



RODRIGO DE ARAÚJO SOARES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS FRENTE À *Salmonella enterica*
Enteritidis INOCULADA EM CARNE MOÍDA
BOVINA**

**LAVRAS - MG
2010**

RODRIGO DE ARAÚJO SOARES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE À
Salmonella enterica Enteritidis INOCULADA EM CARNE MOÍDA
BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS – MG
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Soares, Rodrigo de Araujo.

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente à *Salmonella enterica* Enteritidis inoculada em carne moída bovina / Rodrigo de Araujo Soares. – Lavras: UFLA, 2010.

95 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli

Bibliografia

1. Aditivos naturais. 2. Microbiologia de Alimentos. 3. Ação Bactericida. 4. Segurança alimentar. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 661.806

RODRIGO DE ARAÚJO SOARES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE À
Salmonella enterica Enteritidis INOCULADA EM CARNE MOÍDA
BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 09 de agosto de 2010.

Dra. Maria das Graças Cardoso

UFLA

Dr. Alexandre Tourino Mendonça

UNINCOR

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

LAVRAS – MG

2010

A minha mãe Carmelita Diniz Araújo

“in memoriam”

OFEREÇO

A Deus pela fé e esperança;

a Geraldo Soares Silva Filho, meu pai;

aos meus irmãos Rogério e Olga Maria.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força nos momentos difíceis e por sempre colocar em minha vida pessoas maravilhosas.

Ao meu pai Geraldo, que sempre me deu total e irrestrito apoio, nos momentos felizes e tristes desta e de outras caminhadas. Este trabalho só pôde ser realizado graças a ele. Deixo aqui meus eternos agradecimentos.

As minhas queridas orientadoras Roberta Hilsdorf Piccoli e Maria das Graças Cardoso, pelo apoio, amor e paciência. Pelos ensinamentos, valiosas sugestões e críticas, e pelo convívio durante esses dois anos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Química do DQI, Milene Aparecida, Aline Mallet e Lucilene Fernandes, pela colaboração e presteza sempre.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do DCA, em especial à laboratorista Eliane Alcântara e aos alunos de graduação Query e Tenille, que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Um agradecimento especial aos grandes amigos Thales Leandro, Alexandre Cristiano, Alessandra Millezi e Victor Tebaldi pela amizade sempre sincera e apoio em todas as horas.

A todos do Departamento de Ciência dos Alimentos, em especial aos professores Eduardo Mendes e Eduardo Valério, à laboratorista Tina e à secretária Lucilene, pelo apoio e colaboração.

Um agradecimento mais que especial a minha namorada Gláucia, pelo companheirismo, amor e dedicação, sempre. Por me orientar em todos os aspectos da minha vida. Posso não ser um grande homem, mas tenho ao meu lado uma grande mulher.

TeAmo!

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, só tenho a agradecer.

Muito Obrigado!

RESUMO

Foi estudado o efeito antimicrobiano de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) sobre *Salmonella enterica* Enteritidis S64 *in vitro* e inoculada em carne moída bovina sob refrigeração durante seis dias de armazenamento. Foi verificada a ação destes óleos também sobre a microbiota acompanhante, no último dia de armazenamento. Os óleos essenciais utilizados foram extraídos através de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado, e o teste *in vitro* foi feito baseado no método de Difusão Cavidade em Ágar. Obteve-se, assim, a Concentração Mínima Inibitória (CMI) que foi igual a 0,39% v/v para os dois óleos. A partir desse resultado, foi estipulada a concentração mínima e máxima para o tratamento de amostras de carne moída bovina inoculada com *Salmonella enterica* Enteritidis S64 na concentração de 10^5 UFC/g, estocada por 6 dias sob refrigeração (7°C). Nos dias 0, 1, 2, 4 e 6 dias de armazenamento, foram feitas análises microbiológicas a fim de quantificar a população de *Salmonella* remanescente na carne e associar com o efeito antimicrobiano dos óleos. Paralelamente, foi observada a evolução da microbiota psicotrófica na amostra controle (sem óleo e sem inóculo) e o efeito dos óleos sobre microrganismos psicotróficos no sexto dia de armazenamento na carne inoculada com *Salmonella*. Ambos os óleos foram efetivos na redução da população do patógeno e da microbiota psicotrófica. As concentrações de 1,56% e 3,125% v/p do óleo de capim-limão mostrou atividade bactericida de 100% contra *Salmonella*, logo nas primeiras horas de contato (tempo 0). Já o óleo de orégano conseguiu o mesmo resultado com um dia de armazenamento na concentração de 3,125% e de quatro dias para 1,56%. A maior redução da microbiota psicotrófica foi conseguida pelo tratamento com orégano na concentração 3,125% p/v, que apesar de não a eliminar por completo, conseguiu a maior redução (5,19 Log UFC).

Palavras-chave: Microbiologia de alimentos. Segurança alimentar. Ação bactericida. Carne.

ABSTRACT

Was studied the antimicrobial effect of essential oils of oregano (*Origanum vulgare*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) against *Salmonella enterica Enteritidis* S64 *in vitro* and inoculated in ground beef under refrigeration during six days of storage. It was found the action of these oils also on the accompanying microbiota, in the last day of storage. The essential oils were extracted by hydrodistillation in a modified Clevenger apparatus, and *in vitro* test was done based on the method of Agar Diffusion cavity. Was obtained thus the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) that was equal to 0.39% v/v for the two oils. From this result, it was stipulated the minimum and maximum concentration for the treatment of samples of ground beef inoculated with *Salmonella enterica Enteritidis* S64 in concentration of 10^5 CFU /g, stored for 6 days under refrigeration (7°C). On days 0, 1, 2, 4 and 6 days of storage, microbiological tests were performed to quantify the population of *Salmonella* in meat and remaining associated with the antimicrobial effect of the oils. In parallel was observed the evolution of psychrotrophic microorganisms in a control sample (without oil and without inoculum) and the effect of oils on psychrotrophic microorganisms on the sixth day of storage on meat inoculated with *Salmonella*. Both oils were effective in reducing the pathogen population and psychrotrophic microorganisms. Concentrations of 1.56% and 3.125% v/w oil lemongrass showed bactericidal activity 100% against *Salmonella*, soon in the first hours of contact (time 0). But the oil of oregano has achieved the same result with one day of storage at a concentration of 3.125% and 1.56% for four days. The largest reduction of psychrotrophic microbiota was achieved by treatment with oregano concentration 3.125% v/w, which although not eliminate altogether, achieved the largest reduction (5.19 Log CFU).

Keywords: Food microbiology. Food safety. Bactericidal. Meat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários	34
Figura 2 Estrutura química do isopreno.....	35
Figura 3 Biossíntese de terpenos via DXPS (DEWICK, 2002).....	36
Figura 4 Ação dos óleos essenciais na célula bacteriana	42
Figura 5 Aspecto geral da espécie <i>Origanum vulgare</i> fresco (A) e seco (B)	43
Figura 6 Estruturas químicas do timol (A) e carvacrol (B).....	44
Figura 7 Aspecto geral da espécie <i>Cymbopogon citratus</i>	45
Figura 8 Estruturas químicas do neral (A) e do geranial (B).....	46
Figura 9 Aparelho de Clevenger modificado, utilizado na extração dos óleos essenciais	48
Figura 10 Esquema utilizado na execução do experimento	53
Figura 11 Halo de inibição obtido pelo método de difusão cavidade em agar para os óleos essenciais de orégano (A) e capim-limão (B) em <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis S64	60

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Efeito dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão) sobre *S. Enteritidis* S64 em carne moída bovina durante armazenamento à temperatura de 7°C por seis dias. Controle = sem óleo (0%)..... 68
- Gráfico 2 Contagem média de aeróbios psicrotróficos em carne moída bovina (controle). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Scott-Knott 5%)..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição centesimal e pH da carne bovina (<i>Quadriceps femoris</i>) moída utilizada no experimento	57
Tabela 2 Diâmetro médio dos halos inibitórios (D.H) em diferentes concentrações dos óleos essenciais de orégano (<i>O.vulgare</i>) e capim-limão (<i>C.citratus</i>) para <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis S64	59
Tabela 3 População de aeróbios psicrotróficos (Log ₁₀ UFC/g) no sexto dia de armazenamento presentes nas amostras de carne moída bovina. inoculadas com <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis S64 tratadas com óleos essenciais de orégano (<i>Origanum vulgare</i>) e capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)	76

LISTA DE ABREVIATURAS

v/v	Volume por volume
v/p	Volume por peso
UFC/g	Unidades Formadoras de Colônia por grama
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

LISTA DE SIGLAS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
CDC	Center for Disease Control and Prevention
OMS	Organização Mundial da Saúde
WHO	World Health Organization
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DQI	Departamento de Química
DCA	Departamento de Ciência dos Alimentos
UFLA	Universidade Federal de Lavras
GMP	Golpes por minuto
DIC	Delineamento inteiramente casualizado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	O Mercado da carne bovina.....	18
2.2	Carne moída bovina.....	19
2.3	Micro-organismos encontrados na carne.....	21
2.4	<i>Salmonella</i> spp.....	23
2.4.1	Taxonomia e características do micro-organismo	23
2.4.2	Epidemiologia.....	25
2.4.3	Ocorrência de <i>Salmonella</i> spp. em carne moída	28
2.5	Plantas aromáticas, condimentares e medicinais.....	31
2.6	Metabólitos secundários.....	32
2.7	Óleos essenciais	36
2.8	Atividade antimicrobiana de óleos essenciais <i>in vitro</i> e em alimentos.....	38
2.9	<i>Origanum vulgare</i> L. (orégano).....	42
2.10	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf (capim-limão).....	44
3	MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1	Local e condução do experimento	47
3.2	Obtenção dos óleos essenciais	47
3.3	Microrganismo e preparação do inóculo	49
3.3.1	Microrganismo utilizado	49
3.3.2	Manutenção e padronização da cultura.....	49
3.3.3	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de óleos essenciais	50
3.4	Análises físico-químicas da carne	51
3.4.1	pH.....	51
3.4.2	Composição centesimal.....	51
3.5	Modelo alimentar e preparo das amostras.....	51
3.6	Controle de qualidade microbiológica da carne adquirida.....	53
3.6.1	Contagem de <i>Salmonella</i> sp.	54
3.6.2	Contagem de micro-organismos aeróbios psicrotróficos	54
3.7	Enumeração de <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis e de aeróbios psicrotróficos viáveis na carne moída	55
3.8	Análises estatísticas.....	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	Composição centesimal e pH da carne.....	57
4.2	Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI).....	58
4.3	Enumeração de <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis S64 na carne bovina moída tratada.....	65
4.4	Contagem de aeróbios psicrotróficos	73

5	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80
	APÊNDICE.....	95

1 INTRODUÇÃO

A carne bovina *in natura* é amplamente consumida no Brasil, caracterizando-se por ser importante fonte de aminoácidos essenciais e vitaminas do complexo B da dieta do brasileiro. Entretanto, seu preço no mercado tem tido recorrentes aumentos, principalmente os cortes nobres, ditos carnes de “primeira”. Dessa forma, a carne moída se apresenta como uma opção barata e nutritiva para aqueles com menor poder aquisitivo, visto que o processo de moagem pode melhorar características como maciez e palatabilidade de cortes cárneos “menos nobres ou de segunda”. Entretanto, devido ao excesso de manipulação, associado as suas características intrínsecas como pH, atividade de água e composição centesimal, a carne moída está sujeita tanto à contaminação por bactérias deteriorantes quanto por patogênicas. Dentre as possíveis bactérias causadoras de infecção alimentar que podem estar presentes neste produto, a *Salmonella* é uma das que mais preocupam tanto os industrializadores de alimentos, quanto os consumidores e órgãos responsáveis pela saúde pública. A legislação brasileira é muito rígida no que tange os limites permitidos para esta bactéria nos alimentos. Assim a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em sua Resolução RDC n° 12, que estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, estipulou ausência de *Salmonella* em carne e produtos cárneos (BRASIL, 2001).

