 30cm de comprimento e superiores mais estreitas, com pecíolo alargado como bainha que envolve o caule, compostas pinadas, com folíolos reduzidos a filamentos. Flores pequenas, hermafroditas, de cor amarela, dispostas em umbelas compostas por 10-20 umbelas menores. Os frutos são oblongos compostos por dois aquênios de cerca de 4mm de comprimento (LORENZI; MATOS, 2008).

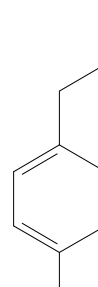
A composição dos óleos extraídos de folhas e frutos de acordo com Tinoco et al. (2007) apresentou como componentes majoritários o anetol (47,8% e 60,7%, respectivamente) **(16)**, a fenchona (12,6% e 22,8%, respectivamente) **(17)** e o estragol (10,0% e 3,5%, respectivamente) **(18)**. O óleo da folha apresentou ainda uma quantidade apreciável de α -felandreno (9,4%) **(14)** contrastando drasticamente com o teor desse constituinte no fruto que foi de apenas 1,0%. Dentre outros constituintes presentes nas folhas encontraram-se o sabineno (2,2%), o 1,8-cineol (1,6%), o β -pineno (1,3%) e o mirceno (1,2%).



(16)



(17)



(18)

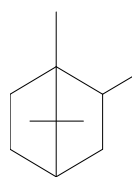
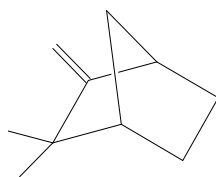
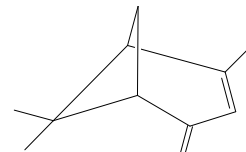
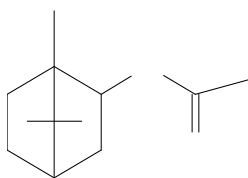
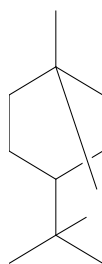
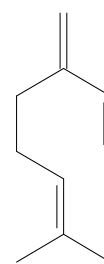
2.5.7 Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

Planta pequena de porte subarborescente, lenhosa, ereto, pouco ramificado, de até 1,5m de altura. Folhas lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo de 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. Flores azulado-claras, pequenas e de aroma forte muito agradável. É nativa da região Mediterrânea e cultivada em quase todos os países de clima temperado de Portugal à Austrália. Seu cultivo pode ser feito a partir de mudas preparadas por estaquia ou mergulhia, crescendo bem em solo rico em calcário em ambientes úmidos de clima ameno (LORENZI; MATOS, 2008).

Análise multivariada de constituintes majoritários do óleo essencial de folhas de *R. officinalis* coletadas em diferentes regiões da Itália apontaram quatro grupos químicos diferentes. Estes constituintes foram representados pelo α -pineno (2), borneol (19), canfeno (20), canfora (11), verbenona (21) e acetato de bornila (22) (ANGIONI et al., 2004).

Corroborando parcialmente com Angioni et al. (2004), os principais componentes do óleo essencial das folhas de *R. officinalis* relatados por Fu et al. (2007) foram 1,8-cineol (27,23%) (23), α -pineno (19,43%) (2), cânfora

(14,26%) **(11)**, canfeno (11,52%) **(21)**, borneol (3,17%) **(19)** e β -cariofileno (2,41%) **(8)**. Da mesma forma, Ribeiro et al. (2012) observaram α -pineno (19,8 %) **(2)**, β -mirceno (24,2 %) **(24)**, 1,8-cineol (22,2%) **(23)** e verbenona (9,3 %) **(21)**, correspondendo a 75,5 % do total do óleo.

**(19)****(20)****(21)****(22)****(23)****(24)**

2.5.8 Manjerição (*Ocimum basilicum* L.)

Subarbusto aromático, anual, ereto, muito ramificado, de 30-50cm de altura, nativo da Ásia tropical e introduzido no Brasil pela colônia Italiana. Folhas simples, membranáceas com margens onduladas e nervuras salientes, de 4-7cm de comprimento. Flores Brancas reunidas em racemos terminais curtos. Multiplica-se por sementes e estacas (LORENZI; MATOS, 2008).

Radulovic, Blagojević e Miltojević (2013) em seus experimentos encontraram entre os componentes majoritário para a espécie os componentes Estragol (52.2%) **(18)**, linalol (16.8%)**(12)** , 1,8-cineol (7.4%)**(23)**.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes**. Resolução - RDC nº 2. Brasília, 2007.

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

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food Chemistry Toxicology**, Philadelphia, v. 46, n. 2, p. 446–475, Feb. 2008.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

BERTINI, L. M. et al. Perfil de sensibilidade de bacterias frente a oleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, Brasília v. 17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.

BETTS, T. J. Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. **Journal of Chromatography**, Oxford, v. 936, n. 1/2, p. 33-46, Nov. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 83 de 21 de novembro de 2003. Dispõe sobre os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne moída de bovino. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, dez. 2003.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia v. 94, p. 233-253, 2004.

BORGES, A. et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, New Rochelle, v. 19, n. 4, p. 256-265, Aug. 2013.

CARDOSO, L.; ARAUJO, W. M. C. Parametros de qualidade em carnes comercializadas no Distrito Federal no periodo de 1997 – 2001. **Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 17, p. 12-18, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. **Foodborne illness**. General Information. Centers for Disease Control and Prevention, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. **Listeriosis-general information**. Centers for Disease Control and Prevention, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. **Salmonellosis-general information**. Centers for Disease Control and Prevention, 2013.

CEYLAN, E.; FUNG, D. Y. C. Antimicrobial activity of spices. Food Science Institute Kansas State University. Manhattan, Kansas 66506. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, Kansas, v. 12, p. 1-55, 2004.

CHAIEB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy Research**, Hoboken, v. 21, p. 501–506, 2007.

CHOO, L. C.; WONG, S. M.; LIEW, K. Y. Essential oil of nutmeg pericarp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 79, n. 3, p. 1954-1957. Sept. 1999.

CONCEICAO, M. P. J.; FARIA, J. A. F.; GANDARA, A. L. Influencia da temperatura de comercializacao sobre a microbiota de carne bovina moída, em atmosfera modificada. **Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 17, p. 67-72, 2003.

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.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, Philadelphia, v. 21, p. 703–714, 2004.

DJENANE, D. et al. Effect of lactic acid bacteria on extension of shelf life and growth of *Listeria monocytogenes* in beef steaks stored in CO₂ rich atmosphere. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, p. 405-412, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003.

FIK, M.; SUROWKA, K.; FIREK, B. Properties of refrigerated ground beef treated with potassium lactate and sodium diacetate **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 88, p. 91–99, 2008.

FU, Y. et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, Hoboken, v. 21, p. 989–994, 2007.

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T.; JAENICKKE, C. (Ed.). **Physicians Desk References (PDR) for herbal medicines**. New Jersey: Medical Economic, 2000.

