

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPECIARIAS
PARA CONTROLE DE COLIFORMES EM
LINGUIÇA TOSCANA**

TESE DE DOUTORADO

Deise Flores Santurio

Santa Maria, RS, Brasil

2015

USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPECIARIAS PARA CONTROLE DE COLIFORMES EM LINGUIÇA TOSCANA

Deise Flores Santurio

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Leadir Lucy Martins Fries

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santurio, Deise Flores
 Uso de óleos essenciais de especiarias para controle
 de coliformes em linguiça toscana. / Deise Flores
 Santurio.-2015.
 61 f.; 30cm

Orientadora: Leadir Lucy Martins Fries
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
 Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
 Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2015

1. Óleos essenciais 2. Escherichia coli 3. Linguiça 4.
 Antimicrobiano 5. Alimentos I. Fries, Leadir Lucy
 Martins II. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Deise Flores Santurio. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: deisesanturio@ibest.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPECIARIAS PARA
CONTROLE DE COLIFORMES EM LINGUIÇA TOSCANA**

elaborada por
Deise Flores Santurio

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

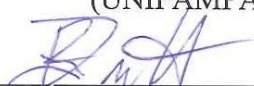
COMISSÃO EXAMINADORA:



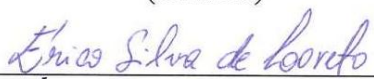
Leadir Lucy Martins Fries, Dra.
(Presidente/Orientador)




Cleci Menezes Moreira, Dra.
(UNIPAMPA)



Régis Adriel Zanette, Dr.
(UFRGS)



Érico Silva de Loreto, Dr.
(UFSM)



Sydney Hartz Alves, Dr.
(UFSM)

Santa Maria, 17 de julho de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e estar presente em mais este obstáculo.

Aos meus pais Janio e Cléris pela dedicação, carinho, amor, incentivo e ensinamentos.

Ao meu esposo Marcelo pelo amor dedicado.

A minha irmã Roberta e meu cunhado Nilmar pelo apoio e a pequena Lorena pela sempre demonstração de carinho.

A minha orientadora Professora Leadir Lucy Martins Fries por sua amizade, disponibilidade, paciência e confiança.

Aos colegas do LAPEMI, pelo apoio durante esses anos. Em especial, a Francielli Pantella Kunz de Jesus e Régis Adriel Zanette pela ajuda prestada.

As colegas de pós-graduação Marcela Soquetta e Cristiane Copetti pelo auxílio na realização dos trabalhos.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos pelos serviços prestados.

A Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de realização desta pesquisa.

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

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPECIARIAS PARA CONTROLE DE COLIFORMES EM LINGUIÇA TOSCANA

AUTORA: DEISE FLORES SANTURIO
ORIENTADORA: LEADIR LUCY MARTINS FRIES
Santa Maria, 17 de julho de 2015.

A deterioração de produtos alimentares, especialmente aqueles derivados de carne, por microrganismos patogênicos é um grande problema na indústria. *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa de origem intestinal, e é um motivo de preocupação no setor de carnes. Neste contexto, os óleos essenciais com suas propriedades antimicrobianas, seriam uma forma natural de contribuir com a redução da deterioração. Neste estudo avaliou-se a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e seus componentes, *in vitro*, frente a 20 espécies de *Escherichia coli* de origem entérica, pertencente a coleção de bactérias do Laboratório de Pesquisas Micológicas da UFSM, usando a técnica de microdiluição de acordo com o protocolo M31-A3. O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), e timol, óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), e cinamaldeído e óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) e carvacrol, foram os óleos essenciais e seus componentes majoritários utilizados. Nestes testes, os óleos essenciais apresentaram melhores resultados em relação aos seus respectivos compostos. As médias geométricas de CIMs (concentrações inibitórias mínimas) e CBMs (concentrações bactericidas mínimas) para os óleos essenciais de orégano, canela e tomilho não evidenciaram diferença significativa ($p > 0,05$). Ainda avaliou-se a atividade antimicrobiana dos mesmos, nas concentrações de $8000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $3200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ adicionados em massa de linguiça Toscana, inoculada com *Escherichia coli* ATCC 25922 ($10^3 \text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$). As análises foram realizadas no período de 0, 10, 15, 20 e 30 dias, usando a técnica 3M Petrifilm placa para contagem de *E.coli* e coliformes (AOAC 991.14). Nos 30 dias de armazenamento da massa de linguiça Toscana, houve uma redução na contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes com adição dos óleos essenciais em diferentes concentrações. Os óleos essenciais de canela e tomilho foram eficientes no controle de coliformes a partir da concentração de $1600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, enquanto que o óleo essencial de orégano foi eficiente desde a concentração de $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. A análise sensorial demonstrou que a linguiça Toscana adicionada do óleo essencial de canela e óleo essencial de orégano nas concentrações de $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, foi considerada aceitável pelos consumidores.

Palavras-chave: Óleos essenciais. *Escherichia coli*. Linguiça. Antimicrobiano. Alimentos.

ABSTRACT

Thesis of Doctorate
Post-Graduate Program of Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

THE USE OF ESSENTIAL OILS EXTRACTED FROM SPICES IN ORDER TO CONTROL COLIFORMS IN TOSCANA SAUSAGE

AUTHOR: DEISE FLORES SANTURIO
ADVISER: LEADIR LUCY MARTINS FRIES
Santa Maria, July 17th, 2015.

The food products deterioration by pathogenic microorganisms is a major problem especially in meat industries. *Escherichia coli* is a facultative anaerobic bacteria of intestinal origin, and is a cause of concern in the meat industry. The use of essential oils as inhibitors of growth of spoilage and pathogenic microorganisms is a good natural choice contributing for the reduction of food deterioration. This study aimed to evaluate twenty (20) in vitro activities of *E. coli* strains retrieved from the collection of bacteria of Laboratório de Pesquisas Micológicas of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). The microdilution methodology was applied following the M31-A3 technique protocols. Thymol and the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*), cinnamaldehyde and the essential oil of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), carvacrol and the essential oil of oregano (*Origanum vulgare*) were the main oils used along with their components. In these tests, the essential oils presented better results than its constituents. Besides, in vitro tests had been carried out with the same isolate in order to evaluate the antimicrobial activity of the thyme, cinnamon and oregano essential oils. The geometric means of the MIC (minimum inhibitory concentration) and MBC (minimal bactericidal concentration) for the essential oils of oregano, cinnamon and thyme did not show relevant differences ($p > 0.05$). Afterwards, the activities of these oils were evaluated against the growth of coliforms in the Toscana sausage mass. The samples (Toscana sausage mass added with the essential oils) to the concentrations of $8000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $3200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, with the addition of the strain (*Escherichia coli*) 10^3 UFC/m. The samples were stored at 5°C and the analysis occurred in the periods of 0, 10, 15, 20 e 30 days using the 3M technique Petrifilm dish for counting the *E.coli* and coliforms (AOAC 991.14). During the 30 days storage of the Toscana sausage mass, there was a reduction in the counting of total coliforms and the thermotolerant coliforms with addition of essential oils in different concentration levels. The sensory analysis of the Toscana sausage added with the essential oils of cinnamon and oregano in the concentration of $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ were considered as acceptable by the consumers.

Keywords: Essential oils. *Escherichia coli*. Sausage. Antimicrobial. Food.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1.	Chemical composition and yield percentage of the essential oil of thyme.....	22
Tabela 2.	Antimicrobial activity ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) of thymol and the essential oil of thyme against twenty <i>Escherichia coli</i> strains	22

Artigo 2

Tabela 1.	Cromatograma do óleo essencial de canela	28
Tabela 2.	Cromatograma do óleo essencial de orégano	28
Tabela 3.	Atividade antimicrobiana ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) dos óleos essenciais de orégano e canela e compostos cinamaldeído e carvacrol contra <i>Escherichia coli</i> spp.	29

Artigo 3

Tabela 1.	Formulação da Linguiça Toscana (controle)	40
Tabela 2.	Cromatograma do OE de canela	43
Tabela 3.	Cromatograma do OE de orégano	43
Tabela 4.	Cromatograma do OE de tomilho.....	43
Tabela 5.	Atividade antimicrobiana ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) dos óleos essenciais de orégano, canelatomilho contra isolados de <i>Escherichia coli</i>	44
Tabela 6.	Contagem média de coliformes totais (UFC/g) na massa de linguiça frescal e adicionadas dos óleos essenciais nas concentrações de 200 a 8000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ durante o período de armazenamento a 5°C	45
Tabela 7.	Contagem de coliformes termotolerantes na massa de linguiça frescal e adicionadas dos óleos essenciais nas concentrações de 200 a 8000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ durante o período de armazenamento a 5°C	47
Tabela 8.	Médias das notas atribuídas para as cinco amostras de linguiça pelo teste afetivo da escala hedônica	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo geral	11
2.2	Objetivos específicos	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	<i>Escherichia coli</i> : Aspectos microbiológicos.....	12
3.2	Óleos essenciais.....	12
3.3	Composição dos óleos essenciais	13
3.4	Aplicações dos óleos essenciais	14
3.5	Atividade antibacteriana dos óleos essenciais	14
3.6	Aplicação dos óleos essenciais em carnes e produtos cárneos.....	15
3.7	Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais	17
3.8	Embutidos frescais	18
4	ARTIGOS	20
4.1	Artigo 1: Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Thyme and of Thymol agaist <i>Escherichia coli</i> Strains	20
4.2	Artigo 2: Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleo essenciais de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> , <i>Origanum vulgare</i> , cinamaldeído e carvacrol contra <i>Escherichia coli</i>	24
4.3	Artigo 3. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, canela e tomilho <i>in vitro</i> e em Linguiça Toscana contra coliformes totais e termotolerantes.....	35
5	CONCLUSÃO GERAL	55
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos vem sendo usados procedimentos químicos e físicos como proteção contra esporos e patógenos de alimentos (BENKEBLIA, 2004). Conservação de alimentos tem sido um desafio, devido ao aparecimento de novos alimentos no mercado, que requerem estabilidade na estocagem e proteção contra microrganismos (MARINO et al., 2001, BURT, 2004). A conservação da carne envolve a aplicação de medidas para retardar ou prevenir alterações microbiológicas, químicas ou físicas que a tornam imprópria para o consumo ou que reduzem alguns aspectos da sua qualidade. Apesar de os vários tipos de alterações serem significativos, a deterioração microbiológica é a mais importante e geralmente precede os outros tipos de deterioração da carne (KINSMAN et al., 1994). A *Escherichia coli* patogênica pode ser veiculada por meio de alimentos contaminados, sendo capaz de ocasionar desde leve diarreia até doenças graves como a síndrome urêmica hemolítica, dependendo do sorogrupo incriminado. Os manipuladores de alimentos podem desempenhar importante papel na transmissão de enfermidades veiculadas por alimentos, tanto por hábitos inadequados de higiene pessoal, ou por serem portadores de microrganismos patogênicos. Os equipamentos e utensílios mal higienizados, assim como os vetores e pragas, também contribuem para a contaminação dos produtos industrializados (FRANCO et al., 2010). Tal como ocorre com todas as bactérias, a sobrevivência e crescimento de *E. coli* em alimentos é dependente da interação de vários parâmetros intrínsecos e extrínsecos, tais como temperatura, irradiação, pH, atividade de água, ingredientes de cura e competição com outros microrganismos (VARNAM & EVANS, 1996; BUCHANAN; DOYLE, 1997).

As linguiças constituem os derivados cárneos fabricados em maior quantidade no Brasil, pois sua elaboração, além de não exigir tecnologias sofisticadas, utiliza poucos e baratos equipamentos. Por ser um produto fresco, a linguiça não sofre tratamento térmico que reduza a sua microbiota e, aliada à sua alta atividade de água, possui pequeno prazo de validade comercial, apesar da utilização do frio para sua conservação (TERRA, 1998; BEZERRA et al., 2007). Consumidores têm exigido alimentos naturais caracterizados por terem baixos níveis ou serem livres de aditivos químicos e baixo impacto no ambiente (BURT, 2004).

Nesse contexto, o uso alternativo de produtos naturais obtidos de plantas tem tido mais atenção, principalmente porque esses produtos possuem propriedades funcionais adicionais.