A *Salmonella* é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, anaeróbia facultativa, Gram negativa, não produtora de esporos e tem a forma de bastonete curto. É responsável por diversos surtos de salmonelose não só no Brasil como em todo o mundo, sendo seu principal habitat o trato gastrointestinal de humanos e animais. Apesar de ser uma bactéria mesófila, ela consegue se manter viável mesmo em baixas temperaturas (até 5°C). Assim, a refrigeração, método mais

utilizado para conservação de alimentos perecíveis como a carne, não é capaz de reduzir a quantidade deste patógeno se ele estiver presente.

Neste contexto, a utilização de aditivos naturais como os óleos essenciais pode ser uma alternativa eficiente no controle do patógeno em alimentos como a carne, visto que o consumidor atual vem preferindo este tipo de aditivo em detrimento de preservantes químicos, que são sabidamente prejudiciais à saúde. Óleos essenciais são substâncias lipofílicas voláteis e odoríferas, extraídos de partes de plantas, com atividades antimicrobiana e antioxidante comprovadas.

Diante do exposto, este trabalho objetivou avaliar o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) frente à *Salmonella enterica* Enteritidis S64 inoculada em carne moída bovina refrigerada e os reflexos dessa ação sobre a microbiota psicrotrófica acompanhante no último dia de estocagem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O Mercado da carne bovina

A atividade pecuária se desenvolveu no Brasil na época da colonização, surgindo como atividade secundária e de suporte à produção de outras culturas. A dinâmica da criação de gado localizou-se inicialmente no Nordeste, migrando posteriormente para a região Sul e Sudeste e, recentemente, para o Centro-Oeste brasileiro. De acordo com Furtado (2001), o modelo de acumulação de capital da economia criatória induzia a uma permanente expansão, transformando-se em um fator fundamental de penetração e ocupação do interior brasileiro.

A pecuária de corte ocupa hoje posição de destaque na economia e no comércio internacional. Apesar de aproximadamente 80% da produção de carne bovina ser destinada ao mercado interno, o crescimento expressivo das exportações nos últimos anos, tem contribuído para gerar os crescentes superávits da balança comercial brasileira. Em 2009, a produção mundial de carne bovina e bufalina, processada pela indústria frigorífica no mundo foi de 65,9 milhões de toneladas. Deste total, 9,2 milhões de toneladas (14%) foram processadas pelo Brasil, segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne – ABIEC (2010). Ainda segundo a associação, esse volume coloca o País na terceira colocação do *ranking* global que tem nas duas primeiras colocações os EUA (21%) e a União Européia, reunindo 27 países (15%), além de China (11%), Argentina (6%), Índia (5%), Rússia e México (3%), entre outros. Os principais destinos da carne brasileira *in natura* são: a Rússia, Irã, Hong Kong, Egito, Venezuela e Argélia. Já a carne industrializada tem como principais destinos os EUA, Reino Unido, Itália, Holanda e Japão (ABIEC, 2010). Só nos primeiros seis meses de 2010, o acumulado das exportações de carnes congeladas desossadas de bovinos chegou a mais de US\$

1,61 bilhão, e carnes desossadas frescas ou refrigeradas US\$ 224.679.140 no mesmo período (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR - MDIC, 2010).

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, artigo 17 (BRASIL, 1997) entende-se como carne de açougue as massas musculares maturadas e demais tecidos que as acompanham, incluindo ou não a base óssea correspondente, procedentes de animais abatidos sob inspeção veterinária.

Do ponto de vista nutritivo, a carne caracteriza-se pela natureza das proteínas que a compõe, sendo uma importantíssima fonte de proteínas de alta qualidade e valor biológico, devido a sua riqueza em aminoácidos essenciais. Além disso, contém gordura, vitaminas do complexo B e minerais, sobretudo o ferro (PARDI et al., 2001).

2.2 Carne moída bovina

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em sua Instrução Normativa nº 83, carne moída é definida como sendo o produto cárneo obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos, ou bufalinos, seguido de imediato resfriamento ou congelamento (BRASIL, 2003). Trata-se de um produto cru, resfriado ou congelado.

Houve um aumento no consumo de carne moída, tanto em países desenvolvidos, como nos países em desenvolvimento, dado ao fato dela ser uma forma melhor e mais conveniente de se aproveitar as carnes menos nobres, além de ser de baixo preço e permitir a inclusão de substâncias mais baratas, como amidos, farinhas e derivados protéicos vegetais, como soja (ALMEIDA; SCHNEIDER, 1983).

A carne moída destaca-se dentre os produtos cárneos, pela sua aceitabilidade e por se caracterizar como produto popular, sendo acessível à faixa da população com menor poder aquisitivo, além de poder ser usada em refeições de maneira prática e variada (MOTTA; BELMONTE; PANETTA, 2000). Porém, se as condições ao desenvolvimento microbiano forem favoráveis, a carne moída e os alimentos a ela misturados podem representar um risco à saúde daqueles que a consomem (ALMEIDA; SCHNEIDER, 1983).

É sabido que as carnes fragmentadas ou moídas acham-se com maior frequência de contaminação do que as carnes inteiras, correspondente aos mesmos animais (FRAZIER; WESTHOFF, 1993; OLIVEIRA et al., 2008). Neste processo tem-se um grande aumento na superfície de contato do alimento, o que o expõe ainda mais à contaminação. Além disso, a carne fragmentada tem potencial de óxido-redução positivo, já que está mais em contato com o oxigênio do que a carne compactada, o que facilita o desenvolvimento de micro-organismos aeróbios ou facultativos. Um agravante é o fato de que muitos micro-organismos patogênicos e deteriorantes são facultativos, ou seja, preferem, para seu metabolismo, condições aeróbias, mas a anaerobiose do meio não impede o seu desenvolvimento (FEHLHABER; JANETSCHKE, 1992). Por isso, há necessidade de atentar para as condições higiênico-sanitárias durante todo o processo de obtenção da carne, da sangria dos animais até a mesa do consumidor (KHALAFALLA; GERGIS; EL-SHERIF, 1993).

Outro fator relevante quanto ao risco de disseminação de micro-organismos pela carne moída é o fato dela muitas vezes ser proveniente de outras carnes que sofreram grande manipulação nos mercados e açougues, além de, em alguns casos, ter sofrido abusos de temperatura por longos períodos (RITTER; SANTOS; BERGMANN, 2001).

A higiene dos equipamentos e utensílios utilizados na manipulação da carne é um ponto crítico na obtenção de carne moída de qualidade. A presença

de bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais e termotolerantes, além de patógenos como *Salmonella* em carnes demonstra que há um grande risco à saúde de consumidores (LOGUERCIO; SILVA; ALEIXO, 2002).

2.3 Micro-organismos encontrados na carne

Por propiciar um excelente *habitat* para o desenvolvimento de micro-organismos e ser amplamente consumido pela população, a carne bovina é um dos alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares (GERMANO; GERMANO, 2001). A composição da carne é complexa e rica em nutrientes (água 75%; proteínas 19%; lipídeos 2,5%; carboidratos 1,2%; componentes nitrogenados solúveis 1,6%; componentes inorgânicos 0,6%; vitaminas traços); alta atividade de água (Aa), aproximadamente 0,99 e pH próximo da neutralidade (PRANDL et al., 1994). Estas características satisfazem as exigências mínimas para o desenvolvimento tanto de bactérias deteriorantes quanto patogênicas, além de fungos e leveduras.

A microbiota da carne depende das condições nas quais os animais foram criados, abatidos e processados (SILVA, 1997). A manipulação inadequada constitui-se em um dos principais fatores para a disseminação de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Dentre as causas mais comuns encontram-se a má utilização da temperatura no preparo e na conservação dos alimentos, a contaminação cruzada, a higiene pessoal deficiente, a preparação dos alimentos com muita antecedência ao seu consumo, a limpeza inadequada de equipamentos e utensílios e o contato de manipuladores infectados com os alimentos (CHESCA et al., 2004; OLIVEIRA;GERMANO; GERMANO, 2004; OLIVEIRA et al., 2008).

Os tecidos de animais saudáveis, exceto a superfície externa, trato gastrointestinal e as vias respiratórias, contêm poucos micro-organismos graças

aos mecanismos de defesa que controlam com eficiência a multiplicação dos agentes infecciosos em animais vivos. No entanto, a carne é contaminada quando há contato com a pele, pelo, patas, conteúdo gastrintestinal, equipamentos e utensílios, mãos e roupas de operários, água, carcaças e ar dos locais de abate e armazenamento (ROÇA; SERRANO, 1995).

A microbiota normal da pele, e os micro-organismos do solo e fezes, constituem os contaminantes das carcaças. Cita-se as leveduras, os membros das famílias *Bacillaceae*, *Micrococaceae*, *Enterobacteriaceae*, além de *Corynebacterium*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* e *Listeria* sp., sendo as bactérias mesófilas as predominantes (GIL, 2002). Dentre os gêneros bacterianos mais comumente encontrados na carne moída estão: *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Staphylococcus* além de fungos filamentosos e leveduriformes (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

Em carnes processadas e mantidas sob refrigeração, é grande a proliferação de micro-organismos psicotróficos. Estes são capazes de crescer a temperaturas entre 0 e 7°C, apesar de apresentarem temperatura ótima acima de 20°C. No método cultural de quantificação de bactérias psicotróficas em alimentos, elas produzem crescimento visível a 7±1°C no prazo de 7 a 10 dias, independente de sua temperatura ótima. As principais bactérias psicotróficas incluem desde cocos e batonetes, esporogênicos ou não, aeróbios e anaeróbios (SILVA et al., 2007). Os psicotróficos mais comumente encontrados em carnes são *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Carnobacterium*, *Brochothrix*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria* e *Pseudomonas*, sendo esta última mais recorrente nestes produtos (COATES et al., 1995; SILVA et al., 2007). A deterioração de carnes refrigeradas é causada, em parte, por espécies de *Pseudomonas*, que são responsáveis por “*off-flavors*”, descoloração, produção de gás e limo (OUSSALAH et al., 2006).

Entre as doenças transmitidas pela carne e outros produtos de origem animal, destacam-se as zoonoses (doenças ou infecções naturalmente transmissíveis entre os animais vertebrados e o homem) especialmente a tuberculose, a brucelose e a cisticercose; as toxinfecções alimentares, que são provocadas por bactérias (*Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*), ou suas toxinas (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*) (MONTEIRO et al., 2004).

Recentes estudos têm demonstrado que a prevalência de *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* spp. na pele bovina pode ser alta, e a mesma atua como fonte potencial de contaminação das carcaças durante a esfolagem (AVERY et al., 2002).

2.4 *Salmonella* spp.

Salmonella é o principal agente de doenças de origem alimentar em várias partes do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2005) e também no Brasil. A Resolução RDC nº 12, que estipula os padrões microbiológicos para alimentos, estabelece ausência de *Salmonella* sp. em carnes resfriadas, ou congeladas, *in natura*, de bovinos, suínos e outros mamíferos (BRASIL, 2001).

2.4.1 Taxonomia e características do micro-organismo

A *Salmonella* é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, anaeróbia facultativa, Gram negativa, não produtora de esporos e tem a forma de bastonete curto. A maioria é móvel, com flagelos peritríquos, à exceção da *S. gallinarum* e *S. pullorum*. Esse gênero fermenta a glicose, produzindo ácido e gás, porém incapaz de fermentar a lactose e a sacarose (FORSYTHE, 2002), além de ser

capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono (FRANCO; LANDGRAF, 1996). A temperatura ótima de crescimento é de aproximadamente 38°C e a mínima de 5°C. Como não formam esporos, são relativamente termossensíveis, podendo ser destruídas a 60°C, por 15 a 20 minutos (FORSYTHE, 2002).