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

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

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

JUKIC, M.; POLITEO, O.; MILOS, M. Chemical composition and antioxidant effect of free volatile aglycones from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) compared to its essential oil. **Croatica Chemica Acta**, v. 79, n. 2, p. 209-214, 2006.

KOTLOFF, K. L. et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bull WHO**, v. 77, p. 651-666, 1999.

LAMPEL, J.; MINTZBERG, H.; AHLSTRAND, B. **Safári de estratégia**. Porto Alegre: Bookman, 2000.

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

LIMA, M. da P. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v. 35, n. 3, p. 363-366, 2005.

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

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.

MUCHTARIDI, S. A.; APRIYANTONO, A.; MUSTARICHEN, R. Identification of compounds in the essential oil of nutmeg seeds (*Myristica fragrans* Houtt.) that inhibit locomotor activity in mice. **International Journal Molecular Science**, v.11, p. 4771-4781, 2010.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Condições higienicosanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 1893-1898, 2008.

OLIVEIRA, T. L. C.; SOARES, R. de 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**, Champaign, IL v. 93, p. 645-651, 2013.

OLIVEIRA, M. M. M.; PICCOLI, R. H.; BRUGNERA, D. F. Biofilms in the dairy industries: general aspects and the use of essential oils as a new control alternative. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, p. 65-73, 2013.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Essential oils of thyme and Rosemary in the control of *Listeria monocytogenes* in raw beef. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, p. 1181-1188, 2013.

OUSSALAH, M. et al. Inibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Thyphimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Phyladelphia, v.18, p. 412-420, 2007.

PARDI, M. C. et al. **Ciência e higiene da carne**: tecnologia da sua obtenção e transformação. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense. Editora Universitária, 2001. 623 p.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, Hoboken, v. 311, p. 808-811, 2006.

RADULOVIC, N. S.; BLAGOJEVIĆ, P. D.; MILTOJEVIĆ, A. B. α -Linalool – a marker compound of forged/synthetic sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils; **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 13, p. 3292-3303, Oct. 2013.

RIBEIRO, D. S. et al. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina**: ciências agrárias, Londrina, v. 33, n. 2, p. 687-696, abr. 2012.

SCHAECHTER, M. **Microbiologia**: mecanismos de doenças infecciosas. 3. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002.

SIMÕES, S C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

SIZER, F. S.; WHITNEY, E. N. **Nutrição**: conceitos e controvérsias. 8. ed. Barueri: Manole, 2003.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; NARAIM, N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente as perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 113, p. 38-42, 2003.

TINOCO, M. T.; MARTINS, M. R.; CRUZ-MORAIS, J. Actividade antimicrobiana do óleo essencial do *Foeniculum vulgare* Miller. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 30, n. 1, p. 448-454, Jan. 2007.

VERRUMA-BERNARDI, M. R. Avaliação da perda termica em diferentes tipos de carne bovina para elaboração de bifés. **Higiene Alimentar**, Sao Paulo, v. 15, p. 93, jan./fev. 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **General information related to foodborne disease**. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food and health in Europe: a new basis for action**. 2004. ((Regional Publications European Studies, 96).

Artigo 1

Atividade bactericida de óleos essenciais de plantas condimentares sobre
Shigella flexneri

Resumo

Os óleos essenciais são metabólitos secundários vegetais com diversas propriedades biológicas, dentre elas a atividade contra microrganismos, sendo esta de grande importância para a indústria de alimentos. A Concentração Mínima Inibitória (CMI), quantidade de óleo essencial necessária para inibir o crescimento microbiano, varia de acordo com o microrganismo-teste e com a composição química do óleo essencial. Nesse estudo, os óleos essenciais das plantas *Origanum vulgare*, *Myristica fragans*, *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum*, *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Cinnamomum zeylanicum* *Foeniculum vulgare dulce* foram analisados por CG-EM e suas CMI foram determinadas sobre *Shigella flexneri* ATCC 12022. Os óleos essenciais que apresentaram maior inibição foram o de *Syzygium aromaticum* (L.) Nerril (0,33%) e o de *Cinnamomum cassia* (0,65%). Os óleos de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e *Myristica fragans* apresentaram CIM na faixa de 5 a 10%. *Foeniculum vulgare Dulce*, *Rosmarinus officinalis* e *Ocimum basilicum* não apresentou inibição bacteriana em nenhuma das concentrações estudadas.

Palavras-chave: Antimicrobianos naturais, enterobacterias, óleos voláteis

Abstract

Essential oils are plant secondary metabolites with diverse biological properties, among them, the activity against microorganisms, which is of great importance to the food industry. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of essential oil amount necessary to inhibit microbial, growth varies according to the microorganism test and the chemical composition of the essential oil. In this study, the essential oils of *Origanum vulgare* plant, *Myristica fragrans*, *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum cassia* and *Foeniculum vulgare dulce* were analyzed by GC-MS and their MIC were determined on *Shigella flexneri* ATCC 12022. Essential oils that showed greater inhibition were of *Syzygium aromaticum* (L.) Nerril (0.33%) and of *Cinnamomum cassia* (0.65%). The oils of *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* and *Myristica fragrans* showed MIC in the range from 5 to 10%. *Foeniculum vulgare Dulce*, *Rosmarinus officinalis e Ocimum basilicum* showed no bacterial inhibition in any of the concentrations studied.

Key words: Natural antimicrobials, Enterobacteriaceae and volatile oils

1 INTRODUÇÃO

As infecções gastrointestinais constituem importante problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, acometendo principalmente crianças de pouca idade (KEUSH; BENNIS, 1989). *Shigella flexneri* é uma bactéria enteropatogênica, é responsável por aproximadamente 100 milhões de casos de disenteria grave a cada ano (Dragoi; Agaisse, 2013).

Bactérias do gênero *Shigella* são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Este gênero, característico do trato digestivo humano, é constituído por quatro espécies e cada uma possui um sorogrupo distinto sendo: *S. dysenteriae* (sorogrupo A), *S.*

flexneri (sorogrupo B), *S. boydii* (sorogrupo C) e *S. sonnei* (sorogrupo D) (FRANCO et al., 2003).

Shigella sp. é transmitida pela água contaminada por alimentos como saladas (batata, atum, camarão, macarrão e frango), vegetais crus, leite e produtos lácteos e carne principalmente a carne moída (SHAECHTER, 2002). A contaminação destes alimentos é geralmente por via fecal-oral. Duas espécies de *Shigella*, *S. flexneri* e *S. sonnei* na proporção de 3:1 estão envolvidas em surtos de toxinfecções alimentares, causando a shigelose (PEDRA, 1995).