Entre antimicrobianos naturais, os óleos essenciais vem sendo muito estudados. Esses possuem ação contra microrganismos esporulados e patógenos de alimentos (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004). A atividade antimicrobiana de óleos de plantas e extratos tem tido muitas aplicações, incluindo conservação de alimentos crus e processados, produtos farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais (HAMMER et al., 1999).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), tomilho (*Thymus vulgaris*) sobre o patógeno *Escherichia coli* inoculado em massa de linguiça Toscana.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima, a partir de microdiluição em caldo, dos óleos essenciais de orégano, canela, tomilho e três componentes encontrados em óleos essenciais timol, carvacrol, cinamaldeído sobre *Escherichia coli in vitro*.
- Determinar a concentração bactericida mínima dos óleos essenciais de orégano, canela e tomilho e de três componentes encontrados em óleos essenciais timol, carvacrol, cinamaldeído sobre *Escherichia coli in vitro*.
- Avaliar a atividade de óleos essenciais de orégano, canela e tomilho frente a *Escherichia coli*, inoculada em massa de linguiça Toscana, durante o armazenamento deste 5°C em 30 dias.
- Realizar a identificação e quantificação dos compostos presentes nos óleos essenciais de orégano, canela e tomilho.
- Avaliar sensorialmente a linguiça Toscana adicionado dos óleos essenciais de orégano e canela.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Escherichia coli*: Aspectos microbiológicos

Escherichia coli é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos. Esse microrganismo pertence à família *Enterobacteriaceae* e entre suas principais características destacam-se: bacilos Gram-negativos, não esporulados capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás. A maioria fermenta também a lactose, com produção de ácido e de gás, embora alguns sejam anaerogênicos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Escherichia coli patogênica pode ser veiculada por meio de alimentos contaminados, sendo capaz de ocasionar desde leve diarreia até doenças graves como a síndrome urêmica hemolítica, dependendo do sorogrupo incriminado. Os manipuladores de alimentos podem desempenhar importante papel na transmissão de enfermidades veiculadas por alimentos, tanto por hábitos inadequados de higiene pessoal, ou por serem portadores de microrganismos patogênicos. Os equipamentos e utensílios mal higienizados, assim como os vetores e pragas, também contribuem para a contaminação dos produtos industrializados (FRANCO, 2010).

3.2 Óleos essenciais

De acordo com a Resolução CNNPA, nº 12, de 1978, condimentos ou temperos são produtos constituídos de uma ou diversas substâncias sápidas, de origem natural, com ou sem valor nutritivo, empregados nos alimentos com o objetivo de modificar ou exaltar o seu sabor (Resolução CNNPA nº12 de 1978). Óleos essenciais, conforme a ISO 9235:1997 (International Standard Organization), são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos pelo processamento mecânico dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, normalmente odoríferas e líquidas (ISO 9235, 1997). A grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanoides ou de terpenoides, sendo estes preponderantes (SIMÕES et al., 1999).

A atividade antimicrobiana de óleos de plantas e extratos tem tido muitas aplicações, incluindo conservação de alimentos crus e processados, produtos farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais (HAMMER et al., 1999). A maior parte da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias e ervas aromáticas parece estar associada com compostos fenólicos (DAVIDSON & NAIDU, 2000). O efeito antimicrobiano está relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001).

3.3 Composição dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são constituídos por misturas químicas muito complexas. Os componentes químicos dos óleos essenciais variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, esterres, ácidos orgânicos fixos, em diferentes concentrações, onde, um composto farmacologicamente ativo é majoritário (SIMÕES & SPITZER, 2000). Destilação a vapor é o método mais comum usado para extração de óleos essenciais. Extração por meio de dióxido de carbono líquido sobre baixa temperatura e alta pressão produz um perfil organoléptico mais natural, mas é uma técnica de alto custo (MOYLER, 1998).

A diferença no perfil organoléptico indica uma diferença na composição de óleos essenciais obtidos por extração por solvente em oposição por destilação e isso pode também influenciar nas propriedades antimicrobianas. Isso é confirmado pelo fato dos óleos essenciais extraídos por hexano terem mostrado melhor atividade antimicrobiana do que óleos essenciais extraídos por destilação a vapor (PACKIYASOTHY; KYLE, 2002). O teor de óleo essencial de diferentes plantas é muito variável, dependendo de qual parte da planta é obtido (planta inteira, flores, sementes, folhas, etc), da variedade, época de colheita e o método de cultivo. Uma planta definida botanicamente pode de acordo com seu biotipo sintetizar componentes ativos diferentes, com diferentes atividades terapêuticas e toxicidade (COSTA et al., 1990).

De modo geral, óleos essenciais produzidos de ervas colhidas durante ou imediatamente após florescer possuem forte atividade antimicrobiana (McGIMPSEY et al., 1999; MARINO et al., 2001). Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas dos OEs (COSENTINO et al., 1999).

Os principais componentes antimicrobianos de alguns temperos e seus óleos essenciais são eugenol em cravo, aldeído cinâmico e eugenol em canela e carvacrol e timol em orégano. A atividade antimicrobiana de alguns componentes de óleos essenciais contra patógenos de origem alimentar vem sendo testados (ULTEE et al., 2000).

3.4 Aplicações dos óleos essenciais

Óleos essenciais e extratos de plantas têm sido usado por uma ampla variedade de propósitos a milhares de anos (JONES,1996). Por volta do século XIII os óleos essenciais começaram a ser comercializados por farmácias e seus efeitos farmacológicos descritos em farmacopeias (BAUER et al., 2001). Algumas propriedades farmacológicas de diversos óleos essenciais já estão bem estabelecidas, como por exemplo as ações carminativa (funcho, erva-doce, coentro, menta), antiespasmódica (camomila, marcela), estimulante de secreções do sistema digestório (gengibre), estimulante (óleos essenciais contendo cânfora) ou depressora (melissa, capim-limão) do sistema nervoso central, secretolítica sobre o aparelho respiratório (eucalipto, anis-estrelado), anestésico local (cravo da índia), anti-inflamatória (camomila, salsão) e anti-séptica, entre outras. Compostos presentes em óleos essenciais, como o citral, o geraniol, o linalol e o timol possuem elevada atividade antisséptica (SIMÕES et al., 1999).

Alguns dos compostos fenólicos das plantas tem demonstrado excelente atividade antimicrobiana, assim como reduzindo a atividade do oxigênio, inibindo a peroxidação lipídica, estabilizando a gordura presente em alimentos, conseqüentemente extratos tem sido usados para este fim (MASAKI et al., 1995; DIGRAK et al., 2001).

O uso dos óleos essenciais em bens de consumo deverá aumentar no futuro devido ao aumento do consumismo verde, que estimula o uso e desenvolvimento de produtos derivados de plantas. Isto aplica-se aos setores de alimentos cosméticos e medicamentos (BURT, 2004).

3.5 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

Testes da atividade antimicrobiana podem ser classificados por difusão, diluição, ou métodos bioautográficos (BURT, 2004). A inexistência de uma técnica internacionalmente

padronizada para avaliação de óleos essenciais e extratos vegetais permite que diferentes protocolos sejam utilizados, o que compromete as comparações de resultados (VIUDA-MARTOS et al., 2008; SMITH-PALMER et al., 1998).

Smith-Palmer et al. (1998) e Höferl et al. (2009) relataram importante atividade antimicrobiana do OE de orégano frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo *E. coli*. Burt et al. (2003) observaram que os óleos essenciais de orégano e tomilho possuem significativa atividade bacteriostática e bactericida frente *E. coli* O157:H7, isoladas de fezes de bovinos. Os compostos fenólicos carvacrol e timol, enquanto frações majoritárias, garantem tais atividades. Essa atividade também tem sido relatada frente a fungos leveduriformes sensíveis e resistentes aos antimicóticos (POZZATTI et al., 2010). SANTURIO et al. (2011) evidenciaram que os óleos essenciais de alecrim, sálvia, manjeriço e gengibre não apresentaram atividade antimicrobiana frente a *E. coli* isoladas de aves e bovinos. Todavia, Viuda-Martos et al. (2008) e Delamare et al. (2007) relataram atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de sálvia e alecrim frente a *Staphylococcus* spp, *Enterobacter gergoviae*, *E. amnigenus*, *Lactobacillus* spp, e *L. curvatus*. Si et al. (2008) relataram a atividade do óleo essencial de orégano sobre *E. coli* ESBL resistentes a múltiplos antibacterianos. Frente a *Candida*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, Pozzatti et al. (2010) descreveram atividade antifúngica dos OES independentemente do perfil de resistência dos microrganismos.

Mahboubi e Bidgoli (2010) relataram que o óleo essencial de *Zataria multiflora* (condimento iraniano semelhante ao tomilho) composto por timol (38%), carvacrol (15,3%) e p-cimene (10,2%) apresentou atividade antimicrobiana similar frente a isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) e sensíveis (MSSA).

3.6 Aplicação dos óleos essenciais em carnes e produtos cárneos

Nos últimos 50 anos vêm sendo usados procedimentos químicos e físicos como proteção contra esporos e patógenos de alimentos (BENKEBLIA, 2004). Conservação de alimentos tem sido um desafio, devido ao aparecimento de novos alimentos no mercado, que requerem estabilidade na estocagem e proteção contra microrganismos (MARINO et al., 2001; BURT, 2004). A conservação da carne envolve a aplicação de medidas para retardar ou prevenir alterações microbiológicas, químicas ou físicas que a tornam imprópria para o

consumo ou que reduzem alguns aspectos da sua qualidade. Apesar de os vários tipos de alterações serem significativos, a deterioração microbiológica é a mais importante e geralmente precede os outros tipos de deterioração da carne (KINSMAN et al., 1994). Consumidores têm exigido alimentos naturais caracterizados por terem baixos níveis ou serem livres de aditivos químicos e baixo impacto no ambiente (BURT, 2004).

Nesse contexto, o uso alternativo de produtos naturais obtidos de plantas tem tido mais atenção, principalmente porque esses produtos possuem propriedades funcionais adicionais. Entre os antimicrobianos naturais, os óleos essenciais vêm sendo muito estudados. Esses possuem ação contra microrganismos esporulados e patógenos de alimentos (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004). De acordo com Gutierrez et al. (2008) a aplicação dos óleos essenciais para o controle de patógenos e bactérias de deterioração de alimentos exige a avaliação de uma série de aspectos : os efeitos sobre as propriedades organolépticas, o grau de atividade contra os organismos de preocupação para o produto e os efeitos da composição do alimento sobre a atividade antimicrobiana.

Bussatta et al. (2008) encontraram atividade bacteriostática sobre *Escherichia coli* do óleo essencial de manjerona (*Origanum majorana*) em baixas concentrações aplicado em linguiça frescal. Viuda-Martos et al. (2009) constataram que a adição de fibra de laranja e óleo essencial de orégano ou tomilho como ingredientes na massa de carne para produção de mortadela tipo Bologna aumenta a estabilidade oxidativa do produto, sendo uma alternativa para reduzir os níveis de nitrito do produto.

Um dos grandes desafios da indústria alimentícia é o controle da contaminação e propagação de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos prontos para o consumo uma vez que este microrganismo pode sobreviver no ambiente das plantas de processamento e em temperaturas de refrigeração (MYTLE et al., 2006). Menon e Garg (2001) pesquisaram o óleo de cravo e acharam atividade antilistérica do mesmo, embora em altas concentrações o mesmo pode alterar as características organolépticas do produto. López et al. (2005), estudaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais do cravo e canela sobre diversos microrganismos contaminantes de alimentos e observaram que ambos os óleos apresentaram uma excelente ação antibacteriana e antifúngica. Esses autores também observaram que os óleos tiveram uma potência maior para os fungos, seguido das bactérias Gram positivas, sendo *P. aeruginosa* a bactéria que apresentou maior resistência ao óleo essencial.

Deans e Svoboda (2006) em um estudo sobre a atividade antimicrobiana do óleo de *O. majorana* sobre 25 bactérias e cinco espécies fúngicas, mostraram um poder inibitório sobre considerável número de bactérias, como *S. aureus*. A salmonelose, causada por *Salmonella*

spp., é a principal das doenças transmitidas por alimentos contaminados, ocupando posição destacada no campo da saúde pública pelas suas características de morbidade e, em particular, pela dificuldade de seu controle.