Este gênero ainda apresenta oxidase negativa, catalase positiva, indol negativo, Voges-Proskauer (VP) negativa, Vermelho de Metila (VM) negativo, Citrato de Simmons positivo, produção de H₂S, não hidrolisa uréia, reduz nitrato, crescimento em KCN, e a utilização de malonato é inconstante. Os carboidratos geralmente fermentados são glicose, arabinose, maltose, manitol, manose, sorbitol e xilose (LÁZARO et al., 2008). O pH ótimo para multiplicação das salmonelas fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores à 4,0 são bactericidas. Dependendo da natureza do ácido utilizado para acidificação, o pH mínimo pode subir para 5,5, e concentrações de sal superiores a 9% não são toleradas por essa bactéria (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A designação do gênero *Salmonella* foi adotada em 1900 por Lignières em homenagem a Daniel Salmon, o qual isolou o micro-organismo conhecido como *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis de suínos. Sua nomenclatura teve como orientação inicial informações relacionadas às condições clínicas ou ao hospedeiro do qual o micro-organismo era isolado. Entretanto, a diversidade inicial de sorovares que apresentavam etiologia não específica de um determinado hospedeiro, levou inicialmente a designação do mesmo sorovar em hospedeiros distintos, em locais diferentes. A partir do ano de 1920, um grupo de microbiologistas, liderados por Fritz Kauffmann em Copenhague e por Philip Bruce White em Londres unificaram a taxonomia, tendo seu trabalho reconhecido pelo subcomitê de *Salmonella* da Sociedade Internacional de Microbiologia em 1933, como esquema de Kauffmann-White. A partir de então

sua nomenclatura sofreu algumas modificações tendo por base a utilização de métodos clássicos e métodos moleculares (LÁZARO et al., 2008, p. 2).

Existem várias formas de classificação de *Salmonella*, o que torna bastante confusa a sua compreensão. O esquema de classificação proposto por Kauffman divide o gênero em tipos sorológicos em função dos antígenos somáticos (O), os flagelares (H) e os capsulares (Vi) que apresentam. Já o esquema proposto por Edwards e Ewing reconhece apenas três espécies: *S. Typhi*, *S. Cholerasuis* e *S. Enteritidis*. Esta última abriga todas as demais salmonelas, que são consideradas sorotipos de uma mesma espécie. O esquema de Le Minor considera que o gênero *Salmonella* é formado por apenas uma subespécie (*S. enterica*), com sete subespécies (*cholerasuis*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *bongori* e *indica*) (TRABULSI, 1991). Atualmente são reconhecidos cerca de 2510 sorovares incluídos em duas espécies, a *S. enterica*, que está dividido em seis subespécies: *S. enterica subsp. enterica*, *S. enterica subsp. salamae*, *S. enterica subsp. arizonae*, *S. enterica subsp. diarizonae*, *S. enterica subsp. Houtenae* e *S. enterica subsp. indica*; e a espécie *S. bongori* (FORSYTHE, 2002; LÁZARO et al., 2008).

Em 2004 uma nova espécie foi proposta, tendo sido designada *Salmonella subterranea*. Seu isolamento foi efetuado em sedimento subterrâneo, de solo com baixo pH na Oak Ridge, Tennessee (LÁZARO et al., 2008).

As cepas mais frequentemente envolvidas nas doenças humanas são as de *S. enterica subsp. enterica*, que tem por habitat os animais de sangue quente e respondem por 99% das salmoneloses humanas (SILVA et al., 2007).

2.4.2 Epidemiologia

O principal habitat das salmonelas é o trato gastrintestinal de humanos e animais. Alguns poucos sorotipos são restritos a um hospedeiro, como

Salmonella Typhi, *S. Paratyphi* A e C, e *Salmonella* Sendai em humanos; *S. Abortusovis* em ovinos; *S. Choleraesuis* em suínos e *S. Dublin* em bovinos *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* em aves (LÁZARO et al., 2008). Quando esses sorotipos provocam doenças em humanos, o processo geralmente é invasivo e apresenta risco de vida. A maioria dos sorotipos, entretanto, tem um espectro de hospedeiros amplos e, tipicamente, provocam gastroenterites sem complicações e sem necessidade de tratamento. Porém, essas infecções podem se tornar severas em crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico debilitado ou comprometido. Os sorotipos mais importantes na transmissão dessas salmoneloses de animais para humanos são *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (SILVA et al., 2007).

De acordo com Franco e Landgraf (1996), as doenças causadas por *Salmonella* podem ser subdivididas em três grupos: (1) Febre Tifóide, causada por *S. Typhi*; (2) Febres Entéricas, causadas por *S. Paratyphi* (A, B, C); (3) Enterocolites (ou salmoneloses), causadas pelas demais salmonelas. *Salmonella* Typhi e *Paratyphi* provocam septicemia, que tem sido associada com infecções subsequentes em praticamente todos os órgãos humanos. A taxa de mortalidade da febre tifóide é de 10% e a da maioria das salmoneloses é menor que 1%. O sorotipo Enteritidis tem apresentado taxa de mortalidade de 3,6%, atingindo principalmente idosos (SILVA et al., 2007). Ainda segundo esses mesmos autores, nas gastroenterites provocadas por outras salmonelas, os sintomas ocorrem entre 6 e 48 horas, incluindo febre, dor de cabeça, cólicas abdominais, diarreia, náuseas e as vezes vômito. A duração é de um ou dois dias, podendo prolongar-se dependendo do hospedeiro, da dose ingerida e da cepa de *Salmonella* envolvida. Há divergências na literatura quanto à dose infectiva. Segundo Silva et al. (2007), esta dose estaria entre 15 e 20 células, mas de acordo com Lázaro et al. (2008), ela varia de 10^5 a 10^8 células, porém em pacientes imunocomprometidos doses menores que 10^3 para alguns sorovares

seria suficiente para causar a doença. Idosos e crianças podem sofrer desidratação severa. E pacientes com AIDS são atingidos por salmoneloses com uma frequência 20 vezes maior do que a população geral, sofrendo episódios recorrentes. Em 80% dos casos, as salmoneloses ocorrem individualmente e não em surtos explosivos (SILVA et al., 2007).

Franco e Landgraf (1996), ao se referirem ao mecanismo de patogenicidade, comentam que as infecções começam na mucosa do intestino delgado e do cólon. As salmonelas atravessam a camada epitelial intestinal, alcançam a lâmina própria, onde proliferam. As salmonelas são fagocitadas pelos monócitos e macrófagos, resultando em resposta inflamatória. Ao contrário do que ocorre na febre tifóide e nas entéricas, nas enterocolites a penetração de *Salmonella* fica limitada à lâmina própria. Nestes casos, raramente se observa septicemia ou infecção sistêmica, ficando a infecção restrita à mucosa intestinal. A resposta inflamatória está relacionada também à liberação de prostaglandinas, que são estimuladoras de adenilciclase, resultando em um aumento de secreção de água e eletrólitos, provocando diarreia aquosa. As endotoxinas correspondem à fração lipídica do lipopolissacarídeo que compõe a membrana celular da *Salmonella*, sendo responsáveis pelo efeito tóxico quando sofre lise celular.

De acordo com Eduardo et al. (2003), entre 1999 e 2003 foram notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica do estado de São Paulo (CVE) 1024 surtos de diarreia, envolvendo 27.499 casos. Dos 459 surtos com etiologia identificada, 325 (70,8%) foram causadas por bactérias e, dentre esses, 140 (43,1%) foram devido à *Salmonella*, envolvendo 3.001 pacientes. Nos Estados Unidos, a cada ano são reportados aproximadamente 40.000 casos de salmonelose e, considerando que os menos agudos não são diagnosticados, esse número deve ser 30 ou mais vezes maior (CENTER FOR DISEASE CONTROL - CDC, 2005).

2.4.3 Ocorrência de *Salmonella* spp. em carne moída

Salmonella é uma bactéria de ampla ocorrência em animais e no ambiente, as principais fontes são a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e as superfícies de equipamentos e utensílios de fábricas e cozinhas. A doença geralmente é contraída através do consumo de alimentos contaminados de origem animal, principalmente de carne bovina, a carne de aves, os ovos e o leite. Os vegetais contaminados com esterco também têm sido implicados na transmissão. A bactéria atinge toda a cadeia de produção de alimentos, a partir de produtos primários, já tendo sido implicados em salmoneloses os pescados, os produtos de confeitaria recheados com cremes, a gelatina desidratada, o cacau e o chocolate, o coco e os molhos e coberturas para saladas não industrializados e preparados com ovos crus (SILVA et al., 2007).

El-Leithy e Rashad (1989) avaliando a qualidade de produtos oriundos da carne moída comercializada nos mercados do Egito verificaram *Salmonella*, estavam presentes em 11% das amostras. Heredia et al. (2001), ao analisarem amostras de carne moída oriundas de supermercados do México, verificaram a presença de *Salmonella* spp. em 11,4% das amostras.

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) reportaram diversos casos de salmonelose implicados ao consumo de carne moída. De janeiro a abril de 2002, foram 47 casos de *Salmonella* Newport em cinco estados dos EUA (CDC, 2002). Em Wisconsin foi relatado um surto ocasionado por *Salmonella* Typhimurium, com 107 casos confirmados, 17 hospitalizações, e os sintomas mais comuns foram diarreia, dores abdominais, febre e náuseas (CDC, 1995).

Na América Latina, entre 1995 e 2001, foram relatados 5.300 surtos DTA, 175 mil casos e 274 mortes. Na América do Sul, 38,1% dos surtos ocorreram no Brasil, 24,8% no Chile, 11,1% na Argentina, 8,3% no Peru, 8,2%

no Uruguai, 6,3% no Paraguai e 3,2% no Equador. A avaliação destes dados deve ser criteriosa, pois os levantamentos epidemiológicos podem ser precários em alguns países, não refletindo a realidade (FRANCO, B. D. G, 2003). No Brasil, não se sabe ao certo o número de casos e surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, como salmonelose, em virtude da quase total falta de notificação de ocorrências deste tipo de doença.

Florentino et al. (1997) verificaram a presença de *Salmonella* em 100% das amostras analisadas de carne moída na cidade de Campina Grande-PB, tanto das amostras oriundas de feiras quanto as de supermercados, atribuindo esses elevados números às inadequadas condições higiênico-sanitárias do local de abate e também ao processo de moagem, cuja contaminação superficial é introduzida e distribuída na carne. Resultado semelhante foi observado por Souza et al. (2000) em 30 amostras de carne moída comercializadas no município de Macapá-AP.

No período de janeiro de 1990 a dezembro de 1999, no Instituto Adolfo Lutz, foram isoladas 324 cepas de *Salmonella*, sendo 155 de infecções humanas e 169 de alimentos destinados ao consumo humano. Dos 17 diferentes sorotipos identificados a partir de infecções humanas, *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis (*S. Enteritidis*) foi o predominante (75,0%). O material fecal representou a principal fonte de isolamento das cepas, principalmente pela ocorrência dos vários surtos de DTA. A partir dos alimentos, 26,6% deles envolvidos em surtos de DTA, foram identificados 30 diferentes sorotipos, também com a predominância de *S. Enteritidis* (56,2%). Os alimentos apresentando maior número de isolamentos de cepas de *Salmonella* foram a carne e seus derivados (59,7%), seguidos por ovos e seus derivados (16,0%), nos quais, *S. Enteritidis* foi o sorotipo mais prevalente (57,4% e 81,5%, respectivamente). Estes resultados demonstram que *S. Enteritidis* permanece o

sorotipo mais frequentemente isolado, tanto em infecções humanas quanto em alimentos (ALMEIDA et al., 2000).