De acordo com Centro de Controle de Doenças do Estado de São Paulo (2013) estima-se que shigelose seja responsável por cerca de 600.000 mortes e dois terços dos casos de diarreia no mundo. A maioria de mortes ocorre em crianças menores de 10 anos de idade, em locais com precárias condições de higiene e problemas de saneamento básico (SÃO PAULO, 2013)

A shigelose caracteriza-se por dor abdominal e cólica, diarreia com sangue, pus ou muco; febre, vômitos e tenesmo, em geral, iniciam-se um ou dois dias após a exposição às bactérias. Geralmente, trata-se de infecção auto limitada, durando de 4 a 7 dias. A infecção grave, com febre alta, pode estar associada com convulsões em crianças menores de 4 anos de idade. Algumas cepas são responsáveis por uma taxa de letalidade de 10 a 15% e produzem a enterotoxina tipo Shiga (semelhante à verotoxina da *E. coli* O157:H7), podendo causar a síndrome urêmica-hemolítica (SHU) e a doença de Reiter (artrite reativa) (CDC, 2013).

Por apresentar grande risco a saúde é de extrema importância seu controle. Nas indústrias de alimentos o controle de microrganismos patogênicos e deterioradores se dá empregando-se as boas práticas de fabricação, tendo grande importância o processo de sanificação de equipamentos e das mãos dos colaboradores e pela adição de conservantes aos alimentos. Contudo, trabalhos

mostram a ocorrência do aumento da resistência das bactérias aos agentes sanitizantes empregados comumente na indústria (BORGES et al., 2013). Já os conservantes químicos não são bem vistos pelos consumidores assim, antimicrobianos alternativos e ditos “naturais” são de grande interesse atualmente. Nesse contexto, os óleos essenciais têm se mostrado eficientes, tanto como sanitizante e desinfetante, quanto como conservante (OLIVEIRA et al., 2013a; OLIVEIRA et al., 2013b; OLIVEIRA et al., 2013c).

A *International Standard Organization* (ISO) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas mediante destilação por arraste a vapor de água, hidrodestilação bem como obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Entretanto, pode-se dizer, de forma geral, que os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SANTOS, 2007). Do ponto de vista químico, óleos essenciais constituem-se, principalmente de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanoides, metabólitos que conferem suas características organolépticas (BIZZO et. al., 2009).

Considerando o grande potencial antibacteriano existente nos óleos essenciais, objetivou-se determinar a concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de Óregano (*Origanum vulgare*), Noz Moscada (*Myristica fragans*), Tomilho Branco (*Thymus vulgaris*), Cravo Botão (*Syzygium aromaticum*), Canela Cássia (*Cinnamomum zeylanicum*), Funcho Doce (*Foeniculum vulgare dulce*), Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e Manjeriço (*Ocimum basilicum*) em cepas de *Shigella flexneri*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos Óleos Essenciais

Óleos essenciais de folhas de Orégano (*Origanum vulgare* L.), folhas e flores de Tomilho Branco (*Thymus vulgaris* L.); botões florais de Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Nerril); fruto de Noz Moscada (*Myristica fragans* Houtt.); sementes de Funcho Doce (*Foeniculum vulgare dulce*), partes aéreas (folhas, casca e talo) de Canela Cássia (*Cinnamomum cassia* Nees ex Blume), folhas de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e folhas de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) foram adquiridos da empresa Ferquima Industria e Comércio de Óleos Essenciais em Vargem Grande Paulista.

2.2 Microrganismos, manutenção, padronização e obtenção do inóculo

A bactéria utilizada foi *Shigella flexneri* ATCC 12022 doada pelo LABENT (Laboratório de Enterobactérias) da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). A cultura estoque foi 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 7,0). A cultura foi descongelada à temperatura ambiente e reativada inoculando-se alíquotas de 100 µL em tubos contendo 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubados a 37°C/24h. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento. Após a reativação, alíquota de 50 µL do inóculo foi transferida para 300 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubada a 37°C, sendo realizadas leituras periódicas (intervalos de trinta minutos) em espectrofotômetro (D.O.600 nm) e plaqueamento em Agar Triptona de Soja (TSA) com incubação a 37°C/24h. A cultura foi padronizada em 10^8 UFC mL⁻¹

2.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A concentração mínima inibitória dos óleos essenciais foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno

de 96 cavidades, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003) com adaptações.

Para tanto, soluções de TSB acrescidas de 0,5% de Tween 80 e de óleos essenciais foram obtidas nas seguintes concentrações (%): 0,08; 0,16; 0,33; 0,6; 1,2; 2,5; 5,0 e 10,0 (v/v). Foram adicionadas nas cavidades 150 µL das soluções e inoculados 10 µL da cultura padronizada. As placas foram vedadas e incubadas a 37°C/24h. Após esse período, foi realizada a leitura da absorbância (D.O. 620nm) e determinadas as concentrações dos óleos essenciais capazes de inibir o crescimento de *S. flexneri*, determinando-se assim, a concentração mínima inibitória.

O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições e utilizado o controle para cada óleo essencial contendo TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 e óleo essencial.

2.4 Análises químicas

As análises químicas do óleo essencial foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA. Estas foram realizadas em um sistema de cromatografia de fase gasosa 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 µL, no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. Empregou-se 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). 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. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, seguido por uma rampa de temperatura

de 3 °C/min até 240 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 280 °C. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados dos três constituintes de maior teor foram expressos pela média da porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos \pm o desvio padrão.

As análises por CG/EM 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 foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à série de *n*-alcanos (C₈-C₂₀) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação proposta por Van den Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; DAVIES, 1990).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais comerciais das plantas condimentares avaliados neste estudo demonstraram diferenças expressivas na inibição do crescimento de *S. flexneri*, uma das bactérias causadores de altos índices de toxinfecção alimentar. Os resultados de inibição do crescimento de *S. flexneri* pelos óleos essenciais avaliados estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 Concentrações mínimas inibitórias (CIM) *in vitro* de diferentes óleos essenciais de plantas condimentares sobre *S. flexneri*.

	CIM (%)							
	0,08	0,16	0,33	0,65	1,20	2,50	5,00	10,00

Óleo essencial								
<i>O. vulgare</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>M. fragans</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>T. vulgaris</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. aromaticum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. zeylanicum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>F. vulgare</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. officinalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>O. basilicum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) crescimento; (-) ausência de crescimento

A inibição do crescimento microbiano foi dependente do óleo e da concentração analisada. Os óleos de *S. aromaticum* e *C. zeylanicum* foram os que apresentaram melhor atividade, pois inibiram o crescimento microbiano a partir de 0,33% e 0,65%, respectivamente. Atividade antimicrobiana também foi observada para os óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris*, porém em concentrações igual ou superior a 5%. O óleo essencial de *M. fragans* promoveu inibição do crescimento de *S. flexneri* apenas na concentração de 10%. *F. vulgare*, *R. officinalis* e *O. basilicum* não inibiram o crescimento de *S. flexneri* nas concentrações avaliadas.