Silva et al. (2010) avaliaram a interferência da origem e do teor de compostos fenólicos de óleo essencial de orégano de cinco marcas comerciais provenientes de diferentes regiões do mundo na atividade inibitória frente a *Salmonella enteritidis*. Os autores concluíram que a multiplicação desta bactéria pode ser inibida pelo óleo essencial de orégano, cuja ação antimicrobiana aparentemente independe da região produtora de orégano ou da época do ano. No entanto, óleos essenciais de orégano que possuem p-cimeno, gama-terpinemo e carvacrol podem ter seu efeito antimicrobiano frente a *Salmonella enteritidis* potencializado.

Careaga et al. (2003), avaliaram a atividade antibacteriana de um extrato de pimentão sobre *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* em carne bovina moída e observaram que a concentração de 1,5% (v/p) do extrato foi capaz de inativar *Salmonella*, enquanto a concentração de 0,3% foi bacteriostática para *P. aeruginosa*. Busatta et al. (2007), encontraram resultados promissores em análises microbiológicas e sensoriais de linguça fresca adicionada de pequenas concentrações de óleo essencial de orégano.

3.7 Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais

Geralmente os mecanismos de ação de compostos naturais são desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz (FPM), fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios serem afetados em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004).

Entende-se que a inibição do crescimento microbiano pelos óleos essenciais seja devido ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que acaba por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos (COWAN, 1999; PETER, 2004).

3.8 Embutidos frescais

Linguiça é o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial e submetido ao processo tecnológico adequado (BRASIL, 2000).

Ao longo da história, foram se desenvolvendo novos produtos, com sabores e texturas característicos, de certa forma, como exposta às necessidades de cada zona geográfica; assim, os produtos cozidos desenvolveram-se na Europa, onde as condições climáticas permitiam sua conservação e seu armazenamento, enquanto os embutidos crus curados são mais característicos da Europa meridional, já que são produtos mais estáveis a temperaturas moderadas. Atualmente a elaboração de produtos cárneos é considerada uma tecnologia altamente sofisticada, na qual as inovações na engenharia mecânica, a imaginação do fabricante e a pesquisa de instituições, tanto públicas como privadas, fazem desses produtos um setor de grande futuro (ORDÓÑEZ, 2007).

As linguiças constituem os derivados cárneos fabricados em maior quantidade no Brasil, pois sua elaboração, além de não exigir tecnologias sofisticadas, utiliza poucos e baratos equipamentos. Por ser um produto frescal, a linguiça não sofre tratamento térmico que reduza a sua microbiota e, aliada à sua alta atividade de água, possui pequeno prazo de validade comercial, apesar da utilização do frio para sua conservação (TERRA, 1998; BEZERRA et al., 2007).

As prováveis fontes de contaminação compreendem as carnes, as tripas ou envoltórios, os temperos ou condimentos, bem como a água utilizada em todas as aplicações de limpeza e manutenção (MANHOSO, 1996). Dentre os principais pontos críticos da comercialização de embutidos frescais estão as precárias condições físicas e higiênicas das feiras livres, a falta de treinamento dos produtores/proprietários dos estabelecimentos e os produtos fora do prazo de validade (MARTINS et al., 2006).

Como sua fabricação requer uma série de etapas de manipulação, elevam-se as possibilidades de contaminação por diversas espécies de microrganismos patogênicos ou deterioradores, o que pode comprometer a qualidade microbiológica do produto final (MARQUES et al., 2006). O processo de abate dos animais permite a contaminação dos tecidos, antes estéreis, por microrganismos como bactérias gram negativas, *Escherichia coli*, *Samonella*, *Pseudomonas* e *Achromobacter*, associados com o trato intestinal ou meio ambiente. O estado microbiológico inicial da carne utilizada na elaboração de produtos

derivados é de importância crítica na qualidade microbiológica desses produtos, por conseguinte, sobre sua vida útil. Apesar da incidência de patógenos ser alta, os embutidos frescos são geralmente seguros, pois são cozidos antes do consumo. Entretanto, as toxinfecções alimentares podem ocorrer pelo consumo do produto insuficientemente cozido ou contaminado após o cozimento (VARNAM & SUTHERLAND, 1998).

4 ARTIGOS

4.1 Artigo 1: Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Thyme and of Thymol against *Escherichia coli* Strains



Acta Scientiae Veterinariae, 2014, 42: 1234.

RESEARCH ARTICLE
Pub. 1234

ISSN 1679-9216

Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Thyme and of Thymol against *Escherichia coli* Strains

Deise Flores Santurio¹, Francieli Pantella Kunz de Jesus², Régis Adriel Zanette², Karine Bizzi Schlemmer², Andressa Fraton¹ & Leadir Lucy Martins Fries¹

ABSTRACT

Background: The deterioration of food products, especially of those derived from meat, by pathogenic microorganisms is a major problem in industries. *Escherichia coli* is a facultative anaerobic bacteria of intestinal origin, and is a cause of concern in the meat industry. The use of essential oils as inhibitors of growth of spoilage and pathogenic microorganisms is a good choice for replacement of chemical additives in foods. This study was aimed at evaluating the *in vitro* activity of the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) and thymol, against *E. coli* strains, by using a microdilution methodology based on the M31-A3 technique.

Materials, Methods & Results: In this study the antimicrobial activities of the essential oil of *Thymus vulgaris* (thyme) and of the thymol compound were evaluated against 20 *E. coli* strains obtained from poultry and pigs. The strains are part of the collection of bacteria of the Laboratório de Pesquisas Micológicas of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). The essential oil of thyme and its constituent, thymol, were commercially acquired (Sigma-Aldrich). Gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) was realized on a Agilent chromatograph Model HP 6890 series CG, equipped with a mass selective detector 5973 with electron impact (CG-MS-EI) and identified p-cymene (23.71%), thymol (13.86%) and γ -terpinene (8.55%) as the major substances present in the thyme essential oil. The essential oil constituents were identified by comparing their mass spectra with those from the National Institute of Standards and Technology. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) were determined for each isolate by using the broth microdilution technique based on the M31-A3 protocol. The geometric means of the MICs and MBCs against *E. coli* strains were of 627.7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 990.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the thyme essential oil and of 2786 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 2540 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the thymol. These results show that the essential oil of thyme is a potential antimicrobial, and deserves further studies to be safely used as a preservative in foods.

Discussion: The use of condiments, accompanied the process of civilization of humankind, which assures very low or no toxicity. These essential oils contain major components with significant antimicrobial activity. In this context, therefore, targeted studies are relevant to determine which essential oils are more active. Nonetheless, the inexistence of an international standardized technique for the evaluation of essential oils and vegetable extracts allows the use of different protocols, hampering the comparison of the results. The M31-A3 protocol used in our experiment is the most recommended among the techniques found in the literature. In this study, the essential oil of *T. vulgaris* and its major compound thymol showed bacteriostatic and bactericidal activities against *E. coli* strains *in vitro*. Nonetheless, the activity of the essential oil was superior to the compound alone. Such finding is explained by the fact that the high antimicrobial activity showed by some essential oils results from the synergism of the major components. The use of essential oils is a viable and alternative option to replace chemical additives in food. Notwithstanding, more studies on the components of the essential oils are required to ensure their safety in food. The sensorial analysis is also an important item to be evaluated to estimate consumer acceptance of the product.

Keywords: *Escherichia coli*, thymol, thyme, *Thymus vulgaris*, antimicrobial activity, essential oil.

Received: 4 July 2014

Accepted: 3 November 2014

Published: 19 November 2014

¹Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil. ²Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM, Santa Maria. CORRESPONDENCE [deisesanturio@ibest.com.br - Tel.: 55 +(55) 3220-8906]. Campus UFSM, Prédio 42, Camobi. CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

INTRODUCTION

Escherichia coli is the predominant species among facultatively anaerobic intestinal bacteria. The ability to ferment glucose and lactose and to produce acid are amongst the characteristics of this gram negative bacillus of the family Enterobacteriaceae [9]. The conservation of meat products usually involves measures to retard or prevent microbiological, chemical and physical alterations, which would impact on organoleptic quality or make them inappropriate for consumption. Indeed, microbiological deterioration is the most important and often precedes other meat alterations [11]. On the other hand, consumers have demanded safer products, i.e., not only free of harmful biological agents but virtually free of chemical compounds [3].

In this context, the essential oils obtained from condiment and seasoning plants such as basil, cinnamon, oregano, rosemary, sage and thyme have been object of study, because besides their organoleptic properties these compounds have further functional properties. Since the major constituents of these essential oils are terpene hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, phenols, esters and organic acids, at different concentrations and with a major pharmacologically active component [15], they possess inhibitory activity against food-borne pathogens [1,3]. Among these substances, the phenolic compounds are the main responsible for the antimicrobial properties of the essential oils [6].

This study was aimed at evaluating the in vitro activity of the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) and its major constituent, thymol, against *E. coli* strains, by using a microdilution methodology based on the M31-A3 technique [5].

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Twenty *E. coli* enteric strains obtained from pigs and poultry were used. The strains had been previously identified by PCR and are part of the collection of bacteria of the Laboratório de Pesquisas Micológicas of the Universidade Federal de Santa Maria.

Gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) analysis of the essential oil

The essential oil of thyme and its major constituent, thymol, were commercially acquired¹. GC/MS

analysis of the essential oil of thyme was determined on a Agilent chromatograph (Model HP 6890 series CG)², equipped with a mass selective detector 5973 with electron impact (CG-MS-EI) and a capillary column DB-5MS (30 m x 320 mm x 0.25 µm). Helium (carrier gas; 99.999%) flowed at a constant rate of 22.7 mL/min. The oven temperature program consisted of ramping up from 60°C to 325°C. Ionization was achieved by electron impact using an emission current of 70eV at an interface temperature of 310°C. The essential oil constituents were identified by comparing their mass spectra with those from the National Institute of Standards and Technology.

Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs)

One gram of the thyme oil and of thymol were diluted first in methanol to the concentration of 640 mg mL⁻¹ (solution I) and then in Mueller-Hinton (MH) broth to the concentration of 6400 µg mL⁻¹ (solution II). Thereafter, 100 µL of the solution II were added by serial dilution to 96-well plates containing 100 µL of MH broth, according to the CLSI M31-A3 guidance [5]. The concentration for both substances ranged from 3200 to 100 µg mL⁻¹. The strains of *E. coli* grown in MH agar were suspended in 0.85% saline to achieve 0.5 McFarland (1 x 10⁸ CFU.mL⁻¹). Then 10 µL (1x10⁵ CFU.mL⁻¹) of this inoculum were added to each well of the microdilution plates, which were incubated at 35°C for 24h. The MIC was defined as the lowest concentration of compound at which no growth was evident compared to positive control (broth only). Immediately after the MICs were determined, the MBCs were assayed by transferring 10 µL from each culture with a compound concentration equal to or greater than the established MIC to MH agar plates. The MBC was defined as the lowest drug concentration at which no growth could be observed after 24 h of incubation at 35°C. All of the assays were performed in duplicate.

Statistical analysis

The non-parametric Mann-Whitney test was used to compare data between the two groups ($P < 0.05$).

RESULTS

Chromatographic analysis identified p-cymene (23.71%), thymol (13.86%) and γ -terpinene (8.55%) as the major substances present in the thyme essential oil (Table 1).

Table 1. Chemical composition and yield percentage of the essential oil of thyme.

Compound	Percentage
p-Cymene	23.71%
Thymol	18.39%
γ -Terpinene	8.55%
Linalool	6.5%
1-R- α -pinene	5.04%
Camphor	3.24%
Borneol	2.15%
Carvacrol	2.15%
Caryophyllene	3.51%

The geometric means (GMs) of the MICs and MBCs against *E. coli* strains were of 627.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 990.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for the thyme essential oil and of 2786 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 2540 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for the thymol com-

ponent, respectively (Table 2). The significant lower MIC and MBC GMs ($P < 0.05$) showed that the essential oil of thyme had better activity than its major component thymol used alone.

Table 2. Antimicrobial activity ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of thymol and of the essential oil of thyme against 20 *Escherichia coli* strains.