Motta, Belmonte e Panetta (2000) analisando 15 amostras de carne bovina moída *in natura* comercializada em supermercados de São Paulo-SP, quanto à presença de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, coliformes totais, coliformes termotolerantes e bactérias mesófilas, verificaram que apenas quatro amostras apresentavam-se adequadas para o consumo. Almeida, Gonçalves e Franco (2002) verificaram a maior frequência de *Salmonella* em cortes de acém bovino moídos do que em cortes inteiros. Hoffmann, Cruz e Venturim (1998), ao analisarem amostras de carnes e de presunto obtidas no comércio varejista da região de São José do Preto-SP, verificaram que 80% das amostras de carne não atenderam ao padrão para *Salmonella* sp. estabelecido pela legislação federal (BRASIL, 2001).

Ferreira e Carvalho Sobrinho (2003), estudando a qualidade bacteriológica das carnes bovina moída e suína (pernil) refrigeradas, em supermercados, frigoríficos e feiras livres do município de São Luís-MA, verificaram a presença de *Salmonella* Typhi e de outros patógenos nas amostras recolhidas para análise.

Embora a Instrução Normativa nº 83 (BRASIL, 2003) estabeleça que a carne moída deva ser embalada imediatamente após a moagem, e que cada pacote tenha o peso máximo de um quilograma, permitindo, entretanto que, em função do destino do produto (uso hospitalar, escolas, cozinhas industriais, instituições, etc.), possa haver embalagens com peso superior, é muito comum a exposição e comercialização de carne previamente moída, mantida em balcões refrigerados, medida essa que feri a legislação e coloca em risco a saúde do consumidor.

2.5 Plantas aromáticas, condimentares e medicinais

Plantas aromáticas são aquelas que podem gerar, por algum processo físico-químico, um produto aromático. Entenda-se por produtos aromáticos os que têm um odor ou um sabor determinado, sem avaliar sua qualidade comercial ou estética (BALDONI; CZEPAK, 2008). Plantas condimentares são usadas como tempero, para realçar o sabor e o aspecto dos alimentos, podendo apresentar propriedade de conservação, enquanto as medicinais possuem princípio ativo que, dependendo da concentração, podem possuir propriedades tóxicas ou curativas (UPNMOOR, 2003). A utilização de produtos naturais extraídos de plantas é tão remota quanto a civilização na Terra; uma gravação egípcia estimada do ano 2300 a.C mostra o emprego de tomilho na elaboração de cerveja. Restos pré-históricos de vasilhames contendo resinas e bálsamos vegetais indicam uma possível utilização medicinal ou cosmética destes produtos. A Bíblia e os presentes dos Reis Magos ao recém-nascido Jesus mostram o valor do incenso e da mirra (BALDONI; CZEPAK, 2008).

A utilização de plantas aromáticas no Brasil remonta desde antes da colonização pelos portugueses; índios já utilizavam ervas, na forma de chás, para cura de alguns males. Com o desenvolvimento de novas técnicas de produção desses compostos e o desenvolvimento da química, ocorreu uma melhoria na obtenção de óleos essenciais e de extrato de plantas (RATES, 2001). As indústrias que mais utilizam plantas aromáticas e suas essências são a cosmética, a farmacêutica, a de química fina e a alimentícia. No caso específico do uso de óleos essenciais na indústria de alimentos, as normas a serem seguidas são os Códigos Alimentares, sendo universalmente empregado o *Food Chemical Codex* dos EUA (BALDONI; CZEPAK, 2008).

Recentemente, as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de condimentos têm despertado interesse pela possibilidade de constituírem uma

alternativa para as exigências dos consumidores quanto à utilização de aditivos naturais em alimentos (KOTZEKIDOU; GIANNAKIDIS; BOULAMATSIS, 2008). Entretanto, o uso para tal finalidade implica em concentrações maiores do que aquelas usadas para o realce de aroma e sabor dos alimentos. Assim, um equilíbrio entre as concentrações para que o óleo exerça, ao mesmo tempo, ação antimicrobiana e aromática é de fundamental importância para seu uso em alimentos em substituição aos aditivos sintéticos.

2.6 Metabólitos secundários

O metabolismo dos seres vivos origina metabólitos primários e secundários. Enquanto os primários são secretados e essenciais a todos os organismos, os secundários são produzidos apenas por alguns, em sua maioria, vegetais. E garantem a esses, funções biológicas de perpetuação e defesa (SANTOS, 2007). Os vegetais, em relação ao metabolismo secundário, possuem elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade em uma mesma espécie (POSER; MENTZ, 2004).

Os processos metabólicos relacionados às macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) apresentam um elevado grau de similaridade entre os organismos e são denominados metabólitos primários. Vegetais, micro-organismos e em menor escala, animais, entretanto, apresentam todo um arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo, encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, com bioquímica e metabolismo específicos e únicos, caracterizando-se como

elementos de diferenciação e especialização (SANTOS, 2007). Todo esse conjunto metabólico é definido como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie em seu ecossistema como, por exemplo, a defesa contra herbívoros e micro-organismos, proteção contra raios ultra-violetas (UV), atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, bem como sua participação em alelopatias (CASTRO et al., 2006; SANTOS, 2007).

Os metabólitos secundários apresentam várias atividades biológicas. Muitos são de importância comercial, tanto na área farmacêutica quanto na área alimentar, agrônômica e de perfumaria, entre outras. Entre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com atividade biológica são alcalóides, flavonóides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (PEREIRA et al., 2008; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Variações temporais e ambientais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas, ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (CARDOSO et al., 2001; KUTCHAN, 2001; LINDROTH; HSIA; SCRIBER, 1987).

A origem de todos esses metabólitos pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (Figura 1). O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, fosfoenolpiruvato e eritrose -4- fosfato, e origina os aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos, considerados responsáveis pelo desenvolvimento do sabor. Os fenilpropanóides são exemplos de compostos

aromáticos, formados a partir da ação da enzima fenilalanina amonialise (PAL) sobre a fenilalanina (FRANCO, M. R. B., 2003; SANTOS, 2007).

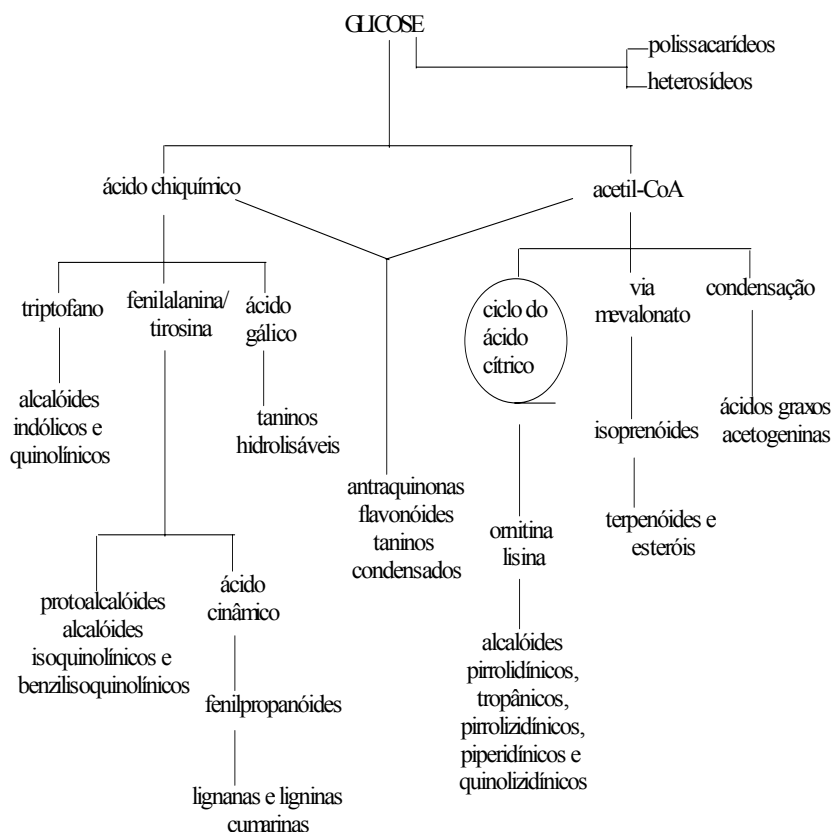


Figura 1 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários

Fonte: Adaptado de Simões et al. (2007)

Já o acetato, fornece as unidades acetila que compõe o intermediário reativo, acetil-CoA, precursor de vários compostos como os terpenos. Na biossíntese de terpenos, forma-se inicialmente, o mevalonato, a partir da condensação de uma unidade de acetoacetil-CoA com uma molécula de acetil-

CoA. Este é convertido à isopentenil-pirofosfato (IPP), ou isopreno reativo. A polimerização do mevalonato vai originar moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco unidades de carbono. A molécula de IPP e seu isômero dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) formam *trans*-geranyl-pirofosfato (GPP), a partir do qual se formam os terpenos (Figura 2). Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (C10) e os sesquiterpenos (C15) (SANTOS, 2007).

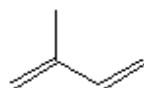


Figura 2 Estrutura química do isopreno

Há ainda uma rota pouco conhecida para a biossíntese de terpenos, a via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS). De acordo com Wanke, Skorupupinska-Tudek e Swiezewska (2001), nesta rota o piruvato e o D-gliceraldeído-3-fosfato, produzidos pelo metabolismo primário, formam o 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato que, após sucessivas reações, origina tanto IPP como DMAPP. Esta via ocorre em nível de cloroplastos, diferentemente da via do mevalonato, que ocorre no citoplasma celular. (Figura 3).

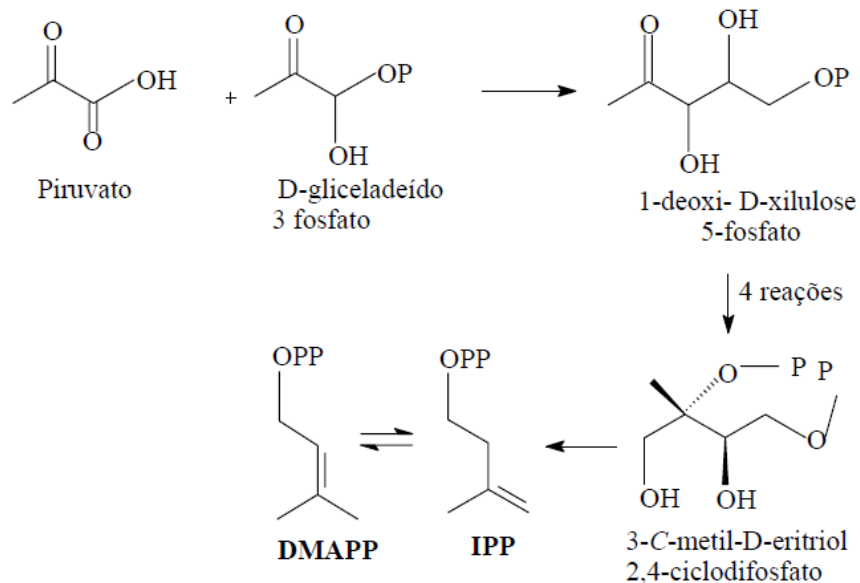


Figura 3 Biossíntese de terpenos via DXPS
 Fonte: Dewick, 2002

2.7 Óleos essenciais

Há dificuldade para encontrar uma definição precisa sobre o que são óleos essenciais. Baldoni e Czepak (2008) os definem como sendo uma parte do metabolismo vegetal composto geralmente por terpenos, que estão associados ou não a outros componentes, a maioria destes voláteis e geram em conjunto o odor do dito vegetal. Já a *International Standard Organization* (ISO) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas mediante destilação por arraste com vapor de água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SANTOS, 2007). Podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, por serem de aparência oleosa à temperatura ambiente. Entretanto, sua principal

característica é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos essenciais, os quais são solúveis em solventes orgânicos apolares, apresentam solubilidade limitada em água, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, denominadas hidrolatos (SIMÕES et al., 2007).