As diferenças observadas na atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, além da concentração, podem ser atribuídas à composição química. Os oito óleos essenciais comerciais adquiridos e analisados por CG-EM apresentaram marcantes diferenças na sua composição química. Os óleos de *S. aromaticum*, *C. zeylanicum* e *F. vulgare* apresentaram como constituintes majoritários, respectivamente, o eugenol (80,67%), o *E*-cinamaldeído (84,52%) e o *E*-anetol (77,89%), todos fenilpropanóides (Tabela 2). As propriedades do

óleo de *C. zeylanicum* tem sido investigadas incluindo o potencial antimicrobiano, atribuído ao cinamaldeído, constituinte presente em grandes quantidades (97,7%) de acordo com SINGH et al. (2007). Da mesma forma, o óleo essencial de *S. aromaticum* e seu principal constituinte, usualmente o eugenol, apresentaram significativa atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (CHAIEB et al., 2007).

A análise cromatográfica do óleo essencial de *M. fragans* indicou a presença majoritária de α e β -pineno (18,97% e 12,94%), sabineno (16,54%) e miristicina (15,10%). Já os constituintes majoritários dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris* foram os monoterpenos, carvacrol (73,11%) e timol (50,89%), respectivamente (Tabela 2).

TABELA 2. Composição química dos constituintes principais dos óleos essenciais empregados nos ensaios de inibição do crescimento *in vitro* de *S. flexneri*.

Óleo essencial	Constituinte (Área%±DP)		
<i>S. aromaticum</i>	eugenol (80,67±0,04)	acetato de eugenila (11,92±0,01)	<i>E</i> -cariofileno (5,51±0,03)
<i>C. zeylanicum</i>	<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)
<i>O. vulgare</i>	carvacrol (73,11±0,20)	<i>E</i> -cariofileno (4,32±0,04)	<i>p</i> -cimeno (3,92±0,04)
<i>T. vulgaris</i>	timol (50,89±0,31)	<i>o</i> -cimeno (24,97±0,30)	γ -terpineno (5,91±0,05)
<i>M. fragans</i>	pinenos (α) (18,47±0,08) (β) (12,94±0,04)	sabineno (16,54±0,04)	miristicina (15,10±0,08)
<i>F. vulgare</i>	<i>E</i> -anetol (77,89±0,10)	fenchona (5,16±0,03)	D-limoneno (4,66±0,02)
<i>R. officinalis</i>	1,8-cineol (48,74±0,54)	α -pineno (14,71±0,19)	canfora (14,03±0,13)
<i>O. basilicum</i>	estragol	1,8-cineol	α -bergamoteno

	(86,74±0,59)	(3,60±0,04)	(2,47±0,02)
--	--------------	-------------	-------------

DP = desvio padrão (n=3).

A composição química dos óleos essenciais de *R. officinalis* e *O. basilicum*, constituída principalmente por 1,8-cineol (48,74%) e estragol (86,74%) não foram efetivas para a inibição do crescimento de *S. flexneri*. Provavelmente, a menor atividade do óleo essencial de *R. officinalis* se deve ao seu alto teor de 1,8-cineol. Há relatos na literatura que óleos essenciais de *R. officinalis* ricos em α e β -pineno apresentaram melhor atividade antibacteriana, quando comparados a óleos ricos em 1,8-cineol (WANG, et al. 2012). No que se refere ao estragol, conforme relatado por ANGÉLICO (2011), esse constituinte apresenta baixa atividade contra bactérias Gram-negativas.

A atividade de diferentes concentrações de óleos essenciais de *T. vulgaris* e *R. officinalis* contra *Listeria monocytogenes* inoculada em carne bovina foi avaliada *in vitro* usando diluição em ágar e volatilização em disco. Neste estudo, os autores também observaram menor atividade para o óleo de *R. officinalis* (OLIVEIRA et al., 2013).

A porcentagem de área relativa total, dos constituintes identificados nos oito óleos essenciais analisados no presente estudo, compreendeu a faixa de 86,43% a 99,80%, e, foram caracterizados pela presença de constituintes das classes dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. *S. flexneri* foi mais sensível aos óleos essenciais ricos em fenilpropanóides com teores acima de 92,59%, os quais foram observados nos óleos essenciais de *S. aromaticum* e *C. zeylanicum* (Tabela 3). O óleo de *F. vulgare*, apesar de conter também alto teor de fenilpropanóides (77,89%), apresentou também razoável teor de monoterpenos (16,06%) (Tabela 3).

TABELA 3. Composição química das classes de constituintes químicos presentes nos óleos essenciais empregados nos ensaios de inibição do crescimento *in vitro* de *S. flexneri*.

Óleo essencial	Área%			
	MT	ST	FT	Total
Cravo	-	7,21	92,59	99,80
Canela	0,31	1,40	94,87	96,58
Orégano	83,94	4,32	-	88,26
Tomilho	92,22	-	-	92,22
Noz moscada	71,33	-	15,10	86,43
Funcho	16,06	-	77,89	93,95
Alecrim	94,98	1,19	-	96,17
Manjeriço	8,06	3,53	87,20	98,79

MT: monoterpenos totais; **ST:** sesquiterpenos totais; **FT:** fenilpropanóides totais. - = não detectado.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *S. aromaticum* para outros microorganismos, tais *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* já foi relatada (CHAIEB et al., 2007).

A menor sensibilidade de *S. flexneri* frente aos óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris* pode ter sido devido ao predomínio de monoterpenos ($\geq 83,94\%$) e ausência de fenilpropanóides. Ambos os óleos apresentaram elevados teores dos monoterpenos hidroxilados, carvacrol (73,11%) e timol (50,89%), respectivamente.

Conforme GUTIERREZ et al. (2008), a atividade antimicrobiana não depende apenas da composição química mas, também, das propriedades lipofílicas, da potência dos grupos funcionais, da solubilidade em água e da mistura de compostos com diferentes propriedades bioquímicas. Há evidências de que alguns componentes presentes em menor quantidade como γ -terpineno e *p*-cimeno interferem na atividade antimicrobiana por facilitar a permeabilidade do carvacrol e timol na célula bacteriana (SILVA et al., 2010; ROMERO et al., 2009). Estes óleos poderiam ser combinados a fim de alcançar um efeito sinérgico e reduzir as concentrações individuais necessárias para a atividade bactericida.

4 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *S. aromaticum*, *C. zeylanicum*, *O. vulgare* e *T. vulgaris* possuem atividade antimicrobiana *in vitro* contra *S. flexneri* e, portanto tem potencial de uso como conservantes de alimentos.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, FAPEMIG e CNPq pela concessão de bolsas de estudos e apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ANGÉLICO, Elissandra Couras; Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropiifolius* KUNTE e *Croton blanchetianus* BAILL; Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde Tecnologia Rural; Patos – PB, 2011.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M.J. SIMÕES, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4, 2013.

CDC. Salmonellosis-General Information. *Centers for Disease Control and Prevention*, 2013.

CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A.B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy Research**. v. 21, p. 501–506, 2007.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Atheneu: São Paulo, 2003.

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**, 124, 91-97, 2008.