	MBC		MIC			
	Range	GM	MIC50	MIC90	Range	GM
Thymol	3200-1600	2786 ^A	3200	3200	6400-1600	2540 ^A
Thyme	3200-400	627.7 ^B	800	800	6400-400	990.2 ^B

MIC: minimum inhibitory concentration; MBC: minimum bactericidal concentration; MIC50: lowest concentration able to inhibit 50% of the isolates; MIC90: lowest concentration able to inhibit 90% of the isolates; GM: geometric mean of MIC. Different superscript letters in a column indicates statistically difference ($P < 0.05$; Mann-Whitney test).

DISCUSSION

The inexistence of an international standardized technique for the evaluation of essential oils and vegetable extracts allows the use of different protocols, hampering the comparison of the results [16,17]. The M31-A3 protocol [5] used in our experiment is the most recommended among the techniques found in the literature.

In this study, the essential oil of *T. vulgaris* and its major compound thymol showed bacteriostatic and bactericidal activities against *E. coli* strains *in vitro*. Nonetheless, the activity of the essential oil was superior to the compound alone. Such finding is explained by the fact that the high antimicrobial activity showed by some essential oils results from the synergism of the major components [8].

The antimicrobial activity of the thyme essential oil and of thymol has been evaluated in other studies. Ivanovic *et al.* [10] reported significant activity of the extract and essential oil of thyme against

E. coli and *Salmonella* strains, with MIC of 640 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Such activity was attributed to the high concentration of thymol in the extract (39.7%) and in the essential oil (48.49%). It was also reported antimicrobial activity of the essential oil of thyme against *E. coli* 5% (V/V) and other food borne bacteria [14]. An important role of bacteriostatic and bactericidal activity of the essential oils of thyme and oregano against *E. coli* O157:H7 isolated from bovine feces has also been observed [4]. The phenolic compounds carvacrol and thymol are responsible for the activity of these oils.

The essential oil of thyme has also been reported to show activity against yeasts susceptible and resistant to antifungal drugs [13]. Interestingly, Klaric *et al.* [12] found three-times stronger inhibition of pure thymol against different mould species than the thyme oil, which was constituted mainly of p-cymene (36.5%), thymol (33%) and 1,8-cineole (11.3%). The results differ from our study, where the activity of the essential oil of thyme was superior to its major compound thymol. In another study, Baskaran *et al.*

[2] investigated the antimicrobial activity of plants containing trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol and thymol, and found trans-cinnamaldehyde as the compound with the best activity against the main pathogens of mastitis, including *E. coli*.

CONCLUSION

It was showed that the essential oil of thyme and the compound thymol have antimicrobial activity *in vitro* against *E. coli* strains. The MIC and MBC values obtained showed that the essential oil was superior

to the compound alone. This finding also highlights the potential use of the essential oil of thyme as a substitute for artificial inhibitors of food spoilage and pathogenic microorganisms.

MANUFACTURERS

¹Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA.

²Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA.

³Merck, Darmstadt, Germany.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. & Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chemistry Toxicology*. 46(2): 446-475.
- 2 Baskaran A.S., Kazme G.W., Hinckley L., Andrew S.M. & Venkitanarayanan K. 2009. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens *in vitro*. *Journal of Dairy Science*. 92(4): 1423-1429.
- 3 Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94(3): 223-253.
- 4 Burt S.A. & Reinders R.D. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 36(3): 162-167.
- 5 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved Standard - 3rd edn. *CLSI document M31-A3 Clinical and Laboratory Standards Institute*. Wayne: CLSI, 112p.
- 6 Cosentino S., Tuberoso C.I., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. & Palmas F. 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29(3): 130-135.
- 7 Griffin P. & Tauxe R.V. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Review*. 13(1): 60-98.
- 8 Höferl M., Buchbauer G., Jirovetz L., Schmidt E., Stoyanova A., Denkova Z., Slavchev A. & Geissler M. 2009. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. *Journal of Essential Oil Research*. 21(5): 459-464.
- 9 Ito N.M.K., Miyaji C.I. & Miyaji S.O. 2007. *Diagnóstico diferencial das enfermidades bacterianas, fúngicas e parasitárias que acometem os frangos de corte*. Cascavel: Coluna do Saber, 160p.
- 10 Ivanovic J., Mistic D., Zizovic I. & Ristic M. 2012. *In vitro* control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. *Food Control*. 25(1): 110-116
- 11 Kinsman D.M., Kotula A.W. & Breidenstein B.C. 1994. *Muscle Foods, Meat, Poultry and Seafood Technology*. New York: Chapman & Hall, 573p.
- 12 Klaric M., Kosalec I., Mastelic J., Pieckova E. & Pepeljnak S. 2007. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*. 44(1): 36-42
- 13 Pozzatti P., Loreto E.S., Lopes, P.G., Athayde M.L., Santurlo J.M. & Alves S.A. 2010. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. *Mycoses*. 53(1): 12-15.
- 14 Silva N., Alves S., Gonçalves A., Amaral J.S. & Poeta P. 2013. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food Science and Technology International*. 19(6): 503-510.
- 15 Simões C.M.O. & Spitzer V. 2004. Óleos voláteis. In: Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., Mello J.C.P., Mentz L.A. & Petrovick P.R. (Eds). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. PortoAlegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 475p.
- 16 Smith-Palmer A., Stewart J. & Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 26(2): 118-122.
- 17 Viuda-Martos M., Navajas R., López F. & Álvarez P. 2008. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *International Journal of Food Science and Technology*. 43(3): 526-531.

4.2 Artigo 2: Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare*, cinamaldeído e carvacrol contra *Escherichia coli*

Deise Flores Santurio^{1*}, Francielli Pantella Kunz de Jesus², Régis Adriel Zanette², Karine Bizzi Schlemmer², Andressa Fraton¹, Leadir Lucy Martins Fries¹

1 Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 42, Camobi, 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil. E-mail: deisesanturio@ibest.com.br

*Autor correspondente

2 Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil

*Artigo à ser submetido a revista Semina

RESUMO

A deterioração de produtos alimentares, especialmente aqueles derivados de carne, por microrganismos patogênicos é um grande problema na indústria. *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa de origem intestinal, e é um motivo de preocupação no setor de carnes. A utilização de óleos essenciais como inibidores do crescimento de microrganismos patogênicos e deterioração é uma boa escolha para a substituição de aditivos químicos nos alimentos. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade *in vitro* dos óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), orégano (*Origanum vulgare*), cinamaldeído e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli*, usando uma metodologia de microdiluição com base na técnica M31-A3. Os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* e *Origanum vulgare* e os compostos cinamaldeído e carvacrol apresentaram atividade bactericida frente aos isolados de *Escherichia coli*. Os CIMs e CBMs mostraram que o OE de canela e o OE de orégano obtiveram atividade antimicrobiana superior em relação aos seus respectivos compostos majoritários. Logo, os óleos essenciais poderiam ser uma alternativa ao uso de conservantes químicos nos alimentos, porém maiores estudos são necessários para que essas substâncias sejam usadas com segurança.

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli*; óleos essenciais; cinamaldeído; canela; orégano, carvacrol.

ABSTRACT

The food products deterioration , especially of those derived from meat, by pathogenic microorganisms is a major problem in industries. *Escherichia coli* is a facultative anaerobic bacteria of intestinal origin and is a concern in the meat industry. The use of essential oils as inhibitors of growth of spoilage and pathogenic microorganisms could be a good choice for replacement of chemical additives in foods. This study aimed to evaluate the *in vitro* activity of the essential oil of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), oregano (*Origanum vulgare*), cinnamaldehyde and carvacrol against *Escherichia coli* strains, by using a microdilution methodology based on the M31-A3 technique.

KEYWORDS: *Escherichia. coli*; essential oils; cinnamaldehyde; cinnamon, oregano, carvacrol

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é a espécie predominante entre as bactérias intestinais anaeróbicas facultativas e não esporuladas, pertencendo à família *Enterobacteriaceae*, sendo um bacilo Gram-negativo fermentador da glicose e lactose com produção de ácido e gás, dentre alguns atributos úteis na sua identificação (ITO, 2007).

Os principais microrganismos envolvidos nos processos de contaminações de alimentos são as bactérias, pois atuam sobre numerosos tipos de substratos, com diferentes temperaturas, pH e condições do meio ambiente. Tendo em vista aos problemas de resistência de microrganismos a antibióticos e desinfetantes convencionais e diante da atual tendência do mercado de utilizar produtos ecologicamente seguros, o emprego de óleos essenciais para a conservação de alimentos e controle fitossanitário vem sendo muito estudado, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e microrganismos causadores de grandes prejuízos às indústrias alimentícias (PEREIRA et al., 2008; SACCHETTI et al., 2005).

Óleos essenciais (OEs) são líquidos gordurosos obtidos de material de plantas (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes). Podem ser obtidos por expressão, fermentação ou extração, mas o método de destilação a vapor é o mais usado comercialmente para produção de OEs (VAN de BRAAK and LEIJTEN, 2009). Os óleos essenciais possuem ação contra microrganismos esporulados e patógenos de alimentos (BAKKALI et al., 2008; BURT et al., 2004). A estrutura química dos componentes individuais do óleo essencial afetam no seu modo de ação e atividade bacteriana (DORMAN and DEANS, 2000).

O orégano pertence à família *Lamiaceae*, é originária dos países mediterrâneos, também conhecida como manjerona brava. As propriedades medicinais são expectorantes, antioxidante, diurética, antiséptica, calmante e tônico digestivo. Seu óleo essencial é rico em carvacrol, timol e terpineol (CÁCERES, 1999). Canela é tradicionalmente cultivado em países asiáticos. Possui atividade antibacteriana, antifúngica, inseticida e propriedades antioxidantes. O principal constituinte do óleo essencial de canela, cinamaldeído, exibe atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos (SANLA-EAD et al., 2012).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), orégano (*Origanum vulgare*) e dos compostos cinamaldeído e carvacrol contra 20 isolados de *Escherichia coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

Foram avaliadas 20 amostras de *Escherichia coli* de origem entérica do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sendo as mesmas provenientes de animais sadios.

Óleos essenciais

Foram avaliados os OEs (óleos essenciais) de canela, orégano e os compostos cinamaldeído e carvacrol. Foram adquiridos comercialmente lacrados em frascos âmbar (Merck).

Análise GC-MS do óleo essencial

A análise qualitativa do óleo essencial foi determinada utilizando o cromatógrafo HP 6890 Série CG system com detector seletivo de massas HP 5973 com Impacto de elétrons (CG-MS-EI) coluna capilar DB-5MS Agilent Technologies (30m x 320mm x 0,25µm). O gás de arraste utilizado foi Hélio (99,999% de pureza) na velocidade de 22,7 ml/min. A rampa de aquecimento do forno variou de 60°C a 325°C. A energia de ionização utilizada foi de 70 eV e a temperatura de interface foi de 310°C. Os componentes do óleo essencial foram identificados por comparação de espectro de massas pela biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology).

Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações bactericidas mínimas (CBMs)

Após pesagem de 1g, cada óleo essencial foi diluído com metanol até atingir a concentração de 640mg. ml⁻¹ (solução I). A seguir, foi diluído na proporção de 1:100 em Caldo Muller-Hinton, obtendo-se a concentração de 6400µg ml⁻¹ (solução II). Com base no documento M31-A3 (CLSI, 2008), volumes de 100µl de caldo Muller-Hinton eram distribuídos nos poços de uma placa de microtitulação. Em seguida, 100µl da solução II eram acrescentados ao primeiro poço e, após homogeneização, transferia-se para o segundo e assim sucessivamente, obtendo-se concentrações finais de 3200, 1600, 800, 400, 200, 100µg ml⁻¹. As colônias de *Escherichia coli* foram desenvolvidas no Agar Muller-Hinton, suspensas em solução salina 0,085% obtendo-se uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland (1x10⁸ UFC.ml⁻¹). Desta suspensão, inoculava-se 10µl (1x10⁵ UFC.ml⁻¹) em cada poço já contendo os óleos essenciais. As microplacas eram incubadas durante 24h/35°C, em condições de aerobiose. A CIM consistiu na menor concentração do óleo essencial capaz de causar inibição total do crescimento bacteriano. Esses ensaios foram realizados em triplicata.