São geralmente incolores ou ligeiramente amarelados; poucos são os óleos que apresentam cor, como o óleo volátil de camomila, de coloração azulada, pelo seu alto teor em azulenos; em geral, são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais. A maioria dos óleos voláteis possui índice de refração e são opticamente ativos, propriedades essas usadas na sua identificação e controle da qualidade (OUSSALAH et al., 2006; SIMÕES et al., 2007). Nos dias atuais, cerca de 3000 óleos essenciais são conhecidos, 300 dos quais são comercialmente importantes, em especial nas indústrias farmacêuticas, agrônômica, de alimentos, sanitária, de cosméticos e de perfumaria (BAKKALI; AVERBECK; IDAOMAR, 2008).

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços) (SIMÕES et al., 2007). Quimicamente, a maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, preponderando esses últimos (CARDOSO et al., 2001; SIMÕES et al., 2007).

Dependendo da família, os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares (*Lamiaceae*), células parenquimáticas diferenciadas (*Lauraceae*, *Piperaceae*, *Poaceae*), canais

oleíferos (*Apiaceae*) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (*Pinaceae*, *Rutaceae*). Os óleos essenciais podem estar estocados em certos órgãos, tais como flores (laranjeira, bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou ainda nas cascas dos caules (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa), raízes, rizomas (cúrcuma, gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva-doce) ou sementes (noz-moscada). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo a localização (OUSSALAH et al., 2006; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; SIMÕES et al., 2007).

Estudos mostram que determinadas plantas podem variar a concentração de óleo dentro de uma mesma espécie, influenciadas por fatores hereditários, que dizem respeito às interferências quantitativas e qualitativas, e por fatores ontogênicos, como solo, clima e micro-organismos, entre outros (CARDOSO; SHAN; SOUZA et al., 2001). A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleo essencial na superfície (SALGADO, 2005). As plantas ricas em óleos essenciais devem ser coletadas pela manhã ou à noite, pois o período de exposição ao sol pode provocar uma perda quantitativa importante do óleo existente no vegetal. O grau de hidratação do terreno e os teores de macronutrientes (N, P, K) também podem influenciar a composição dos óleos voláteis. Entretanto, não se pode estabelecer um único padrão, pois cada espécie reage de forma diferenciada (CASTRO et al., 2006).

2.8 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais *in vitro* e em alimentos

Os óleos essenciais de plantas são geralmente misturas de diversos componentes, e alguns destes podem exercer efeito antimicrobiano. As plantas

que se têm mais relatos sobre a atividade antimicrobiana são o orégano, canela, cravo, alho, coentro, alecrim, sálvia, salsa e capim-limão (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010), e diversos estudos têm avaliado essa ação *in vitro* frente à micro-organismos deterioradores e patogênicos, sendo alguns trabalhos descritos a seguir.

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

A grande maioria dos trabalhos com capim-limão (*Cymbopogon citratus*) foi feita objetivando avaliar seu efeito sobre fungos e leveduras. Tzortzakis e Economakis (2007), estudando a atividade antimicrobiana do óleo essencial de capim-limão pelo método de diluição em ágar frente a cinco espécies de fungos verificaram que a concentração de 25 ppm do óleo foi suficiente para inibir até 70% da produção de esporos fúngicos, e que a esporulação era completamente retardada à concentração de 500 ppm. Os

autores Dutta et al. (2007) também confirmaram a potencialidade antifúngica deste óleo sobre *Candida albicans*. Diversos autores atribuem ao geraniol e citral a eficácia do óleo essencial de capim-limão frente a leveduras e fungos (ABE et al., 2003; SACCHETTI et al., 2005; TAWIL; YOUSEF, 1988). Hammer, Carson e Riley (1999), também utilizando o método de diluição em ágar, estudaram a ação de 52 óleos e extratos vegetais frente a nove diferentes bactérias, entre elas uma *S. Typhimurium*, e um fungo. Estes autores observaram que os óleos essenciais de capim-limão, orégano e louro foram os mais efetivos contra todos os micro-organismos testados, a uma concentração menor que 2% (v/v).

Estudos de óleos em matrizes alimentares são relativamente recentes. Singh et al. (2003) verificaram a atividade antimicrobiana dos óleos de tomilho (*Thymus vulgaris*), cravo (*Eugenia caryophyllata*) e pimenta (*Pimenta dioica*) em carnes de “hotdogs” com diferentes níveis de gordura frente à *Listeria monocytogenes*, com destacada eficiência para o óleo de cravo. Skandamis e Nychas (2001) observaram que a adição de óleo essencial de orégano em carne picada e estocada sob atmosfera modificada retardou o crescimento microbiano. Emiroğlu et al. (2010), estudando a atividade antimicrobiana de filmes comestíveis contendo 5% (v/v) de óleo essencial de orégano (*Origanum heracleoticum* L.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e a associação destes, aplicados em carne moída fresca sob refrigeração, verificaram redução da população de *Pseudomonas* spp. e coliformes. Salomakos et al. (2008), aplicando 0,6% de óleo essencial de tomilho em carne bovina picada constataram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* O157:H7 durante estocagem à 10°C.

Há também trabalhos com outros alimentos. Mendonça (2004), aplicando 3 diferentes óleos essenciais em ricota, verificou que o cravo apresentou a maior inibição frente à bactéria *Staphylococcus aureus* (4,27 ciclos logaritmos), seguido do manjeriço (4,05 ciclos logaritmos) e do orégano (3,08

ciclos logarítmicos). Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar, Martín-Belloso (2008), trabalhando com filmes comestíveis contendo capim-limão (*Cymbopogon citratus*), palmarosa (*Cymbopogon martini*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) observaram efetividade destes contra *Salmonella* Enteritidis inoculadas em melões. Pode-se citar ainda estudos com peixes (MAHMOUD et al., 2006), queijos (MENON; GARG, 2001; SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 2001), iogurte (PENNEY et al., 2004), banana (RANASINGHE; JAYAWARDENA; ABEYWICKRAMA, 2005), verduras (SINGH et al., 2002) e chocolate (KOTZEKIDOU; GIANNAKIDIS; BOULAMATIS, 2008), dentre outros.

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

Burt (2004), em seu trabalho de revisão, sugere que o mecanismo de ação dos óleos essenciais sobre as bactérias está relacionado com a modificação da membrana citoplasmática, danos a vários sistemas enzimáticos, interrupção da força próton motriz, do fluxo de elétrons, do transporte ativo e da coagulação dos conteúdos celulares (Figura 4).

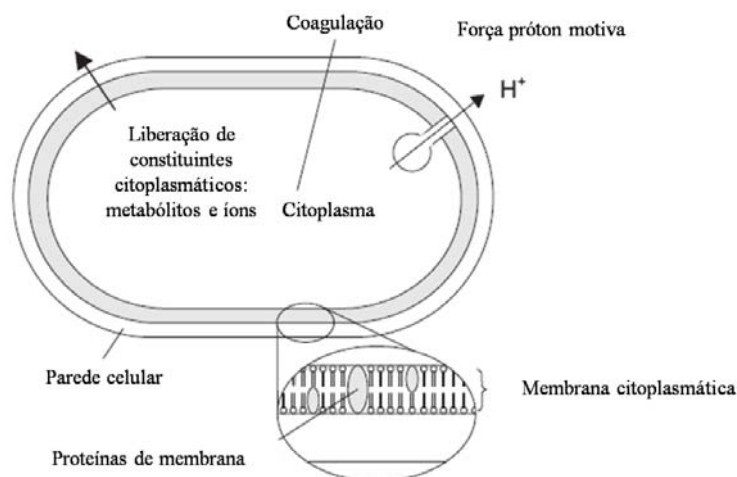


Figura 4 Ação dos óleos essenciais na célula bacteriana
 Fonte: Adaptado de Burt (2004)

Os pesquisadores Bakkali, Averbek e Idaomar (2008), Gill e Holley (2006) e Lambert et al.(2001), corroboram com Burt ao afirmarem que a permeabilização da membrana citoplasmática está associada à dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do *pool* de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e à perda de metabólitos e íons, como íons potássio e fosfato, levando assim a danos estruturais à membrana citoplasmática, comprometendo suas funções como barreira seletiva, local de ação enzimática e geração de energia.

2.9 *Origanum vulgare* L. (orégano)

A espécie *Origanum vulgare* é uma planta perene, aromática e condimentar pertencente à família *Lamiaceae* e conhecida como orégão, manjerona-silvestre ou manjerona-rasteira. É uma planta herbácea, rasteira ou decumbente (SILVA JÚNIOR; VERONA, 1997). Sua altura pode oscilar entre

25 e 80 cm; o caule é ereto, às vezes com uma coloração pardo-avermelhada; forma touceiras. Possui rizoma rasteiro, escuro e dele partem raízes fibrosas. As folhas são pecioladas, inteiras, opostas em ângulo reto, ovais e pontiagudas (Figura 5) (TESKE; TRENTINI, 1997). É nativa das regiões Euro-Siberiana e Irano-Siberiana, vegeta espontaneamente em solos pedregosos e prados da Europa e do sul da Rússia. Preferem regiões de clima temperado e solos bem férteis de natureza calcária, permeáveis, secos, que recebam bastante luz solar (ALIGIANS et al., 2001; CASTRO; CHEMALE, 1995; VON HERTWING, 1991).



Figura 5 Aspecto geral da espécie *Origanum vulgare* fresco (A) e seco (B)

Devido a sua ampla variedade de características químicas e de aroma, *O. vulgare* tem sido amplamente utilizado como insumo na indústria farmacêutica e cosmética, como erva culinária, flavorizante de alimentos, em bebidas alcoólicas e perfumaria na obtenção de fragrâncias picantes (NOVAK et al., 2003; SIVROPOULOU et al., 1996). Além disso, seu óleo essencial, rico em carvacrol e timol é considerado como potente bactericida e fungicida reconhecido cientificamente (Figura 6) (CASTRO et al., 2006; CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

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

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

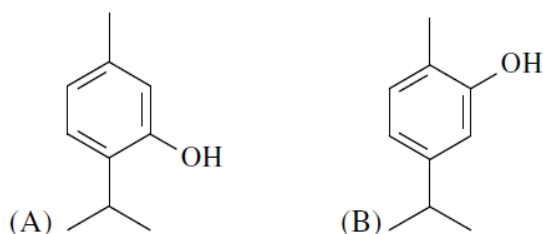


Figura 6 Estruturas químicas do timol (A) e carvacrol (B)

2.10 *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (capim-limão)

É uma planta herbácea, cespitosa, estolonífera, perene, que cresce cerca de 1,0 m em altura, forma touceiras de perfilhos ao nível do solo e apresenta rizomas semissubterrâneos. As folhas são amplexicaule, linear-lanceoladas, ásperas nas duas faces, paralelinérveas, bordo liso, cortante, nervura central grossa e caniculada, são recobertas por uma fina camada de cera e apresenta textura áspera, o florescimento é raro e as flores são estéreis (Figura 7) (SILVA JÚNIOR; VERONA, 1997).



Figura 7 Aspecto geral da espécie *Cymbopogon citratus*

A espécie *Cymbopogon citratus* é uma planta aromática e medicinal pertencente à família *Poaceae*, originária do sudoeste asiático e distribuída atualmente nas regiões tropicais e subtropicais (GOMES; NEGRELLE, 2003). No Brasil é conhecida como capim-limão, capim-cidró, capim santo, capim-cheiroso, capim-catinga, capim-cidrão, capim cidrilho, capim-ciri e erva-cidreira (BRAGA, 1976; COSTA et al., 2005), e a sua produção no país ocorre destacadamente nas regiões sul e sudeste (GOMES; NEGRELLE; DIMAS FILHO, 2007). Sua maior importância econômica consiste na produção de seu óleo essencial, conhecido internacionalmente como óleo essencial de *lemongrass* (COSTA et al., 2005), rico em citral, uma mistura isomérica de geranial e neral, aldeídos monoterpênicos acíclicos (OLIVEIRA et al., 2010; SADDIQ; KHAYYAT, 2010) (Figura 8). O citral tem efeito antiespasmódico, tanto no tecido uterino como no intestinal, atividade antibacteriana e analgésica, combate o histerismo e outras afecções nervosas (SILVA JÚNIOR; VERONA, 1997; TESKE; TRENTINI, 1997;).