KEUSH, G.T. & BENNIS, M.L.; **Shigellosis**: recente progress, Persisting problems and research issues; *Pediatric Infect Disease Journal*, 1989.

OLIVEIRA, Thales Leandro Coutinho ; SOARES, Rodrigo de Araújo ; Piccoli, Roberta Hilsdorf . A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella Enteritidis* in ground beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 93, p. 645-651, 2013. a

OLIVEIRA, MAÍRA MACIEL MATTOS ; Oliveira, Maíra Maciel Mattos de ; PICCOLI, R.H. ; Brugnera, Danilo Florisvaldo . Biofilms in the dairy industries: general aspects and the use of essential oils as a new control alternative. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, p. 65-73, 2013. b

OLIVEIRA, Maíra Maciel Mattos de ; BRUGNERA, D. F. ; PICCOLI, Roberta Hilsdorf . Essential oils of thyme and Rosemary in the control of *Listeria monocytogenes* in raw beef. **Brazilian Journal of Microbiology** (Impresso), v. 44, p. 1181-1188, 2013. c

ROMERO Adriano Lopes; SPECIAN Vânia; OLIVEIRA Rodrigo Cardoso; DINIZ Sergio Paulo Severo de Souza; Atividade do Óleo Essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris* L.) Contra Fungos Fitopatogênicos; **Ciênc. Biol. Saúde**. 2009

SCHAECHTER, M.; **Microbiologia: Mecanismos de doenças infecciosas**. 3ed, Ed. Guanabara Koogan, São Paulo-SP, 2002

SILVA, Janine Passos Lima, DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício, PEREZ, Daniel Vidal, FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo; Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella* Enteritidis, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2010.

WANG Wei, LI Nan, LUO Meng, ZU Yuangang, EFFERTH Thomas; Antibacterial Activity and Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Compared to That of Its Main Components; **Molecules**, 2012.

Artigo 2

Atividade anti-*Shigella flexneri* da combinação de óleos essenciais de plantas condimentares na segurança de carne moída *in natura*

Resumo

Bactérias do gênero *Shigella* são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. *Shigella* sp. é transmitida pela água contaminada e de alimentos como saladas, vegetais crus, leite e produtos lácteos e carne principalmente a carne moída e estão diretamente ligadas a surtos de toxinfecção alimentar de rápida progressão, difícil tratamento e fácil contágio. Contudo, trabalhos mostram a ocorrência do aumento da resistência das bactérias aos agentes sanitizantes empregados comumente na indústria. Já os conservantes químicos não são bem vistos pelos consumidores assim, antimicrobianos alternativos e ditos “naturais” são de grande interesse atualmente. Nesse contexto os óleos essenciais têm se mostrado interessantes, onde vários trabalhos têm mostrado sua eficiência tanto como sanificante e desinfetante quanto como conservante. Objetivou-se avaliar o potencial antibacteriano da combinação de óleos essenciais de plantas condimentares na conservação da carne moída contaminada por *Shigella flexneri*. Os óleos essenciais combinados de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum cassia* foram analisados por CG e CG-EM. Combinações dos óleos essenciais em diferentes concentrações foram incorporados a carne moída inoculada com *S. flexneri*. *S. flexneri* foi quantificada nos tempos de 0 h, 24 h e 48 h em meio *Shiguel*/*Salmonella*,

seguido de incubação por 24 h a 35 °C. As combinações dos óleos avaliados obtiveram êxito no controle de cepas de *Shigella flexneri*, o que sugere sua aplicação como potenciais adjuvantes na conservação de carne moída.

Palavras-chave: conservante alimentar; antimicrobianos naturais; constituintes voláteis.

Abstract

Bacteria of the genus *Shigella* are Gram-negative bacilli, non-spore forming, belonging to the *Enterobacteriaceae* family. *Shigella* sp. is transmitted by contaminated water and food such as salads, raw vegetables, milk and dairy and meat products mainly ground beef and are directly linked to outbreaks of food poisoning rapidly progressive, difficult to treat and easy contagion. However, studies show the occurrence of increased resistance of bacteria to sanitizers commonly used in the industry. Already chemical preservatives are not well regarded by consumers as well, alternative drugs and so-called "natural" are of great interest today. In this context the essential oils have proven popular, where several studies have shown its effectiveness both as a sanitizer, disinfectant and as a preservative. This study aimed to evaluate the antibacterial potential of combining essential oils of plants condiments conservation of ground beef contaminated with *Shigella flexneri*. Essential oils combined *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* were analyzed by GC and GC-MS. Combinations of essential oils in different concentrations were added to ground meat and then the meat was contaminated with *S. flexneri*. For bacterial counts dilutions in the 0 h, 24 h and 48 h and plating on medium Shigella / Salmonella, followed by incubation for 24 h at 35 ° C for counting the colonies were used. Combinations of oils evaluated succeeded in controlling strains of *Shigella flexneri*, suggesting its potential use as adjuvants in the storage of ground beef.

Keywords: preservative foods; natural antimicrobial agents; volatile constituents.

1. INTRODUÇÃO

O número crescente de surtos de doenças causadas por alguns microrganismos patogênicos em alimentos é uma preocupação tanto para consumidores quanto para a indústria (SHAN *et al.*, 2007). A incidência global das doenças de origem alimentar é difícil de estimar, porém foi relatado que no ano de 2005 aproximadamente 1,8 milhões de pessoas morreram de doenças diarreicas (WHO, 2007).

Métodos como o aquecimento, congelamento, secagem, liofilização, irradiação, elevação da pressão hidrostática, fermentação ou a adição de antimicrobianos e outros produtos químicos são usados para controlar a contaminação por microrganismos. Com esses tratamentos, populações de microrganismos são destruídas, outras podem sobreviver e outras podem ser parcialmente prejudicadas (WU *et al.*, 2001).

Com o propósito de reduzir os riscos à saúde e prejuízos econômicos gerados pelos microrganismos que contaminam alimentos, o uso de compostos antibacterianos naturais tem se mostrado alternativa promissora (SMID; GORRIS, 1999; FU *et al.* 2007; OUSSALAH *et al.*, 2007). Elementos vegetais que se apresentavam apenas como vetores de aromas e sabores característicos, agora apresentam nova perspectiva de uso (SOUZA *et al.*, 2003). Dentre esses produtos naturais destacam-se os óleos essenciais como compostos ativos com potencial de uso na preservação de alimentos (DEVLIEGHERE *et al.*, 2004).

Óleos essenciais são metabólitos secundários de diversas espécies vegetais, voláteis, de consistência oleosa, obtidos de material de plantas como folhas, flores, botões, sementes, ramos, casca, ervas, madeira, frutas e raízes.

São substâncias que além de utilização medicinal, entram na composição de perfumes, aromatizantes e outros produtos (BURT, 2004).

A atividade antibacteriana de um dado óleo essencial é dependente da composição química qualitativa e quantitativa do óleo, do tipo de microrganismo em questão, da composição do substrato, do processamento e da condição de estocagem (BERTINI *et al.*, 2005).