As CBMs foram determinadas a partir dos poços onde, após 24hs de incubação não havia crescimento bacteriano visíveis. Destes transferia-se uma alíquota de 10µl

para a superfície do ágar Muller-Hinton. Após 24hs de incubação a 35°C, registrava-se a menor concentração dos óleos essenciais, nos quais não se evidenciava crescimento bacteriano. Esses ensaios foram também realizados em triplicata. A CBM foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de causar a morte do inóculo.

Análise Estatística

Os dados foram analisados através do teste de Dunn com nível de significância de ($p < 0,05$).

RESULTADOS

As análises cromatográficas dos óleos essenciais de canela e orégano utilizados neste estudo estão expressos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Cromatograma do óleo essencial de canela

Composto químico	Porcentagem
benzaldehyde	1,89%
trans- cinnamaldehyde	64,98%
cinnamyl acetate	5,89%
cinnamaldehyde	15,65%

Tabela 2. Cromatograma do óleo essencial de orégano

Composto químico	Porcentagem
p-cimene	16,58%
(-)- β -pinene	2,09%
α -Terpinene	2,24%
1,4-cyclohexadiene	8,48%
β -Linalool	2,77%
caryophyllene	3,73%
carvacrol	43,36%
thymol	13,86%

A atividade antimicrobiana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos óleos essenciais de orégano e canela e compostos cinamaldeído e carvacrol contra *Escherichia coli spp* encontra-se na Tabela 3. As médias geométricas (MGs) das Concentrações Inibitórias Mínimas CIMs e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) dos OEs contra isolados de *Escherichia coli* foram: *Cinnamom zeylanicum* [CIM = 828,21 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e CBM = 2011,21 $\mu\text{g.mL}^{-1}$], *Origanum vulgare* [CIM = 672,72 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e CBM = 2039,30 $\mu\text{g. mL}^{-1}$] e dos compostos cinamaldeído [CIM = 3091 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CBM = 5198,42 $\mu\text{g.mL}^{-1}$] e carvacrol [CIM = 2425,15 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e CBM = 3429,68 $\mu\text{g. mL}^{-1}$].

Neste estudo as médias geométricas das CIMs indicaram que o OE de canela e OE de orégano obtiveram mesma atividade antimicrobiana frente aos isolados e foram mais ativos ($P < 0,05$), em relação aos compostos.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos óleos essenciais de orégano e canela e compostos cinamaldeído e carvacrol contra *Escherichia coli spp*.

	CIM		CBM	
	Variação	MG	Variação	MG
Cinamaldeído	3200-1600	3091 ^A	6400-3200	5198,42 ^A
Carvacrol	3200-1600	2425,15 ^A	6400-1600	3429,68 ^{AB}
Orégano	3200-400	672,72 ^B	6400-800	2039,30 ^B
Canela	3200-400	828,21 ^B	6400-800	2111,21 ^B

CIM = concentração inibitória mínima, CBM = concentração bactericida mínima, MG = médias geométricas onde letras iguais na mesma coluna significam mesma atividade antimicrobiana. Para comparações entre CIMs e CBMs da MG foi usado o Teste de Dunn ($P < 0.05$).

DISCUSSÃO

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de plantas aromáticas são reconhecidas desde a Antiguidade (SIMÕES; SPITZER, 2012). Neste estudo avaliou-se a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de canela e orégano e dos compostos

cinamaldeído e carvacrol frente a isolados de *Escherichia coli*. Testes da atividade antimicrobiana podem ser classificados por difusão, diluição, ou métodos bioautográficos. A inexistência de uma técnica internacionalmente padronizada para avaliação de óleos essenciais e extratos vegetais permite que diferentes protocolos sejam utilizados, o que compromete as comparações de resultados (VIUDA-MARTOS et al., 2008; SMITH-PALMER et al., 1998). A atividade antimicrobiana do óleo essencial de canela e do cinamaldeído confirmou estudos anteriores. Andrade et al. (2012) avaliou a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de citronela, canela e gengibre, dentre estes, o óleo essencial de canela foi o mais efetivo na inibição de bactérias Gram negativas e Gram positivas, entre estas, *Escherichia coli* ATCC 11229 com CIM = 15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, este resultado pode estar relacionado pela presença do componente majoritário aldeído cinâmico em elevada concentração (77,72%), quando comparada com as outras plantas estudadas. Obtendo resultados semelhantes Moarefiani et al. (2013) encontraram atividade antimicrobiana e antioxidante do *Cinnamomum zeylanicum* apresentando (CIMs e CBMs 0.130mg/mL, 0.259 mg/mL) contra *Escherichia coli*. De acordo com o estudo de Si et al. (2005) o óleo essencial de canela obteve atividade antimicrobiana com CBMs de 133 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ para *E. coli* K88 e *E. coli* O157:H7. NANASOMBAT and WIMUTTIGOSOL (2011) pesquisaram atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais de especiarias dentre estes, *Cinnamomum Zeylanicum* apresentou mais alta atividade, e entre as bactérias a mais sensível foi *Bacillus cereus* com CIM de 0,5 mg/mL. Oliveira et al. (2012) diferente ao presente estudo, encontraram atividade antimicrobiana do OE de *Cinnamomum cassia* de 0,73 % (v/ v) para *Escherichia coli* EPEC e 0,6% (v/ v) de atividade antimicrobiana para o mesmo microrganismo, porém com o composto cinamaldeído, este apresentou melhor atividade antimicrobiana em relação ao OE. Semelhante ao presente estudo outros autores estudaram a atividade antimicrobiana para o óleo de orégano e carvacrol. Edwin et al. (2006) encontraram atividade antimicrobiana do composto carvacrol contra *Escherichia coli* [MIC = 1,2mM e MBC = 1,3Mm] e *S. aureus* [MIC = 1,7mM e MBC = 1,8mM], assim como Baskaran et al. (2009) estudaram atividade antimicrobiana de carvacrol e outros compostos contra *Escherichia coli*, sendo que carvacrol apresentou os valores de MIC e MBC de 0,8% e 1,2% respectivamente. Burt et al. (2003) observaram que os óleos essenciais de orégano e tomilho possuem significativa atividade bacteriostática e bactericida frente *E. coli* O157:H7, isoladas de fezes de bovinos. Os compostos fenólicos carvacrol e timol, enquanto frações

majoritárias, garantem tais atividades. Essa atividade também tem sido relatada frente a fungos leveduriformes sensíveis e resistentes aos antimicóticos (POZZATTI et al., 2010). Em fungos filamentosos, como *Aspergillus flavus* CECT 2949, Manso et al. (2011) encontraram atividade antifúngica do orégano (*Origanum vulgare*) nas seguintes concentrações MIC = 400 ppm e MFC = 800 ppm.

Apresentando resultados diferentes ao presente estudo, Castilho et al. (2012) relataram melhor atividade antimicrobiana do carvacrol em relação ao orégano coletado de quatro regiões diferentes da Ilha da Madeira, Portugal, contra *Escherichia coli* apresentando valores de MIC > 200 µg.ml⁻¹ para orégano e MIC = 100 µg.ml⁻¹ para carvacrol. Segundo Höferl et al. (2009) o fato de alguns óleos essenciais possuírem alta atividade antimicrobiana comparada com os seus principais compostos é devido ao efeito do sinergismo entre os principais constituintes do óleo essencial.

CONCLUSÃO

Este estudo permitiu concluir que os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* e *Origanum vulgare* e os compostos cinamaldeído e carvacrol apresentaram atividade bactericida frente aos isolados de *Escherichia coli*. Os CIMs e CBMs mostraram que o OE de canela e o OE de orégano obtiveram atividade antimicrobiana superior em relação aos seus respectivos compostos majoritários. Os resultados também permitem inferir que os óleos essenciais seriam uma alternativa ao uso de aditivos químicos nos alimentos. Porém os óleos essenciais e alimentos requerem maiores estudos para essas substâncias sejam usadas com segurança.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**. v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food Chemical Toxicology**. v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BASKARAN, A. S.; KAZMER, G. W.; HINCKLEY, L.; ANDREW, S. M. AND VENKITANARAYANAN, K. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens *in vitro*. **Journal of Dairy Science**. v. 92, p. 1423-1429, 2009.

BURT, S. A. AND REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters Applied Microbiological**. v. 36, p. 162-167, 2003.

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

CÁCERES, A. **Plantas de uso medicinal en Guatemala**. Guatemala: Editorial Universitaria, 1999. 402 p.

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved Standard - 3rd edn. **CLSI document M31-A3 Clinical and Laboratory Standards Institute**. Wayne: CLSI, 2008, 112p.

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

HÖFERL, M.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; SCHMIDT, E.; STOYANOVA, A.; DENKOVA, Z.; SLAVCHEV, A. AND GEISSLER, M. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Res**. v. 21, p. 459-464, 2009.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. & MIYAJI, S. O. **Diagnóstico diferencial das enfermidades bacterianas, fúngicas e parasitárias que acometem os frangos de corte.** 2007, Cascavel: Coluna do Saber, 160p.

MANSO, S.; NERÉN, C.; GÓMEZ-LUZ, R. Antifungal Activity of the essential oil of cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*), Oregano (*Origanum vulgare*) and Lauramide Argine Ethyl Ester (LAE) against the mold *Aspergillus Flavus* CECT 2949 Italian **Journal of Food Science**, p. 151-156, 2011.

MOAREFIAN, M.; BARZEGAR, M. AND SATTARI, M. *Cinnamomum Zeylanicum* essential oil as a natural antioxidant and antibacterial in cooked sausage. **Journal of Food Biochemistry**. v. 37, n. 1, p. 62-63, 2013.

NANASOMBAT, S. AND WIMUTTIGOSOL, P. Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. **Food Science and Biotechnology**. v. 20, n. 1, p. 45-53, 2011.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; NASCIMENTO, J. A.; BATISTA, N. N. AND PICCOLI, R. H. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. **European Food Research and Technology**. v. 234, p. 821-832, 2012.

PEREIRA, A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R. AND GUIMARÃES, L. G. L. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciências Agrotécnicas**, v. 22, n. 3, p. 887-893, 2008.

POZZATTI, P.; LORETO, E. S.; LOPES, P. G.; ATHAYDE, M. L.; SANTURIO, J. M. AND ALVES, S. A. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**. v. 53, p. 12-15, 2010.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MARIAVITTORIA, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M. AND BRUNI, R. Comparartive evaluation of 11

essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**. v. 91, n. 4 p. 621-632, 2005.

SANLA-EAD, N., JANGCHUD, A., CHONHENCHOB, V. AND SUPPAKUL, P. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose packaging films. **Packaging Technology and Science**. v. 25, n. 1, p. 7-17, 2012.

SI, W., GONG, J.; TSAO, R.; ZHOU, T.; YU, H.; POPPE, C.; JOHNSON, R. AND DU, Z. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v. 100, n. 2 p. 296-305, 2006.

SIMÕES, C. M. O. AND SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. AND PETROVICK, P. R. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004, 475p

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J. AND FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**. v. 26, n. 2 p. 118-122, 1998.

VAN DE BRAAK, S. A. A. J.; LEIJTEN, G. C. J. J. **Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union**. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, 2009 p. 116.

VIUDA-MARTOS, M.; NAVAJAS, Y. R.; LÓPEZ, J. F. AND ÁLVAREZ, J. A. P. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 43, n. 3 p. 526-531, 2008.

4.3 Artigo 3. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, canela e tomilho *in vitro* e em Linguiça Toscana contra coliformes totais e termotolerantes.

Deise Flores Santurio^{1*}, Francielli Pantella Kunz de Jesus², Régis Adriel Zanette²,
Karine Bizzi Schlemmer², Andressa Fraton¹, Leadir Lucy Martins Fries¹

1 Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 42, Camobi, 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil. E-mail: deisesanturio@ibest.com.br

*Autor correspondente

2 Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil

RESUMO

A deterioração de produtos alimentares, especialmente aqueles derivados de carne, por microrganismos patogênicos é um grande problema na indústria. Neste contexto, os óleos essenciais com suas propriedades antimicrobianas, seriam uma forma natural de contribuir com a redução da deterioração. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) contra 20 isolados de *Escherichia coli* e após, avaliar a atividade dos mesmos em linguiça Toscana, adicionada de coliformes. As médias geométricas de CIMs e CBMs para os óleos essenciais de orégano, canela e tomilho não obtiveram diferença significativa ($p < 0,05$). Nos 30 dias de armazenamento da massa de linguiça Toscana, houve uma redução na contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes com adição dos mesmos em diferentes concentrações.