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

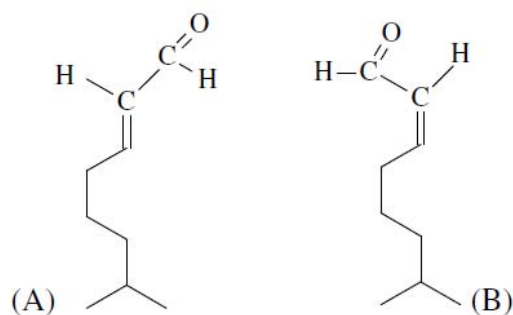


Figura 8 Estruturas químicas do neral (A) e do geranial (B)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e condução do experimento

A extração dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (DQI/UFLA), enquanto a moagem das peças de carne bovina foi executada no Laboratório de Tecnologia de Carnes e Produtos Cárneos, e as análises centesimais no Laboratório de Produtos Vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da mesma universidade.

A obtenção da curva de crescimento do microrganismo testado, bem como a determinação da atividade antimicrobiana, por meio das concentrações mínimas inibitórias (CMI), e a contagem de microrganismos viáveis inoculada na carne bovina moída foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras.

3.2 Obtenção dos óleos essenciais

O material vegetal fresco de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) foi coletado no Horto de Plantas Medicinais da UFLA, localizado no município de Lavras – MG (21°14'43''S; 44°59'59''W; altitude 919m). A coleta foi realizada no mês de novembro de 2009, no período da manhã, por volta de 8h com temperatura amena e ausência de chuvas. As folhas de *C. citratus* foram fragmentadas e parcialmente secas em estufa a 28°C por 12 horas, a fim de se aumentar o rendimento de extração. As folhas secas de orégano (*Origanum vulgare*) foram adquiridas na mesma época no Mercado Central de Belo Horizonte – MG.

O processo de extração dos óleos essenciais foi realizado empregando-se o método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado (Figura 9) adaptado a um balão de fundo redondo e boca esmerilada. Os espécimes vegetais, imersos em água, foram submetidos a aquecimento, mantidos sob ebulição pelo período de 2 horas. Posteriormente, coletou-se o hidrolato (água + óleo), que foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36xG por 5 minutos, visando à separação da fase orgânica da fase aquosa. Os óleos essenciais foram armazenados em frascos de vidro estéril e submetidos à remoção de possíveis resíduos de água através do equipamento denominado Pistola de Secagem. Os frascos contendo o óleo foram acondicionados sob temperatura de refrigeração 7°C e ao abrigo da luz durante toda execução do experimento.



Figura 9 Aparelho de Clevenger modificado, utilizado na extração dos óleos essenciais

3.3 Microrganismo e preparação do inóculo

3.3.1 Microrganismo utilizado

O microrganismo utilizado foi a *Salmonella enterica* Enteritidis S64, gentilmente cedida ao Laboratório de Microbiologia do DCA/UFLA pela pesquisadora Dália dos Prazeres Rodrigues – Laboratório de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções /Depto de Bacteriologia /IOC/ Fiocruz, como culturas reveladoras na determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos óleos testados e como inóculo na determinação de células viáveis na carne bovina moída.

3.3.2 Manutenção e padronização da cultura

O microrganismo utilizado no estudo foi estocado a -18°C , em microtubos contendo meio de congelamento [glicerol (150 mL), peptona (5 g), extrato de levedura (3 g), NaCl (5g), H_2O (1.000 mL) pH $7,2\pm 7,4$]. Durante o experimento, foram realizadas repicagens para a manutenção das culturas viáveis. Aliquotas foram transferidas dos microtubos para tubos, contendo caldo TSB (Tryptic Soy Broth) e incubadas, por 24 horas, a 37°C . Após o cultivo, 1 mL da cultura foi novamente acondicionada em microtubos estéreis e centrifugada, a $6.000 \times g$, durante 8 minutos, em microcentrífuga (Eppendorf). Retirado o sobrenadante, o conteúdo foi novamente recoberto com meio de congelamento e acondicionado a -18°C .

Para a padronização das contagens do número de unidades formadoras de colônias (UFC), foi elaborada a curva de crescimento para a cultura bacteriana utilizada. Aliquotas da cultura de *Salmonella enterica* Enteritidis S64 foram transferidas para Erlenmeyers contendo caldo TSB e incubadas a 37°C ,

com a monitoração do crescimento a cada hora, por meio de espectrofotometria (600 nm) e plaqueamento em meio TSA (Tryptic Soy Agar). O procedimento foi repetido até que se chegasse a leituras com valores constantes, garantindo, assim, a fase estacionária. Este procedimento garantiu o controle do número de UFC no inóculo da cultura reveladora.

3.3.3 Atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais

Para a realização da atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais foi empregada a metodologia de Difusão Cavidade em Ágar, proposta por Deans e Ritchie (1987), modificada por Mendonça (2004). Inicialmente, uma fina camada de TSA foi adicionada em placas de Petri (150 mm de diâmetro). Após a solidificação, esferas de vidro estéreis (\varnothing 3 mm de diâmetro e 7mm³ de volume) foram posicionadas sobre o meio sólido. Aliquota padronizada de 11,7 mL de cultura de *S. Enteritidis* foi transferida para erlemeyer contendo 150 mL de TSA (45°C), obtendo-se concentração de 10⁷ UFC/mL na cultura reveladora. O meio ainda líquido foi então cuidadosamente vertido sobre a camada anterior. Após solidificação, as pérolas de vidro foram removidas com auxílio de pinça estéril para formação dos micropoços onde foram dispensados 10 μ L dos óleos essenciais diluídos em DMSO (dimetil sulfóxido) nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39% e 0% v/v, sendo esta última denominada de controle. As placas foram incubadas 37°C/24 horas, sendo os halos inibitórios mensurados posteriormente, com o uso de paquímetro. Um controle positivo também foi feito utilizando o antibiótico Clorafenicol (1000 ppm). As análises foram realizadas em triplicata e CMI determinada.

3.4 Análises físico-químicas da carne

3.4.1 pH

As leituras de pH foram realizadas no músculo patinho (*Quadriceps femoris*), antes de ser moída, com o auxílio de um potenciômetro portátil (Digimed[®], modelo DM 20) com eletrodo penetração com resolução de 0,01 unidades de pH. O aparelho foi calibrado com solução tampão de pH 4,00 e 7,00. Para a realização das leituras, o músculo descongelado, mas mantido refrigerado (5,6°C), foi perfurado com a ponta de uma faca. Em cada peça foram realizadas três leituras, sendo a média utilizada nas considerações a respeito desta característica.

3.4.2 Composição centesimal

Para a determinação da análise centesimal foram utilizadas amostras da carne moída. A proteína bruta foi quantificada pelo Método de Kjeldahl; os lipídeos totais foram extraídos pelo método de Soxhlet; a umidade, em estufa a 105 °C até obtenção de peso constante; e as cinzas, em Mufla a 550 °C (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1995). As análises foram realizadas em triplicata e a média foi usada para representar a unidade experimental.

3.5 Modelo alimentar e preparo das amostras

O corte bovino empregado para a elaboração da carne moída foi o Patinho (*Quadriceps femoris*), adquirido no comércio varejista da cidade de Lavras – MG, o qual se encontrava congelado e embalado à vácuo. A carne foi

levada ao Laboratório de Carnes do DCA/UFLA e, após a limpeza e sanificação da superfície da embalagem com etanol 70%, esta foi aberta. A superfície da carne foi retirada, ficando apenas a parte interna, a fim de se garantir a esterilidade do músculo. Em seguida, pedaços desta carne foram processados em moedor (BECCARO® modelo Picador PB-22), com disco de moagem número 4. Todo o equipamento foi previamente desmontado e limpo com água morna (45°C) e detergente. Em seguida, as peças foram enxaguadas e deixadas de molho em solução clorada a 300 ppm por 30 minutos, para ser então novamente sanificado com água fervente em abundância e remontado para o uso.

Após o processamento, 675g da carne bovina moída foi levada à Câmara de Fluxo Laminar do Laboratório de Microbiologia, onde foi colocada em bandeja plástica estéril, sendo inoculada com *S. Enteritidis* S64 na concentração de 10^5 UFC/g. Em seguida foi fracionada (75g) em 9 recipientes plásticos também estéreis, e tratadas com os óleos essenciais nas concentrações 0,39%; 0,78%; 1,56% e 3,125% v/p.

Posteriormente, foram novamente fracionadas (5g) em sacos plásticos de polietileno de alta densidade (PEAD) estéreis, de forma a criar triplicatas para cada concentração de cada óleo essencial, e para cada tempo (Figura 10). O excesso de ar foi retirado do interior da embalagem manualmente. Essas porções de carne moída ficaram estocadas sob temperatura de refrigeração (7 °C) e analisadas nos tempos 0, 1, 2, 4 e 6 dias de armazenamento.

Vale ressaltar que a análise no tempo 0 (zero) foi feita 6 horas após a estocagem, pois esse tempo foi suficiente para que a temperatura da carne se igualasse com a temperatura da incubadora (7°C). Foram realizados os controles, onde não houve adição de óleo essencial na carne moída semeada com microrganismo (0%) e outro onde não foram adicionados nem o óleo nem o microrganismo na carne (Controle - C). Esse Controle (C) foi feito à parte, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação pela *Salmonella*, e foi analisado quanto

ao número de aeróbios psicrotróficos. Todo o experimento foi realizado em três repetições.

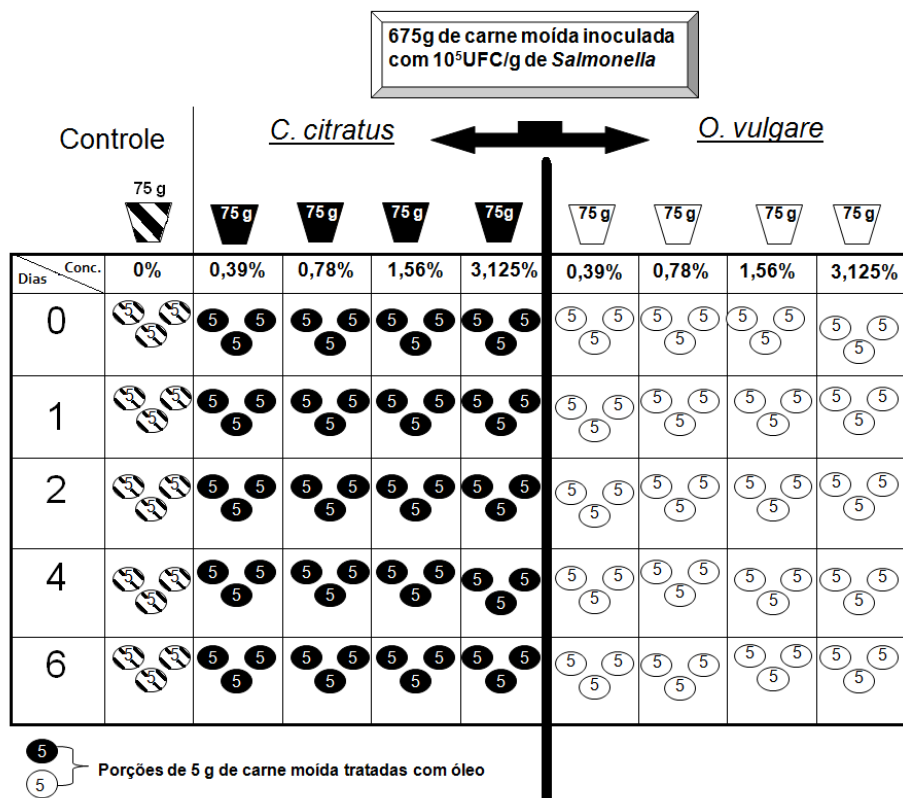


Figura 10 Esquema utilizado na execução do experimento

3.6 Controle de qualidade microbiológica da carne adquirida

Objetivou verificar a possível presença de alguma espécie de *Salmonella* advinda da carne adquirida.