Atualmente, o consumo de produtos cárneos de fácil preparo ou prontos para o consumo tais como almondegas, hambúrgueres, empanados, linguiças, mortadelas, salames, entre outros tem se tornado bastante comum. Entretanto, as carnes merecem destaque porque estão frequentemente envolvidas em surtos de toxinfecções alimentares, por possuírem elevada atividade de água, pH favorável ao crescimento de microrganismos e elevado percentual de proteínas, minerais e vitaminas, tornando-as excelentes meios de cultura para desenvolvimento de patógenos e deteriorantes (CARDOSO; ARAUJO, 2003).

A contaminação microbiológica da carne moída é mais problemática que as carnes em corte, pelo fato de sofrerem maiores manipulações e apresentar maior relação área/volume. Além disso, devido sua elevada manipulação, a carne moída pode ser contaminada com bactérias causadoras de toxinfecções alimentares.

Desta forma, objetivou-se avaliar o potencial antimicrobiano de misturas dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L., *Thymus vulgaris* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Nerril e *Cinnamomum cassia* Nees ex Blume sobre *Shigella flexneri* inoculada em carne moída.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Óleos essenciais e caracterização química

Foram utilizados os óleos essenciais de folhas de Orégano (*Origanum vulgare* L.), folhas e flores de Tomilho Branco (*Thymus vulgaris* L.); botões florais de Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Nerril) e partes aéreas (folhas, casca e talo) de Canela Cássia (*Cinnamomum cassia* Nees ex Blume), puros e combinados. Todos os óleos foram adquiridos da empresa Ferquima Industria e Comércio de Óleos Essenciais em Vargem Grande Paulista-SP.

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. As análises foram realizadas em sistema de cromatografia de fase gasosa 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 os óleos essenciais combinados, em acetato de etila (1%, v/v). O volume de injeção foi de 1,0 µL, no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. Empregou-se 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). 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. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 240 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 280 °C. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados dos constituintes principais foram expressos pela média da porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos ± o desvio padrão. Constituintes químicos com área porcentual relativo menor ou igual a 1% foram desconsiderados na análise.

As análises por CG/EM 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 foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à série de *n*-alcanos (C₈-C₂₀) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação proposta por Van den Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007).

2.2 Microrganismo, manutenção, padronização e obtenção do inóculo

A bactéria utilizada foi *Shigella flexneri* ATCC 12022 doada pelo LABENT (Laboratório de Enterobactérias) da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). A cultura estoque foi congelada 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 7,0). A cultura foi descongelada à temperatura ambiente e reativada inoculando-se alíquotas de 100 µL em tubos contendo 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubados a 37°C/24h. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento. Após a reativação, alíquota de 50 µL do inóculo foi transferida para 300 mL de Caldo Tripton de Soja (TSB) e incubada a 37°C, sendo realizadas leituras periódicas (intervalos de uma hora) em espectrofotômetro (D.O.600 nm) e plaqueamento em Agar Tripton de Soja (TSA) com incubação a 37°C/24h. A cultura foi padronizada em 10⁸ UFC mL⁻¹

2.3 Ação bactericida *in vitro* das combinações de óleos essenciais sobre *Shigella flexneri*

Os óleos essenciais de folhas de orégano (*Origanum vulgare* L.), folhas e flores de tomilho branco (*Thymus vulgaris* L.); botões florais de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Nerril) e partes aéreas (folhas, casca e talo) de canela Cássia (*Cinnamomum cassia* Nees ex Blume) foram combinados, três a três, nas proporções descritas na Tabela 1. As proporções estão expressas em porcentagem relativa a concentração mínima inibitória (CMI) de 5,00% para os óleos de *T. vulgaris* e *O. vulgare*; 0,60% de *C. zeylanicum* e 0,33% de *S. aromaticum*. As combinações avaliadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 1. Planejamento experimental para avaliação da atividade bactericida *in vitro* contra *Shigella flexneri* de óleos essenciais combinados três a três.

Ensaio	Óleo A	Óleo B	Óleo C
	CMI (%) [*]		
1	100	-	-
2	-	100	-
3	-	-	100
4	50	50	-
5	50	-	50
6	-	50	50
7	67	17	17
8	17	67	17
9	17	17	67
10	33	33	33

* Porcentagem relativa a concentração mínima inibitória (CMI) de 5,00% para os óleos de *T. vulgaris* e *O. vulgare*; 0,60% de *C. zeylanicum* e 0,33% de *S. aromaticum*.

Tabela 2. Combinação dos óleos essenciais para avaliação da atividade bactericida *in vitro* contra *Shigella flexneri*.

Tratamentos	Combinação dos óleos essenciais		
	Óleo A	Óleo B	Óleo C
1	Óregano	Tomilho	Canela
2	Óregano	Tomilho	Cravo
3	Óregano	Canela	Cravo
4	Tomilho	Canela	Cravo

A atividade antimicrobiana das diferentes combinações dos óleos essenciais foi avaliada em placas de poliestireno de 96 cavidades. Para tanto, foram adicionadas nas cavidades 150 µL de soluções de TSB acrescidas de 0,5% de Tween 80 e combinações dos óleos essenciais e inoculados 10 µL da cultura padronizada. As placas foram vedadas com parafilme e incubadas a 37°C por 24h. Após esse período, foi realizada a leitura em leitor de Elisa com monocromador Epoch® a 620 nm e analisados com *software* Gen5®.

O experimento foi feito em triplicata, contendo três repetições por tratamento, totalizando 36 leituras/tratamento.

2.4. Ação bactericida das combinações de óleos essenciais sobre *Shigella flexneri* em carne moída

Carne bovina *in natura*, corte patinho, foi adquirida no comércio de Lavras/MG. A carne foi moída em multiprocessador previamente sanitizado com álcool 70%.

As combinações dos óleos essenciais descritas na Tabela 3 foram incorporadas em porções de 25g de carne moída acondicionadas em sacos plásticos estéreis. As combinações dos óleos foram misturados a carne em homegenizador tipo Stomacher (490 golpes/min.) por 3 mim. Após homogeneização as porções foram inoculadas com 250µL de cultura padronizada de *Shigella flexneri* e, novamente, homogeneizadas. Além dos

tratamentos descritos na Tabela 3 foram realizados os ensaios controles: (1) somente carne moída (controle negativo) e (2) carne moída + 250 μ L de cultura padronizada. Os tratamentos e controles foram armazenados a 12°C em B.O.D. por 48h.

O experimento foi feito em triplicata, contendo 6 tratamentos constituídos de três repetições cada.

Tabela 3. Combinação e volume dos óleos essenciais utilizados na avaliação da atividade bactericida *in situ* contra *Shigella flexneri* inoculada em 25g de carne moída.