Palavras-chave: Linguiça toscana. Óleo essencial. Atividade antimicrobiana. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

The deterioration of food products, especially those derived from meat by pathogenic microorganisms is a major problem in the industry. In this context, essential oils to their antimicrobial properties, would be a natural way to contribute to reducing deterioration. This study aimed to evaluate the in vitro antimicrobial activity of essential oils from oregano (*Origanum vulgare*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and thyme (*Thymus vulgaris*) against 20 isolates of *Escherichia coli* and after evaluating the activity of the same against the increase of coliforms the mass of Toscana sausage. The geometric mean MICs and MBCs for the essential oils from oregano, cinnamon and thyme did not obtain significant difference ($p < 0.05$). Within 30 days sausage mass storage Toscana, there was a reduction in total coliforms and fecal coliforms by adding them in different concentrations.

Keywords: Toscana sausage. Essential oil. Antimicrobial activity. *Escherichia coli*.

1 INTRODUÇÃO

Linguiça é o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado (BRASIL, 2000).

A conservação da carne envolve a aplicação de medidas para retardar ou prevenir alterações microbiológicas, químicas ou físicas que a tornam imprópria para o consumo ou que reduzem alguns aspectos da sua qualidade. Apesar de os vários tipos de alterações serem significativos, a deterioração microbiológica é a mais importante e geralmente precede os outros tipos de deterioração da carne (KINSMAN et al., 1994).

As linguiças constituem os derivados cárneos fabricados em maior quantidade no Brasil, pois sua elaboração, além de não exigir tecnologias sofisticadas, utiliza

poucos e baratos equipamentos. Por ser um produto frescal, a linguiça não sofre tratamento térmico que reduza a sua microbiota e, aliada à sua alta atividade de água, possui pequeno prazo de validade comercial, apesar da utilização do frio para sua conservação (TERRA, 1998).

Escherichia coli é a espécie predominante entre as bactérias intestinais anaeróbicas facultativas e não esporuladas, pertencendo à família *Enterobacteriaceae*, sendo um bacilo Gram-negativo fermentador da glicose e lactose com produção de ácido dentre alguns atributos úteis na sua identificação (ITO et al., 2007). Alimentos de origem animal submetidos a algum processo, tem sido identificados como importante veículo de transmissão de *E. coli* do sorotipo O157:H7 e outras STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga), isoladas de toxinfecções alimentares no homem (GRIFFIN & TAUXE, 1991). Tendo em vista aos problemas de resistência de microrganismos a antibióticos e desinfetantes convencionais e diante da atual tendência do mercado de utilizar produtos ecologicamente seguros, o emprego de óleos essenciais para a conservação de alimentos e controle fotossanitário vem sendo muito estudado, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e microrganismos causadores de grandes prejuízos às indústrias alimentícias (PEREIRA et al., 2008; SACCHETTI, et al., 2005).

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleo essenciais de orégano, canela e tomilho frente a isolados de *Escherichia coli*, também avaliar a atividade antimicrobiana dos mesmos em massa de linguiça Toscana e ainda avaliar a aceitabilidade da linguiça Toscana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) foram comercialmente adquiridos lacrados em frascos âmbar (Merck).

2.2 Determinação da composição dos óleos essenciais

2.2.1 Análise CG-MS dos óleos essenciais

A análise qualitativa dos óleos essenciais de orégano, canela e tomilho foi determinada utilizando o cromatógrafo HP 6890 Série CG system com detector seletivo de massas HP 5973 com Impacto de elétrons (CG-MS-EI) coluna capilar DB-5MS Agilent Technologies (30m x 320mm x 0,25µm). O gás de arraste utilizado foi Hélio (99,999% de pureza) na velocidade de 22,7 ml/min. A rampa de aquecimento do forno variou de 60°C a 325°C. A energia de ionização utilizada foi de 70 eV e a temperatura de interface foi de 310°C. Os componentes dos óleos essenciais foram identificados por comparação de espectro de massas pela biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology).

2.3 Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de orégano, canela e tomilho

2.3.1 Microrganismos

Foram avaliadas 20 amostras de *Escherichia coli* de origem entérica de suínos e aves, e “classificadas através das técnicas moleculares de PCR” da coleção Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

2.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após pesagem de 1g, cada óleo essencial foi diluído com metanol até atingir a concentração de 640mg. ml⁻¹ (solução I). A seguir, foi diluído na proporção de 1:100 em Caldo Muller-Hinton, obtendo-se a concentração de 6400µg ml⁻¹ (solução II). Com base no documento M31-A3 do CLSI (2008), volumes de 100µl de caldo Muller-Hinton foram distribuídos nos poços de uma placa de microtitulação. Em seguida, 100µl da solução II foram acrescentados ao primeiro poço e, após homogeneização, transferia-se para o segundo e assim sucessivamente, obtendo-se concentrações finais de 3200, 1600, 800, 400, 200, 100µg ml⁻¹. As colônias de *Escherichia coli* foram desenvolvidas no Agar Muller-Hinton, suspensas em solução salina 0,085% obtendo-se uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland (1x10⁸ UFC.ml⁻¹). Desta suspensão, inoculava-se 10µl (1x10⁵ UFC.ml⁻¹) em cada poço já contendo os óleos essenciais. As microplacas foram incubadas durante 24h/35°C, em condições de aerobiose. A CIM consistiu na menor concentração do óleo essencial capaz de causar inibição total do crescimento bacteriano. Esses ensaios foram realizados em triplicata.

As CBMs foram determinadas a partir dos poços onde, após 24hs de incubação não havia crescimento bacteriano visíveis. Destes transferia-se uma alíquota de 10µl

para a superfície do ágar Muller-Hinton. Após 24hs de incubação a 35°C, registrava-se a menor concentração dos óleos essenciais, nos quais não se evidenciava crescimento bacteriano. Esses ensaios foram também realizados em triplicata.

A CBM foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de causar a morte do inóculo.

2.3.3 Análise estatística

Foram utilizados os métodos estatísticos ANOVA seguido dos testes de Dunett ou Tukey com limite de tolerância de 0,05.

2.4 Elaboração da massa do embutido

Os lotes experimentais da massa de embutido da linguiça Toscana foram elaborados de acordo com a formulação de Terra (1998) (Tabelas 1) e adicionada dos óleos essenciais.

Tabela 1. Formulação da Linguiça Toscana (controle)

Matéria Prima	kg	%
Retalho Suíno (magro)	84	73,6842
Retalho Suíno (60% G.)	16	14,0351
Ingredientes		
Água/Gelo	10	8,7719
Sal	0,6	0,5263
Condimentos para linguiça Toscana 297-A	1	0,8772
Kura gel	1	0,8772
Fixa gel	1	0,8772
Alho moído	0,2	0,1754
Pimenta Branca moída	0,1	0,0877
Manjerona Seca	0,05	0,0439
Glutamato	0,05	0,0439
Total	114,00	100

Nos tratamentos foram adicionados os óleos essenciais de orégano, canela e tomilho nas concentrações de $200\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $400\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1600\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $3200\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $8000\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

2.5 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir da cultura ativa de *Escherichia coli* ATCC 25922, diluída em solução salina 0,85% a uma concentração de aproximadamente $10^8\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$, comparável à solução padrão de Mc Farland 0,5, verificada espectrofotometricamente a 625nm. A suspensão foi diluída a aproximadamente $10^5\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$, em solução salina e adicionada 1ml da mesma em sacos plásticos estéreis com 25g de massa de linguiça Toscana, finalizando com inóculo de $10^3\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$.

2.5.1 Análises microbiológicas

A massa cárnea foi pesada em porções de 25g em sacos plásticos estéreis, identificados e armazenados durante 30 dias, a 5°C .

As análises microbiológicas de coliformes totais e termotolerantes foram realizadas nos dias 0,10,15,20 e 30 dias em triplicata no Laboratório de Análises Micológicas (LAPEMI). Para preparação das amostras foram coletadas 25g da massa de linguiça Toscana e homogeneizadas com 90 ml de água peptonada em Bag Mixer por 2 minutos. Após homogeneização foram feitas as diluições sucessivas utilizando-se água peptonada 0,1% e pipetadas alíquotas de 1 ml de inóculo em placas de Petrifilm 3M. Após as placas foram armazenadas com temperatura própria de cada análise, devidamente identificadas. Método Oficial AOAC® 991.14/3M.

2.6 Análise sensorial

Para realização da análise sensorial foram elaborados novos lotes de Linguíça frescal Toscana adicionadas do óleo essencial de orégano e de canela nas concentrações de 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e embutidas em tripa natural suína, acondicionada em porções de 500g para cada tratamento, em sacos plásticos sob vácuo, por 7 dias à temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. A análise sensorial da linguíça assada foi realizada por 50 julgadores não treinados, através do teste de escala hedônica. Os parâmetros avaliados foram: cor, odor, sabor, textura, utilizando-se uma escala estruturada de sete pontos em que 1 equivalia a “desgostei muitíssimo” e 7 a “gostei muitíssimo”. A realização da análise sensorial foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Maria .

2.7 Análise Estatística

Os dados obtidos em todas as análises realizadas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para cada dia de análise, com nível de significância de ($p < 0,05$). As diferenças entre as médias foram determinadas pelos Testes de Dunnett e Tukey ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição dos óleos essenciais

Os óleos essenciais usados no presente estudo foram caracterizados por cromatografia gasosa (CG-MS). Os compostos quantificados de cada óleo essencial estão apresentados nas tabelas 2,3,4.

Tabela 2. Cromatograma do OE de canela

Composto químico	Porcentagem
trans- cinnamaldehyde	64,98%
cinnamyl acetate	5,89%
Benzaldehyde	1,89%
cinnamaldehyde	15,65%

Tabela 3. Cromatograma do OE de orégano

Composto químico	Porcentagem
p-cimene	16,58%
(-)- β -pinene	2,09%
α -Terpinene	2,24%
1,4-cyclohexadiene	8,48%
β -Linalool	2,77%
Caryophyllene	3,73%
Carvacrol	43,36%
Thymol	13,86%

Tabela 4. Cromatograma do OE de tomilho

Composto químico	Porcentagem
1-R- α -pinene	5,04%
p-Cimene	23,71%
γ -Terpinen	8,55%
Linalool	6,50%
Camphor	3,24%
borneol	2,15%
thymol	18,35%
carvacrol	2,15%
Caryophyllene	3,51%

3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O óleo essencial de orégano apresentou média de 672,71 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para os valores de CIM. Semelhante a este estudo, Höferl et al. (2009), encontraram forte atividade do óleo essencial de *O. vulgare* contra *Escherichia coli*. Silva et al. (2010) relataram que o óleo essencial de orégano proveniente do Mediterrâneo com p-cimeno e γ -terpineno

além de carvacrol, apresentou maiores halos de inibição para *Salmonella enteritidis* que os óleos essenciais de orégano de outras regiões. O óleo essencial de canela obteve CIM média = 828,21 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Diferente a este estudo Höferl et al. (2009), encontraram fraca atividade do *C. zeylanicum* frente a bactérias gram-negativas. Usando a técnica de disco-difusão.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) dos óleos essenciais de orégano, canelatomilho contra isolados de *Escherichia coli*

OE	CIM		CBM	
	Variação	MG	Variação	MG
Orégano	3200-400	672,71	6400-400	2039,29
Canela	3200-400	828,21	6400-400	2039,29
Tomilho	3200-400	627,66	6400-400	1902,73

OE=óleo essencial, CIM = concentração inibitória mínima, CBM = concentração bactericida mínima, MG = média geométrica

Trajano et al. (2009) relataram que *C. zeylanicum* inibiu bactérias isoladas de alimentos com formação de halos de inibição de até 30mm de diâmetro.