3.6.1 Contagem de *Salmonella* sp.

Triplicatas de amostras de 25g de carne moída foram submetidas à análise de presença/ausência do patógeno, de acordo com Silva et al. (2007), com modificações. Para tal, foram utilizados os seguintes meios: Água Peptonada Tamponada (pré-enriquecimento), Caldos Tetrionato e Rappaport (enriquecimento seletivo), e AGAR RAMBACH Merck® (plaqueamento diferencial). Colônias suspeitas que cresceram em Rambach foram estriadas em tubos contendo Ágar Ferro Tríplice Açúcar (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA). Os tubos de TSI e LIA, que apresentaram reações típicas de *Salmonella* foram submetidas a testes bioquímicos iniciais de urease, fermentação do dulcitol, indol e malonato.

3.6.2 Contagem de micro-organismos aeróbios psicrotróficos

Por se tratar de um produto cru refrigerado (BRASIL, 2003) foi realizado o controle microbiológico (C) (sem adição de óleo e sem inoculação de *Samonella*) a fim de se verificar a presença de micro-organismos aeróbios psicrotróficos acompanhante. Para isto, triplicatas de 5 gramas da carne moída foram analisadas nos dias 0, 1, 2, 4 e 6 dias de armazenamento. As amostras foram homogeneizadas em 45 mL de água peptonada 0,1% p/v, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Em seguida, diluições seriadas foram feitas até 10^{-7} . Aliquotas de 0,1 mL de cada diluição foram utilizadas na técnica de semeadura por superfície (*Spread Plate*) em placas de ágar PCA (Plate Count Agar), incubadas por 10 dias sob temperatura de 7°C, e a contagem de UFC/g foram realizadas em contador de colônias, segundo a técnica padrão, preferencialmente em placas com 25 a 250 colônias. A média do número das colônias contadas nas placas em triplicata, multiplicado pelo fator de diluição das placas correspondentes e pelo

fator de correção da alíquota (x10), forneceu o número de micro-organismos aeróbios psicrotróficos por grama da amostra analisada.

3.7 Enumeração de *Salmonella enterica* Enteritidis e de aeróbios psicrotróficos viáveis na carne moída

A quantificação de *S. Enteritidis* S64 durante o período de estocagem das amostras foi realizada acrescentando-se 45 mL de água peptonada 0,1% p/v aos sacos plásticos contendo as cinco gramas da carne moída, seguido pela homogeneização em Stomacher por 4 minutos à 490 GPM (Golpes por Minuto), obtendo-se a diluição 10^{-1} . A seguir, foram preparadas diluições decimais até 10^{-7} , empregando-se 1mL da diluição anterior e 9 mL do diluente. Aliquotas de 0,1 mL de cada diluição foram utilizadas na técnica de semeadura por superfície em ágar seletivo e diferencial AGAR RAMBACH Merck[®], sendo posteriormente incubadas a 37°C/24h. As contagens foram realizadas em contador de colônias, segundo a técnica padrão, preferencialmente em placas com 25 a 250 colônias. A média do número das colônias contadas nas placas em triplicata, multiplicado pelo fator de diluição das placas correspondentes e pelo fator de correção da alíquota (x10), forneceu o número de *S. Enteritidis* S64 por grama da amostra analisada.

Concomitantemente à análise de *S. Enteritidis* S64, foi realizada a quantificação de micro-organismos aeróbios psicrotróficos no último dia de armazenamento, segundo metodologia empregada no tópico “Contagem de aeróbios psicrotróficos”. Esta análise foi realizada pela necessidade de se verificar a ação do óleo sobre a microbiota psicrotrófica acompanhante neste dia.

3.8 Análises estatísticas

O delineamento utilizado no ensaio para determinação da concentração mínima inibitória foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 9 x 3, sendo 2 óleos essenciais (capim-limão - *C.citratu*s e orégano -*O. vulgare*), 9 concentrações (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39 e 0% v/v) e três repetições, totalizando 54 parcelas.

Para a enumeração de *Salmonella enterica* Enteritidis S64 nas amostras de carne moída, os tratamentos foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas um fatorial 2x5, com os óleos essenciais de capim-limão e orégano em concentrações de 0; 0,39; 0,78; 1,56 e 3,125 % p/v, e na subparcela os tempos 0, 1, 2, 4 e 6 dias de estocagem sob refrigeração.

Os resultados foram obtidos de três experimentos independentes e as médias dos dados coletados foram submetidas à análise de variância (ANOVA) para determinação das diferenças significativas entre os tratamentos, adotando um nível de 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* estatístico R[®] (2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição centesimal e pH da carne

A composição média e o pH da carne moída do corte *Quadriceps femoris* utilizado no experimento encontra-se na Tabela 1. As porcentagens de água, proteína e cinzas encontradas foram 76,06%, 22,66% e 0,81%, respectivamente. Estes resultados são ligeiramente maiores que os registrados no geral para a carne, que possui em média, 75% de água, 19% de proteínas e 0,65% cinzas. Os níveis de gordura, carboidratos e nitrogênio residual são encontrados em torno de 2,%, 1,2% e 1,65%, respectivamente. No entanto, a sua composição pode variar em função da idade, sexo, raça, manejo e espécie do animal (PRANDL et al., 1994). Assim, estes fatores podem ser os responsáveis pelas diferenças encontradas nestes teores.

Tabela 1 Composição centesimal e pH da carne bovina (*Quadriceps femoris*) moída utilizada no experimento

Constituintes	Umidade (%)	Proteína (%)	Extrato Etéreo (%)	Cinzas (%)	pH
Média	76,06	22,66	2,45	0,81	5,65
S.D	0,2426	0,9862	0,2631	0,2156	0,012

S.D: Desvio Padrão. Carboidratos e fibras: quantidade não significativa

O pH médio do corte utilizado no experimento ($5,65 \pm 0,012$) encontra-se dentro dos padrões de normalidade, uma vez que, valores de pH menor ou igual a 5,80 são considerados normais, enquanto valores entre 5,80 e 6,20 implicam em carnes DFD (*Dark, Firm, Dry*) moderados (SILVA; PATARATA; MARTINS, 1999). Esses resultados de pH do presente trabalho corroboram os encontrados por Baracat et al. (2005), que observaram pH médio de 5,6 para o mesmo corte bovino porcionado.

Vários são os fatores que podem influenciar na variação do pH da carne, tais como tipo de músculo, a espécie, a idade, o sexo, as condições de criação (alimentação), o tempo de jejum, a conservação e a estimulação elétrica. Além disso, as diferenças musculares do pH final são determinadas pela variação do conteúdo e da proporção no tipo de fibras (Vermelhas e Brancas) entre os diferentes músculos que compõem uma carcaça, o qual varia inversamente em relação à taxa de glicogênio presente no músculo antes do sacrifício. O pH final também é dependente do poder tampão do próprio músculo, que aumenta com a intensidade do metabolismo glicolítico (PÖSO; PUOLANNE, 2005).

Assim, carnes e produtos cárneos constituem um excelente meio de cultura devido à elevada porcentagem de umidade, pH próximo à neutralidade e composição rica em nutrientes; favorecendo a instalação, sobrevivência e multiplicação de um grande número de microrganismos capazes de provocar toxinfecções no homem (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

4.2 Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI)

Os óleos essenciais de orégano ($P=0,0002$) e capim-limão ($P=0,0007$) apresentaram níveis significativos de inibição sobre *Salmonella enterica* Enteritidis S64 nas diferentes concentrações testadas (Teste “F” a 5% de probabilidade). Os valores observados para os diâmetros dos halos inibitórios (D.H) dos óleos essenciais sobre a bactéria estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 Diâmetro médio dos halos inibitórios (D.H) em diferentes concentrações dos óleos essenciais de orégano (*O.vulgare*) e capim-limão (*C. citratus*) para *Salmonella enterica* Enteritidis S64

Concentração (%)	D.H (<i>O. vulgare</i>)	DH (<i>C. citratus</i>)	valor-P
50,00	7.00 (±0.58)	7.67 (±0.33)	0.3739
25,00	7.00 (±0.00)	7.33 (±0.67)	0.6433
12,50	7.33 (±0.33)	7.33 (±0.33)	1.0000
6,25	6.00 (±0.00)	6.33 (±0.33)	0.3739
3,125	4.67 (±0.33)	5.67 (±0.33)	0.1012
1,56	3.33 (±0.33)*	5.00 (±0.00)*	0.00749*
0,78	3.67 (±0.33)	4.67 (±0.33)	0.1012
0,39	3.00 (±0.00)*	4.00 (±0.00)*	2.2e ⁻¹⁶ *
0,00	0.00 (±0.00)	0.00 (±0.00)	1.0000

DH: Média de três leituras (mm); valores em 'parêntese' (± Erro Padrão)

* Valores na mesma linha, para a mesma concentração foi significativo pelo teste de "F" ($P \leq 0.05$)

Apesar de não ter sido feita a cromatografia em fase gasosa dos óleos essenciais extraídos, foi adotado para a composição média do óleo de capim-limão os dados encontrados por Oliveira et al. (2010), uma vez que estes autores utilizaram a mesma espécie de *Cymbopogon citratus*, colhida no mesmo horto (Horto de Plantas Medicinais da UFLA) e cujo óleo essencial foi extraído da mesma forma que o extraído no presente trabalho. Assim, considerou-se que este óleo apresentava como componentes majoritários o geranial e o neral (Figura 8), e como componentes minoritários o 2-undecanona, linalol, mirceno, geraniol, (E)- β -ocimeno e (Z)- β -ocimeno. Já para o óleo de orégano, considerou-se a composição média da maioria dos trabalhos publicados, que tem como compostos majoritários o carvacrol e o timol (Figura 6) (BARROS et al., 2009; BURT, 2004; FRIEDMAN et al., 2006; SILVA et al., 2010).

Para o controle negativo (concentração 0%), não houve formação de halo inibitório, o que comprova que o diluente (DMSO) usado não possui atividade antimicrobiana, não interferindo assim na análise da CMI, que é a menor concentração do óleo essencial que não demonstra crescimento visível (DELAQUIS et al., 2002), o que pode ser verificado no presente trabalho pela Figura 11. Um controle positivo com o antibiótico Clorafenicol (1000 ppm) foi realizado a fim de verificar a sensibilidade da cepa utilizada a este composto. Em média, o halo formado por esse antibiótico foi de 15 mm (halo central na placa da Figura 11).