Tratamentos	Combinação dos óleos essenciais (volume de óleo – mL)			Volume total de óleo (mL)
	1	Óregano (0,41)	Tomilho (0,41)	
2	Orégano (0,21)	Tomilho (0,21)	Cravo (0,06)	0,48
3	Orégano (0,21)	Canela (0,28)	Cravo (0,05)	0,54
4	Tomilho (0,21)	Canela (0,03)	Cravo (0,06)	0,30

2.5 Enumeração de *Shigella flexneri* em carne moída

A quantificação de *S. flexneri* em carne moída foi realizada após 0; 24 e 48 horas de armazenamento. Às porções de 25 g de carne foram adicionados 225 mL de água peptonada (0,1%) e homogeneizados em homogeneizador tipo Stomacher (490 golpes/min.) por 3 min. Foram realizadas cinco diluições seriadas na proporção de 1:10 em água peptonada (0,1%) e alíquotas de 0,1mL das diluições foram transferidas para placas contendo ágar Shigella/Salmonella (SS), empregando-se a técnica de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas a 37°C em B.O.D. por 24h. Os ensaios foram realizados em triplicata com três repetições.

2.6. Análise estatística

Os resultados da ação antimicrobiana das combinações dos óleos essenciais foi submetida a Análise de Componente Principal (PCA-Principal Component Analysis). A PCA foi aplicada aos valores das concentrações dos óleos essenciais em cada combinação, sendo realizada a PCA para cada óleo dentro das combinações. Os dados foram pré-processados empregando-se auto escalonamento e os resultados foram expressos por um gráfico do escore e do peso, com duas componentes principais (PC) explicadas pelas suas variâncias. Os cálculos foram feitos no *software* “MATLAB[®]7.5” (2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais individuais contêm complexa composição que, quando combinados entre si, podem levar a efeitos aditivos, sinérgicos e antagônico. Com o propósito de explorar a possibilidade de reduzir os impactos indesejáveis dos óleos essenciais nas propriedades sensoriais da carne moída foi proposto um estudo de sinergismo entre óleos essenciais. Os óleos que apresentaram, em estudo anterior, menores concentrações inibitórias *in vitro* sobre *S. flexneri* foram selecionados para os ensaios.

A atividade antimicrobiana *in vitro* e *in situ* das combinações de *S. aromaticum*, *C. zeylanicum*, *T. vulgaris* e *O. vulgare* não foram relatadas para *S. flexneri*. Todas as combinações utilizadas nas diferentes proporções foram efetivas na inibição do crescimento *in vitro* de *S. flexneri* (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de (O) *O. vulgare*, (T) *T. vulgaris*, (Ca) *C. zeylanicum* e (Cr) *S. aromaticum* em diferentes combinações e proporções sobre *Shigella flexneri*.

Combinações (%)*	O/T/Ca	O/T/Cr	O/ Ca/Cr	T/Ca/Cr
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	-	-	-	-

(+) crescimento; (-) ausência de crescimento. * Porcentagem relativa a concentração mínima inibitória (CMI) de 5,00% para os óleos de *T. vulgaris* e *O. vulgare*; 0,60% de *C. zeylanicum* e 0,33% de *S. aromaticum*.

Diante desse resultado, para os estudos *in situ* foram selecionadas as combinações que reuniram as tríades de óleos essenciais. Igualmente, todos os tratamentos foram efetivos sobre o crescimento *in situ* de *S. flexneri* inoculada em carne moída (Tabela 5). As amostras do controle negativo (sem inóculo e óleos essenciais) não apresentaram crescimento bacteriano, comprovando a inexistência de contaminação por *S. flexneri*. No controle positivo (ausência de óleos essenciais) houve crescimento de número considerável de células viáveis de *S. flexneri* ($\geq 85 \times 10^2$). Conforme, ALBUQUERQUE (2006) é necessário uma concentração de 10^2 células de *Shigella* para existência de surto infeccioso.

Tabela 5. Quantificação média do número de células viáveis de *Shigella flexneri* inoculada em carne moída adicionada de diferentes combinações de óleos essenciais de plantas condimentares após 0, 24 e 48 h de armazenamento a 12°C.

Tratamento ¹	Tempo		
	0 h	24 h	48 h
T ₁	2,0x10 ³ UFC	-	-
T ₂	-	-	-
T ₃	-	-	-
T ₄	-	-	-
Controle (-)	-	-	-
Controle (+)	8,5 x 10 ³	9,2 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁵

¹ Vide Tabela 3 para identificar os tratamentos.

Apenas o tratamento que combinou *O. vulgare* (33%) + *T. vulgare* (33%) + *C. zeylanicum* (33%) houve crescimento de 20×10^2 /UFC no tempo 0 h, o que demonstra efeito bactericida tardio dessa mistura de óleos essenciais. Nos demais tratamentos não houve crescimento de *S. flexneri* desde a inoculação até às 48 h de armazenamento da carne a 12 °C, evidenciando efeito bactericida imediato sobre o microrganismo.

Considerando o propósito de reduzir a concentração de óleos essenciais por sinergismo, o tratamento que utilizou a menor concentração de óleo essencial foi a combinação T4 [*T. vulgare* (17%) + *C. zeylanicum* (17%) + *S. aromaticum* (67%)] que totalizou um volume de 0,30 mL. Adicionalmente, observou-se que esse tratamento não comprometeu a textura e coloração visual da carne moída. As análises por CG-EM das combinações dos óleos essenciais identificaram 8 a 11 constituintes presentes, caracterizados por terpenos e compostos fenólicos. Mais de 90% da composição química total das combinações dos óleos essenciais foram identificados. Todas as combinações apresentaram teores de monoterpenos acima de 60% (Tabela 6).

A conservação visual da carne moída no tratamento T4 pode ser atribuída ao alto teor de timol (32,78%) e eugenol (15,53%) presente nessa

combinação, pois de acordo com RÉ e JORGE (2012) esses constituintes possuem propriedades antioxidantes semelhantes ao butil-hidroxi-tolueno (BHT) e α -tocoferol.

A superioridade do tratamento T4 também pode estar relacionada a presença de teores consideráveis de *p*-cimeno (19,04%) e γ -terpineno (5,16%). Há evidências de que alguns componentes presentes, como *p*-cimeno e γ -terpineno interferem na atividade antimicrobiana por produzirem efeitos sinérgicos com compostos fenólicos (SILVA et al., 2010). Parece que o *p*-cimeno, possui efeitos antimicrobianos fracos, porém auxilia no transporte de compostos hidroxilados através da membrana celular das bactérias (GUTIERREZ et al., 2008).

A eficiência do tratamento T4 determinada pela atividade anti-*Shigella in situ* e observada visualmente ainda pode ser conferida pela maior complexidade da combinação dos óleos essenciais (11 constituintes identificados) (Tabela 6).

Comparando os resultados do tratamento T3 [*O. vulgare* (17%) + *C. zeylanicum* (17%) + *S. aromaticum* (17%)] com os demais, observou-se o escurecimento visual da carne moída durante o período do ensaio. Esse fato poderia ser relacionado ao baixo teor de timol (2,22%) presente nessa combinação, já que os outros tratamentos apresentaram teores de timol acima de 20%.