Gutierrez et al. (2009) encontraram que o orégano e tomilho foram os mais efetivos óleos essenciais para inibição de *Listeria spp.* Pozzatti et al. (2008) avaliaram o óleo essencial de tomilho e o mesmo apresentou atividade antifúngica frente adiversas cepas de *Candida spp.* com CIMs variando de 400-3200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hammer et al. (1999) relataram a atividade do tomilho contra *C. albicans*, *S. aureus* e *E.coli* apresentando a concentração inibitória mínima de 0.03% (v/v) para os microrganismos citados.

3.3 Aplicação do óleo essencial de canela , óleo essencial de orégano e óleo essencial de tomilho em massa de linguiça frescal

3.3.1 Análises microbiológicas

As contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes ao longo do período de armazenamento sob refrigeração estão apresentadas nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Contagem média de coliformes totais (UFC/g) na massa de linguiça frescal e adicionadas dos óleos essenciais nas concentrações de 200 a 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ durante o período de armazenamento a 5°C

Dias	Óleo	Controle	Concentração ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
			200	400	1600	3200	8000
0	Canela		4,91b	4,78b	4,57c,*	4,49c,*	3,65b,*
	Orégano	4,9	2,65a,*	2,74a,*	2,63a,*	2,62a,*	2,67a,*
	Tomilho		4,86b	4,85b	3,26b,*	3,28b,*	2,78a,*
10	Canela		3,45a	3,15a	0,48a,*	0,3a,*	0,83a,*
	Orégano	3,7	2,85a,*	2,77a,*	2,64ab,*	2,45b,*	2,08b,*
	Tomilho		3,52a	2,99a,*	2,72b,*	2,67b,*	2,43b,*
15	Canela		2,83a,*	0,89a,*	0a,*	0a,*	0a,*
	Orégano	4,7	2,45a,*	2,45b,*	2,11c,*	2,08c,*	2b,*
	Tomilho		6,11b,*	5,26c,*	0,36b,*	0,23b,*	0,67b,*
20	Canela		6,36b,*	5,72b,*	0,11b,*	0a,*	0a,*
	Orégano	5,32	2,23a,*	0,95a,*	2c,*	2,15b,*	0a,*
	Tomilho		7,4c,*	5,67b	0a,*	0a,*	0a,*
30	Canela		6,98c,*	6,81c,*	0a,*	0a,*	0a,*
	Orégano	5,6	2,32a,*	2,28a,*	2,2b,*	0a,*	0a,*
	Tomilho		6,23b,*	5,85b,*	0a,*	0a,*	0a,*

As médias foram transformadas em \log_{10} antes de serem analisadas. * $P < 0,05$, em comparação aos respectivos controles (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de óleo) (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett). Médias com letras diferentes na coluna dentro do mesmo dia são estatisticamente diferentes (ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P < 0,05$)

O tratamento controle apresentou um crescimento de coliformes totais durante o período de 30 dias de armazenamento (tabela 6). Quanto a aplicação dos óleos essenciais, observou-se que a adição do óleo de tomilho em linguiça Toscana

apresentou atividade antimicrobiana somente a partir da aplicação de 1600, 3200 e 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, apresentando um decréscimo na contagem de coliformes totais até 15º dia de armazenamento. Após este período, a aplicação de óleo de tomilho foi eficiente, eliminando a contaminação destes microrganismos. Ivanovic et al. (2012) relataram significativa atividade antibacteriana de extrato de tomilho e óleo essencial de tomilho contra bactérias Gram- negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella*) obtendo valores de concentração inibitória mínima de 640 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Essa alta atividade antimicrobiana foi atribuída a alta quantidade de timol no extrato (39,7%) e no óleo essencial (48,49%). Silva et al. (2013) também relataram atividade antimicrobiana do OE de *Thymus vulgaris* contra *Escherichia coli* 5% (V/V) além de outras bactérias de origem alimentar. Observa-se que o óleo essencial de canela não foi eficiente no controle do desenvolvimento destes microrganismos nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Entretanto, a partir da concentração de 1600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ até a maior concentração (8000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), o óleo de canela foi eficiente tanto no decréscimo da contagem aos 10 dias de armazenamento como a completa eliminação desses microrganismos nos dias 15, 20 e 30. Semelhante a esses valores de inibição, Moarefian et al. (2013) encontraram atividade antimicrobiana e antioxidante do *Cinnamomum zeylanicum* apresentando (CIMs e CBMs 0.130mg/mL, 0.259 mg/mL) contra *Escherichia coli*. O óleo de orégano foi eficiente em controlar o desenvolvimento de coliformes totais nas concentrações de 200, 400 e 1600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ durante todo o período de armazenamento, reduzindo levemente a contaminação por esses microrganismos. Na concentração de 3200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, o óleo de orégano foi muito eficiente somente no 30º dia de armazenamento da linguiça Toscana, quando eliminou completamente a presença destes microrganismos, o que também ocorreu aos 20 e 30 dias, quando da aplicação de 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Logo, de modo geral, a presença do óleo de orégano na linguiça Toscana foi

eficiente em controlar a contaminação inicial por coliformes totais nas condições deste trabalho. A eficiência antimicrobiana do óleo essencial de orégano foi observada em outros estudos como Bussata et al. (2007), onde pesquisaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano com 11.66 % de carvacrol para diversos patógenos de origem alimentar, dentre estes, *Escherichia coli* e *Salmonella*, ambos apresentaram MIC = 0,46mg.ml⁻¹ sendo que *Staphylococcus aureus* MIC = 0,23 mg.ml⁻¹.

Na tabela 7 encontram-se os resultados da contagem de coliformes termo tolerantes na massa de linguiça Toscana adicionada dos óleos essenciais de tomilho, canela e orégano, nas concentrações de 200 a 8000 µg.ml⁻¹ durante o período de 30 dias com armazenamento a 5°C.

Tabela 7. Contagem de coliformes termotolerantes na massa de linguiça frescal e adicionadas dos óleos essenciais nas concentrações de 200 a 8000 µg.ml⁻¹ durante o período de armazenamento a 5°C

Dia	Óleo	Controle	Concentração (µg/ml)				
			200	400	1600	3200	8000
0	Canela		4,66a	4,52b	4,23c	4,11b	2,92b
	Orégano	3,77	3,54a	2,11a,*	2,67b,*	2,36a,*	2,86b
	Tomilho		4,51a	4,61b	0,83a,*	0,83a,*	0a,*
10	Canela		3,2b	0,83a,*	0,52a,*	0,3a,*	0,83a,*
	Orégano	3,38	0a,*	0a,*	0a,*	0a,*	0a,*
	Tomilho		3,2b	0,83a,*	0,52a,*	0a,*	0,52a,*
15	Canela		0,83a,*	0a,*	0a,*	0a,*	0a,*
	Orégano	3,56	0a,*	0a,*	0a,*	0a,*	0a,*
	Tomilho		5,86b,*	5,15b,*	0,52a,*	0a,*	0,83a,*
20	Canela		5,43b	3,52a,*	0a,*	0a,*	0a,*
	Orégano	4,78	0a,*	0a,*	0a,*	0a,*	0a,*
	Tomilho		6,28a,*	5,2b	0a,*	0a,*	0a,*
30	Canela		5,6b	5,72b	0a,*	0a,*	0a,*
	Orégano	5,43	0a,*	0a,*	0a,*	0a,*	0a,*
	Tomilho		6,18b,*	5,63b	0a,*	0a,*	0a,*

As médias foram transformadas em log₁₀ antes de serem analisadas. *P < 0,05, em comparação aos respectivos controles (0 µg/ml de óleo) (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett). Médias com letras diferentes na coluna dentro do mesmo dia são estatisticamente diferentes (ANOVA seguido pelo teste de Tukey; P < 0,05).

As concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de tomilho e canela, quando adicionadas na massa de linguiça Toscana, não foram eficientes no controle dos coliformes termo tolerantes durante os 30 dias de armazenamento. Entretanto, quando adicionadas as concentrações de 1600, 3200 e 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, observou-se uma forte atividade antimicrobiana destes óleos, reduzindo drasticamente a contagem destes microrganismos durante todo o período de armazenamento. O óleo essencial de orégano foi o mais eficiente no controle da contaminação de coliformes termotolerantes em todas as concentrações aplicadas na massa de linguiça Toscana, onde já no 10º dia de armazenamento eliminou a presença destes microrganismos e manteve assim até o final dos 30 dias. Pesquisas semelhantes com óleos essenciais foram realizadas como Viuda - Martos et al. (2010) que avaliaram o efeito da adição de fibra de laranja e óleo essencial de orégano em mortadela, e verificaram uma redução na contaminação do produto adicionado de fibra e de óleo essencial, comparativamente ao controle. Ao final do período de armazenamento de 24 dias, a amostra controle atingiu uma contagem total de mesófilos de 6 log UFC/g, ao passo que o produto contendo o aditivo natural ainda não havia atingido este nível de contaminação. Careaga et al. (2003), avaliaram a atividade antibacteriana de um extrato de pimentão sobre *Salmonella Typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* em carne bovina moída observaram que a concentração de 1,5% (v/p) do extrato foi capaz de inativar *Salmonella*, enquanto a concentração de 0,3% foi bacteriostática para *P. aeruginosa*.

Em outro estudo, Bussata et al. (2008) observaram que ao final do armazenamento de 25 dias da linguiça adicionada de inóculo *Escherichia coli* 1×10^3 NMP / g, esta apresentou contagem de $1,1 \times 10^5$ NMP/ g, enquanto que a linguiça adicionada de inóculo e óleo essencial de manjerona nas concentrações de 2,3 mg/ g e 5,75 mg/ g apresentaram contagem de $9,3 \times 10^3$ NMP/ g, redução está atribuída a

presença do composto terpinen - 4 - ol no óleo essencial de manjerona. Também com relação a inibição de coliformes, Hac – Szymanczuk et al. (2011) verificaram que o óleo essencial de alecrim (1,0%) aplicado em uma massa à base de carne suína e água armazenada a 4 - 6 °C por 7 dias foi capaz de reduzir a contaminação pelos mesmos. De acordo com Gutierrez et al. (2008) a aplicação dos óleos essenciais para o controle de patógenos e bactérias de deterioração de alimentos exige a avaliação de uma série de aspectos entre estes os efeitos da composição do alimento sobre a atividade antimicrobiana.

3.3.2 Análise sensorial

Os resultados obtidos na análise sensorial das linguças adicionadas do óleo essencial de orégano e óleo essencial de canela nas concentrações de 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Médias das notas atribuídas para as cinco amostras de linguça pelo teste afetivo da escala hedônica

Atributos	Características sensoriais				
	C	OR 200	OR 400	CAN 200	CAN 400
Cor	5.14 ^a	5.68 ^a	5.34 ^a	5.50 ^a	5.42 ^a
Odor	5.10 ^{ab}	5.50 ^a	5.28 ^{ab}	4.64 ^{bc}	4.24 ^c
Sabor	5.45 ^a	5.20 ^a	5.10 ^a	4.26 ^b	4.06 ^b
Textura	5.71 ^a	5.62 ^a	5.60 ^a	5.48 ^a	5.40 ^a

Valores apresentados como médias. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Escores: 1 = desgostei muitíssimo; 2 = desgostei muito; 3 = desgostei moderadamente; 4 = nem gostei/nem desgostei; 5 = gostei moderadamente; 6 = gostei muito; 7 = gostei muitíssimo. C = controle; OR 200 = óleo essencial de orégano 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; OR 400 = óleo essencial de orégano a 400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; CAN 200 = óleo essencial de canela a 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; CAN 400 = óleo essencial de canela a 400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

A análise de variância demonstrou que não houve diferença ($p < 0,05$) entre as amostras nos atributos cor e textura, com as médias entre “gostei moderadamente” e

“gostei muito”. Já o atributo sabor não houve diferença entre o controle e a linguiça adicionada do óleo essencial de orégano nas concentrações de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, com médias entre “gostei moderadamente” e “gostei muito”, mas esses diferindo das médias da linguiça adicionada do óleo essencial de canela nas concentrações de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, onde essas tiveram menores médias, indicando menor aceitação do público.

Os resultados obtidos na análise sensorial permite concluir que a adição do óleo essencial de orégano e de canela nas concentrações de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na linguiça obtiveram aceitação do consumidor. Todos os atributos pontuaram com médias superiores a 4, ou seja, nenhuma média com a opinião “desgostei”.