Tabela 6 Composição química dos constituintes principais das misturas de óleos essenciais empregados nos ensaios de inibição do crescimento *in situ* de *S. flexneri*.

Constituinte	IR ^a	Área (%) ± DP			
		T1	T2	T3	T4
α-pineno	942	-	1,22±0,05	-	1,77±0,08
β-pineno	947	-	-	1,07±0,02	-
<i>p</i> -cimeno	1023	-	-	3,22±0,17	19,04±0,59
<i>o</i> -cimeno	1024	14,78±0,34	13,44±0,44	-	-
γ-terpineno	1056	5,06±0,10	-	2,51±0,06	5,16±0,16
α-terpineno	1058	-	4,70±0,08	-	-
linalol	1100	3,55±0,05	3,27±0,04	1,75±0,04	3,63±0,08
canfora	1144	1,06±0,01	1,00±0,01	-	1,03±0,02
<i>E</i> - cinamaldeído	1274	4,70±0,07	-	8,30±0,99	9,56±0,81
timol	1294	34,98±0,50	20,92±0,76	2,22±0,14	32,78±0,65
carvacrol	1300	23,31±0,08	34,84±1,49	52,98±0,86	1,85±0,21
eugenol	1362	-	9,17±0,41	15,80±0,34	15,53±1,25
β-cariofileno	1417	2,47±0,01	3,01±0,03	3,75±0,05	2,24±0,06
acetato de eugenol	1528	-	1,10±0,04	2,56±0,16	2,69±0,19
Monoterpenos totais		82,74	79,39	63,75	65,26
Sesquiterpenos totais		2,47	3,01	3,75	2,24
Fenilpropanóides totais		4,70	10,27	26,66	27,78
Total identificado		90,00	92,67	94,16	95,28
Numero de compostos identificados		8	10	10	11

a Índice de retenção relativo a série de *n*-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS na ordem de eluição.

- não detectado. DP: desvio padrão (*n*=3).

Os efeitos inibitórios do crescimento *in situ* nas carnes moídas tratadas com as combinações dos tratamentos T1 [*O. vulgare* (33%) + *T. vulgaris* (33%) + *C. zeylanicum* (33%)] e T2 [*O. vulgare* (17%) + *T. vulgaris* (17%) + *S. aromaticum* (67%)] podem estar relacionadas a ação sinérgica de timol e carvacrol, afirmativa esta confirmada por GARCIA-GARCIA (2011). Este autor

relata que combinações binárias entre estes dois constituintes em diferentes concentrações alcançaram atividade bactericida evidenciando o efeito sinérgico.

A análise de PCA mostrou diferenças marcantes da contribuição dos óleos essenciais sobre a atividade anti-*Shigella flexneri* (figura 1)

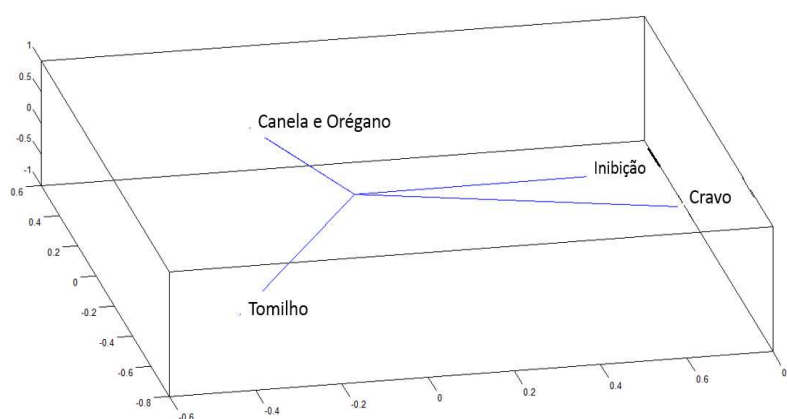


Figura 1 - Representação gráfica da Análise de Componente Principais (PCA) da atividade antimicrobiana das diferentes combinações dos óleos essenciais de orégano, tomilho, cravo da Índia e canela sobre a inibição do crescimento de *Shigella flexneri*.

No gráfico de escores, pode-se observar a separação marcante do óleo de *S. aromaticum* em relação aos demais. Este resultado evidenciou que nas combinações dos óleos essenciais, o óleo essencial de *S. aromaticum* foi o que mais contribuiu na inibição do crescimento de *S. flexneri*. Observa-se também que os óleos de *c. zeylanicum* e *O. vulgare* apresentam o mesmo peso. Já o óleo de *T. vulgaris* foi o que apresentou menor contribuição para o efeito antimicrobiano contra *S. flexneri*.

4 CONCLUSÃO

As misturas de óleos essenciais aplicadas em carne moída apresentaram efeitos sinérgicos suficientes conseguindo reduzir a concentração dos óleos essenciais de forma individual sem comprometer sua atividade biológica. Tal resultado comprova que tais misturas podem ser aplicadas como conservante em carne moída contra a bactéria *Shigella flexneri*.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, FAPEMIG e CNPq pela concessão de bolsas de estudos e apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

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

Albuquerque, J.A.T., **Análise comparativa da transcrição de genes envolvidos na invasão e escape de *Escherichia coli* enteroinvasora e *Shigella flexneri* em macrófagos**, Dissertação (mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2006.

BERTINI, L. M., PEREIRA, A. F., OLIVEIRA, C. L. L., MENEZES, E. A., MORAIS, S. M., CUNHA, F. A., & CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, 17, p.80-83, 2005.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, 94, p. 233-253, 2004.

CARDOSO, L. & ARAUJO, W. M. C. Parametros de qualidade em carnes comercializadas no Distrito Federal no periodo de 1997 – 2001. **Higiene Alimentar**, 17, p.12-18, 2003.

DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methylsilicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 503, p. 1-24, 1990.

DEVLIEGHERE, F., VERMEULEN, A., DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, 21, p. 703–714, 2004.

FU, Y.; ZU, Y.; CHEN, L.; SHI, X.; WANG, Z.; SUN, S.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**. v. 21, p. 989–994, 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**, 124, 91-97, 2008.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. (1998) PC version of the NIST/EPA/NIH mass spectral database: *software*. Gaithersburg.

OUSSALAH, M, CAILLET, S, SAUCIER, L, and LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Thyphimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, 2007.

RÉ, P.V.; JORGE, N., Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde, **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.2, p.389-399, 2012.

SILVA, Janine Passos Lima, DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício, PEREZ, Daniel Vidal, FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo; Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella* Enteritidis, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2010.

SOUZA, E. L., LIMA, E. O., NARAIM, N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente as perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene Alimentar**, 17, no113, p. 38-42, 2003.

WHO. Food and Health in Europe: a new basis for action. Regional Publications European Studies. *World Health Organization*, 96, 2007.