Esta nossa avaliação concorda com autores que também aferiram a aceitação positiva do público na adição de óleos essenciais em produtos cárneos. Bussata et al., 2008 encontraram aceitação de linguiça adicionada de óleo essencial de manjerona (*Origanum majorana*) em concentrações que obtiveram resultados com atividade bacterioestática. Moarefian et al., 2013 estudaram as propriedades antimicrobianas de linguiça adicionada de óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) nas concentrações de 40 ppm e 60 ppm, onde estas na análise sensorial obtiveram maiores médias nos itens sabor e odor em relação ao controle. Também Rattanachaikunsopon & Phumkachorn; 2010 mediram o efeito antimicrobiano do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum*) contra *Salmonella enteritidis* em alimentos e a análise sensorial de presunto cru adicionado do óleo de manjeriço na concentração de 100 ppm obteve médias semelhantes ao controle, acima de 6 caracterizando satisfação do consumidor.

Mas é necessário frisar que este nosso experimento avaliou pela primeira vez o uso de óleos essenciais e orégano, canela e tomilho sobre bactérias termotolerantes em linguiça Toscana frescal.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os óleos essenciais de orégano, canela e tomilho obtiveram atividade antimicrobiana *in vitro* e adicionados na massa de linguiça Toscana. Estes resultados sugerem que estes óleos essenciais adicionados em produtos cárneos podem aumentar a vida útil de prateleira e diminuir a contaminação de coliformes termotolerantes. O uso dos óleos essenciais de orégano e canela, nas concentrações de 200 ug.ml⁻¹, e 400 ug.ml⁻¹, agradou ao paladar de 50 pessoas em um teste às cegas.

5 REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 4, de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 05 abr. 2000, seção I, p. 6-10.
- BUSATTA, C.; MOSSI, A. J.; RODRIGUES, M. R. A.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 610-616, 2007.
- BUSATTA, C.; VIDAL, R. S.; POPIOLSKI, A. S.; MOSSI, A. J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M. R. A., CORAZZA, F. C., CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J.; CANSIAN, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**. v. 25 p. 207-211, 2008.
- CAREAGA, M.; FERNÁNDEZ, E.; DORANTES, L.; MOTA, L.; JARAMILLO, M. E. AND HERNANDEZ-SANCHEZ, H. Antimicrobial activity of capsicum extract against

Salmonella typhimurium and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat.

International Journal of Food Microbiology, v. 03, p. 331-335, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard-3rd Edition M31-A3. Wayne, PA, USA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008.

GRIFFIN, P.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic Review**. v. 13, p. 60-98, 1991.

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

HAC-SZYMAŃCZUK, E.; LIPÍŃSKA, E.; STASIUK, M. The effect of rosemary preparations on the microbial quality and TBARS value of model pork batters. **Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.** v. 10 (2), p. 165-174, 2011.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86 p. 985-990, 1999.

HÖFERL, M.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; SCHMIDT, E.; STOYANOVA, A.; DENKOVA, Z.; SLAVCHEV, A. AND GEISSLER, M. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**. v. 21, p. 459-464, 2009.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. & MIYAJI, S. O. **Diagnóstico diferencial das enfermidades bacterianas, fúngicas e parasitárias que acometem os frangos de corte**. 2007, Cascavel: Coluna do Saber, 160p.

KINSMAN, D. M.; KOTULA, A. W. AND BREIDENSTEIN, B. C. **Muscle Foods, Meat, Poultry and Seafood Technology**. New York: Chapman & Hall, 1994.

MOAREFIAN, M.; BARZEGAR, M. AND SATTARI, M. *Cinnamomum Zeylanicum* essential oil as a natural antioxidant and antibacterial in cooked sausage. **Journal of Food Biochemistry**. v. 37 (1), p. 62-63, 2013.

PEREIRA, A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R. AND GUIMARÃES, L. G. L. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciências Agrotécnicas**, v. 22 (3), p. 887-893, 2008.

PETER, K. V. (Ed.). **Handbook of herbs and spices**. v. 2 .Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004. 360 p.

POZZATTI, P.; LORETO, E. S.; LOPES, P. G.; ATHAYDE, M. L.; SANTURIO, J. M. AND ALVES, S. A. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**. v. 53, p. 12-15, 2008.

RATTANACHAIKUNSOPON, P. AND PHUMKACHORN, P. Antimicrobial activity of Basil (*Ocimum basilicum*) Oil against *Salmonella* Enteritidis *in vitro* and in food. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 74 (6), p. 1200-1204, 2010.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M. AND BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of diferente origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91 (4), p. 621-632, 2005.

TERRA, N. N. **Apontamento de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 1998, 216p.

TRAJANO, V. N. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. v. 29, p. 542-545, 2009.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. AND PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Effect of adding citrus waste water, thyme and oregano essential oil on the chemical, physical and sensory characteristics of a Bologna sausage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 10 p. 655-660, 2009.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. AND PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of *mortadela*. **Meat Science**, v. 85, p. 568-576, 2010.

5 CONCLUSÃO GERAL

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) e o composto timol, *in vitro*, contra isolados de *Escherichia coli*, foi avaliada utilizando a técnica de microdiluição conforme CLSI M31-A3. A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que, o óleo essencial de tomilho obteve melhor atividade antimicrobiana que o timol, com menores médias de CIM (concentração inibitória mínima) e CBM (concentração bactericida mínima).

A atividade antimicrobiana, *in vitro*, do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) e óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e os compostos carvacrol e cinamaldeído contra isolados de *Escherichia coli*, utilizando a mesma técnica citada acima, evidenciou que o óleo de orégano e o óleo de canela obtiveram melhor atividade antimicrobiana em relação aos compostos.

Os resultados do capítulo 4 itens 4.1 e 4.2 sugerem que os óleos essenciais de tomilho, orégano e canela podem reduzir o uso de antimicrobianos artificiais em alimentos, já que a deterioração de produtos alimentares, especialmente aqueles derivados de carne por microrganismos, entre estes *Escherichia coli*, é um grande problema na indústria. Este uso após maiores estudos com relação a interação dos óleos essenciais com os alimentos e a aceitação pelos consumidores.

O item 4.3 deste trabalho estudou a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) *in vitro* contra 20 isolados de *Escherichia coli*. Os óleos essenciais obtiveram igual atividade antimicrobiana, não havendo diferença ($p > 0,05$) entre as médias geométricas dos CIMs e CBMs dos mesmos. Estes então foram aplicados em massa de linguiça Toscana adicionada de inóculo de *Escherichia coli* (1×10^3 UFC / g) nas mesmas concentrações testadas *in vitro* e armazenadas a 5°C durante 30 dias. Neste período foram realizadas contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes. Houve redução tanto de coliformes termotolerantes como de coliformes totais neste tempo de armazenamento com a adição dos óleos essenciais de orégano, canela e tomilho. Os óleos essenciais de orégano e tomilho foram testados sensorialmente na linguiça Toscana adicionada dos mesmos nas concentrações de 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ e 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, havendo aceitação pelo público. Os resultados obtidos permitem concluir que estes

óleos essenciais adicionados em produtos cárneos podem aumentar a vida útil de prateleira e diminuir a contaminação de coliformes no produto. Porém os componentes dos óleos essenciais e alimentos requerem maiores estudos para essas substâncias serem usadas com segurança.

REFERÊNCIAS

- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food Chemistry Toxicological**. v. 46 p. 446-475, 2008.
- BAUER, K. et al. **Common Fragrance and Flavor Materials**. Preparation, Properties and Uses. Wiley-VCH, Weinheim, p. 293, 2001.
- BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oils extract of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) **Lebensmittel - Wissenschaft und - Technologia**. v. 37, p. 263-268, 2004.
- BEZERRA, W. I. et al. Qualidade microbiológica de lingüiça mista tipo frescal comercializada no município de Solânea, PB, Brasil. In: **Jornada Nacional da Agroindústria**, 2., 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº4 de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**: Brasília, 05 de abr. 2000, seção I, p. 6-10.
- BUCHANAN, R. L; DOLE, M. P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Food Technology**, v. 51, p. 69-76, 1997.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 162-167, 2003.
- BUSATTA, C. et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**. v. 25 p. 207-211, 2008.
- BUSATTA, C. et al. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 610-616, 2007.

CAREAGA, M. et al. Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 331-335, 2003.

COSENTINO, S. et al. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thuym*s essential oils. **Letters in Applied Microbiology**. v. 29, p. 130-135, 1999.

COSTA, P. et al. Productos naturales de origen vegetal: una alternativa a los antimicrobianos em alimentación animal. **Anaporc**. v. 190, p. 51-57, 1990.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 564-582, 1999.

DAVIDSON, P. M.; NAIDU, A. S. Phyto-phenol. In: NAIDU, A. S. (Ed.), **Natural Food Antimicrobial Systems**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 265-294, 2000.

DEANS, S. G.; SVOBODA, K. P. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) Volatile Oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 5, n. 3, p. 187-190, 2006.

DELAMARE, A. P. L. et al. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, p. 603-608, 2007.

DIGRAK et al. Antibacterial and antifungal activities of Turkish medicinal plants. **Pharmaceutical Biology**, 39 (5), p. 346-350, 2001.

FRANCO, B. D. G. M. et al. Viabilidade de *Escherichia coli* patogênica em linguiça frescal suína. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 3, p. 319-325, 2010.

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

GUTIERREZ, J. et al. The antimicrobial efficacy of plant essential oils combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 91-97, 2008.

HAMMER, K. A. et al. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86 p. 985-990, 1999.

HÖFERL, M. et al. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, p. 459-464, 2009.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. Aromatic natural raw materials – Vocabulary. **ISO 9235:1997**. Geneva, 1997.

JONES, F.A. Herbs – useful plants. Their role in history and today. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, p. 1227-1231, 1996.

KINSMAN et al. **Muscle Foods, Meat, Poultry and Seafood Technology**, New York: Chapman & Hall, 1994.

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

LÓPEZ, P. et al. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6939-6946, 2005.

MAHBOUBI, M.; BIDGOLI, F. G. Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. **Phytomedicine**, v. 17, p. 548-550, 2010.

MANHOSO, F. F. R. Aspectos químicos e microbiológicos das linguiças tipo frescal no Brasil. **Revista Nacional da Carne**, v. 230, p. 90-92, 1996.

MARINO et al. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiacea* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology** v. 67, p. 187-195, 2001.

MARQUES, S. C. et al. Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras- MG. **Ciências Agrotécnicas Lavras**. v. 30, 6, p. 1120-1123, 2006.

MARTINS, T. D. D. et al. Avaliação das condições higiênico-sanitárias em estabelecimentos que comercializam embutidos derivados dos suínos em Solânea, PB. In: Congresso Latino Americano de Suinocultura, 3, 2006, Foz do Iguaçu, PR. **Anais**. Foz do Iguaçu: 2006.

MASAKI, H. et al. Active- oxygen scavenging activity of plant extracts. **Biological and Pharmacological Bulletin**, 18 (1), p. 162-166, 1995.

McGIMPSEY, J. A. et al. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 9, p. 347-352, 1999.

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

MOYLER, D. CO₂ extraction and other new technologies: an update on commercial adoption. International Federation of Essential Oils and Aroma's. **IFEAT**, London, p. 33-39, 1998.

MYTLE, N. et al. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**, v. 17, p. 102-107, 2006.

PACKIYASOTH, E. V.; KYLE, S. Antimicrobial properties of some herb essential oils. **Food Australia**. 54 (9), p. 384-387, 2002.

POZZATTI, P. et al. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**, v. 53, p. 12-15, 2010.

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

SI, H. et al. Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 53, p. 190-194, 2008.

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

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 1999.

SMITH-PALMER, A. et al. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118-122, 1998.

TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 1998, 216p.

ULTEE, A. et al. Antimicrobial activity of Carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 620-624, 2000.

VARNAN, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Carne y productos cárnicos: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Acribia, 1998, 71p.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 526-531, 2008.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Effect of adding citrus waste water, thyme and orégano essential oil on the chemical, physical and sensory characteristics of a Bologna sausage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 10 p. 655-660, 2009.