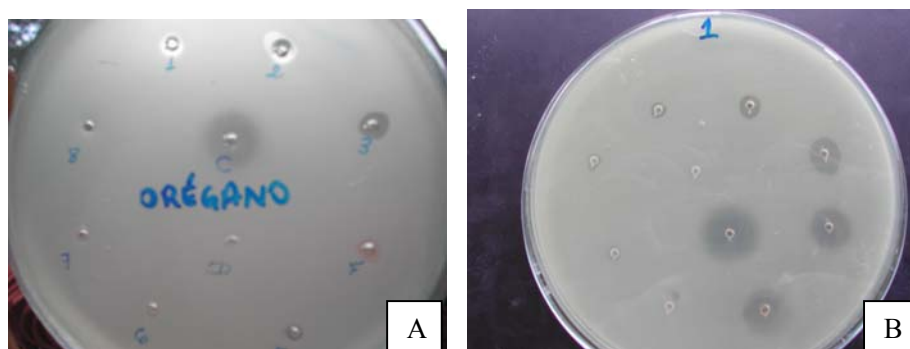


Figura 11 Halo de inibição obtido pelo método de difusão cavidade em agar para os óleos essenciais de orégano (A) e capim-limão (B) em *Salmonella enterica* Enteritidis S64

Observa-se de forma geral, uma relação direta entre as concentrações estudadas e o tamanho do halo inibitório para os dois óleos avaliados (Tabela 2), resultados que também foram verificados por Baydar et al. (2004) estudando o efeito dos óleos essenciais de diferentes espécies de orégano sobre 15 cepas de bactérias; e por Silva et al. (2010) observando os efeitos de cinco marcas comerciais de óleo essencial de orégano sobre *S. Enteritidis*. Isso pode ser explicado pelo fato de que, quanto maior o percentual de óleo essencial, maior é a quantidade de seus respectivos compostos antimicrobianos, para uma mesma

quantidade de inóculo bacteriano (10^7 UFC/mL) presente na placa. No entanto, para o óleo de orégano, a duplicação da concentração de 25% para 50% não alterou a média do tamanho do halo inibitório (7 mm). Possivelmente isto está relacionado à maior viscosidade na concentração 50% em relação à concentração de 25%, reduzindo, dessa forma, a sua mobilidade e solubilidade no Ágar.

Apesar dos dois óleos terem apresentado a mesma CMI (0,39% v/v ou 3,9 μ L/mL), o óleo essencial de capim-limão obteve maior D.H. quando comparado ao orégano, para a concentração mínima (teste de “F” a 5% de probabilidade). O mesmo ocorreu para a concentração de 1,56% v/v. Estas diferenças observadas podem ser explicadas pela distinção química de cada óleo. Estudos realizados por Farag et al. (1989), verificando a composição química de diferentes óleos essenciais industrializados, observaram que a atividade antimicrobiana dos óleos estiveram predominantemente relacionados com seus compostos majoritários, demonstrando, dessa forma, que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode estar relacionada a sua respectiva composição, além da configuração estrutural e grupos funcionais, bem como da possibilidade de interações sinérgicas entre os componentes (DORMAN; DEANS, 2000). No entanto, considerando o grande número de diferentes grupos químicos pertencentes aos óleos essenciais, a atividade antimicrobiana não pode ser atribuída a um mecanismo específico, mas sim a vários alvos de ação na célula (BURT, 2004).

O óleo essencial de orégano tem como constituintes majoritários o carvacrol e o timol, os quais são responsáveis pelo seu amplo espectro de atividade antimicrobiana (KULISIC et al., 2004; LAMBERT et al., 2001; SILVA et al., 2010). Já o capim-limão apresenta o citral, mistura isomérica de neral e geranial, como componente majoritário (OLIVEIRA et al., 2010; SADDIQ; KHAYYAT, 2010). Esses componentes majoritários dos dois óleos

têm atividade antibacteriana comprovada, porém a maior inibição do óleo de capim-limão em relação ao óleo de orégano ocorre, provavelmente, devido ao elevado teor de citral (neral e geranial), um monoterpene classificado como aldeído, e segundo Kalemba e Kunicka (2003), aldeídos possuem alta atividade antimicrobiana.

O mecanismo de ação dos monoterpenos envolve, principalmente, efeitos tóxicos a estrutura e a função da membrana celular. Como resultado do caráter lipofílico, os monoterpenos irão, preferencialmente, se deslocar da fase aquosa em direção às estruturas de membranas (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995). Isto culminará em permeabilização da membrana bacteriana, levando à dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do *pool* de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e perda de íons potássio e fosfato (BAKKALI; AVERBECK; IDAOMAR, 2008).

O carvacrol e timol são compostos fenólicos que possuem em comum um grupo hidroxila, ao qual é creditado como sendo o responsável pela intensa atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano (DORMAN; DEANS, 2000; ULTEE et al., 2002). Em pesquisa realizada por Oliveira (2010) foram verificadas alterações morfológicas das células de *Clostridium perfringens* ATCC 3624, causadas pelo tratamento com óleos essenciais de *Satureja montana* L., rico em timol e carvacrol. De fato, os componentes fenólicos são capazes de dissolverem-se na membrana microbiana e desta forma, penetrarem na célula onde podem interagir com mecanismos essenciais para o metabolismo microbiano (MARINO; BERSANI; COMI, 2001). Além disso, trabalho realizado por Juven et al. (1994) com *S. aureus* e *S. Typhimurium* propõe que o timol se liga as proteínas de membrana hidrofobicamente e por meio de ligações de hidrogênio, alteram as características de permeabilidade de membrana. Segundo Milos, Mastelic e Lerkivic (2000), os componentes minoritários dos óleos essenciais também têm sua própria contribuição no desencadeamento dos

fenômenos envolvidos na eficiência da atividade antimicrobiana. Assim, acredita-se que ocorra uma ação concomitante de vários compostos sobre diferentes alvos na célula microbiana (CARSON; MEE; RILEY, 2002). O mecanismo exato de ação de cada composto fenólico sobre as várias bactérias é difícil de ser determinado (BURT, 2004; KALEMBA; KUNICKA, 2003); porém acredita-se que a perturbação da membrana citoplasmática, ruptura do fluxo de elétrons, perturbação do transporte ativo, inibição de atividade de enzimas e coagulação do conteúdo citoplasmático sejam alguns mecanismos envolvidos na promoção da eficácia antimicrobiana atribuída aos óleos essenciais (BURT, 2004; COX, 2000; SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995).

A CMI encontrada para a *Salmonella enterica* Enteritidis S64 foi de 3,9 µL/mL de óleo de orégano, resultado dez vezes menor que o encontrado por Souza, Stamford e Lima (2006), que verificaram uma CMI de 40 µL/mL de óleo essencial de orégano para a *Salmonella enterica* ATCC 6017, quando estudavam 15 cepas de bactérias, entre gram positivas e negativas, através da técnica de difusão em meio sólido. Esta diferença pode ser resultado de vários fatores, tais como o meio de cultura utilizado para confeccionar as placas, o método de determinação da CMI, os constituintes dos óleos essenciais, além de diferenças entre as cepas utilizadas. Grande variação na CMI (200-800 µL/mL) foi verificado por Santurio et al. (2007) avaliando a atividade deste mesmo óleo pelo método da microdiluição em caldo em sete diferentes *Salmonella enterica* Enteritidis. Penalver et al. (2005), utilizando este mesmo método, estimularam a CMI do óleo de orégano em 0,25% v/v sobre *S. Enteritidis*.

Bactérias Gram negativas, como a *S. enterica*, apresentaram em estudos realizados por Souza, Stamford e Lima (2006) CMI maior que as bactérias Gram positivas. Muitos estudos de investigação da ação antimicrobiana de óleos essenciais reportam que, geralmente, os microrganismos Gram positivos são mais sensíveis a ação destas substâncias, quando comparados aos

microrganismos Gram negativos (CEYLAN; FUNG, 2004; FISHER; PHILLIPS, 2006; MOUREY; CANILLAC, 2002; SHAN et al., 2007). A menor sensibilidade apresentada pelos microrganismos Gram negativos está, provavelmente, relacionada à presença de uma membrana externa ao redor de sua parede celular, a qual restringe a difusão de compostos antimicrobianos através do lipopolissacarídeo de membrana, dificultando, desta forma, que os componentes dos óleos essenciais alcancem seus alvos-celulares (HARPAZ et al., 2003; PINTORE et al., 2002).

A CMI obtida pelo óleo de capim-limão sobre a *S. enterica* foi de (0,39% v/v ou 3,9 µL/mL), resultado semelhante ao encontrado por Duan e Zhao (2009) que, testando diferentes concentrações de óleo essencial de capim-limão (1, 3, 5 e 10 µL/mL) pelo método de diluição em Ágar, verificaram que na concentração de 3 µL/mL o crescimento de *S. Enteritidis* era completamente inibido. Estes resultados são inferiores aos encontrados por Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar, Martin-Belloso (2006) que registraram concentração de 5 µL/mL do óleo para a inibição de *S. Enteritidis* em meio TSB (Trypic Soy Broth). Como citado anteriormente essas diferenças são resultados de diversos fatores, como meio de cultura, metodologia empregada, constituição dos óleos e a cepa testada. A alta eficiência antimicrobiana do óleo essencial de capim-limão também é reportada por Santos et al. (2009) que, utilizando o método de microdiluição em caldo, verificaram valores de CMI de 0,08 mg/mL para *S.aureus* (Gram positiva), 0,63mg/mL para *E. coli* (Gram negativa) e de 1,25 mg/mL para *C. albicans* (levedura). Sacchetti et al.(2005) atribui a alta eficiência antimicrobiana deste óleo essencial aos isômeros neral e geranial.

Ao fazer comparações entre resultados de CMI de óleos essenciais é importante levar em consideração os vários fatores que influenciam os resultados obtidos. Pode-se citar, por exemplo, a variação da composição do óleo essencial devido à época de colheita da planta, a localização geográfica e o

método de extração (MILOS; MASTELIC; LERKIVIC, 2000). Além desses fatores, a cepa utilizada e a metodologia empregada para avaliação da CMI também influenciam grandemente os resultados obtidos. Dessa forma, uma comparação de resultados é difícil de ser realizada (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Assim, a determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* neste estudo teve por objetivo nortear as possíveis concentrações que poderão ter atividade similar em uma aplicação na matriz alimentar.

4.3 Enumeração de *Salmonella enterica* Enteritidis S64 na carne bovina moída tratada

Antes da realização do experimento, triplicatas da carne moída sem inóculo e sem óleo essencial foram submetidas a um controle de qualidade, com a finalidade de verificar a possível presença de *Salmonella* spp. advinda desta. Realizadas as análises verificou-se ausência em 25 gramas de todas as amostras avaliadas, conforme a legislação vigente (BRASIL, 2001), demonstrando dessa forma, que a contagem de *Salmonella* das carnes moídas estudadas foram exclusivamente *Salmonella enterica* Enteritidis S64 inoculada.

Apesar da *Salmonella* spp. ser uma bactéria mesófila (temperatura ótima em torno de 38°C), ela tolera temperatura mínima de 5°C (FORSYTHE, 2002). Isso explica a boa adaptação às condições de refrigeração (7°C) apresentada pela cepa testada, fato que pode ser observado pelo leve aumento na contagem da bactéria na amostra controle (0%), no tempo 2 dias (Gráfico 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Hayouni et al. (2008) que também verificaram para o tratamento controle (0%) um pequeno aumento da população de *S. Enteritidis* ao estudarem o efeito de óleos essenciais sobre esta bactéria em carne picada estocada à temperatura de 4-7°C. Comportamento semelhante também foi verificado por Skandamis, Tsigarida e Nychas (2002) em pedaços de

carne inoculados com *S. Typhimurium* e estocados à 5° C em ambiente aeróbio. A refrigeração, método mais utilizado para conservação de alimentos perecíveis como a carne, não é capaz de reduzir a quantidade de *Salmonella* se esta estiver presente.

As concentrações dos óleos essenciais utilizadas no experimento com a carne moída foram baseadas nos resultados da CMI *in vitro*. Assim, a menor concentração usada foi de 0,39% v/p (CMI). As demais concentrações (0,78%; 1,56% e 3,125% v/p) foram utilizadas tendo por base o trabalho de Pandit e Shelef (1994), que observaram que para alcançar uma inibição eficiente em linguiças de porco, foram necessárias concentrações de óleos essenciais dez vezes maior que a CMI. Além disso, concentrações maiores que a CMI *in vitro* são necessárias para uma efetiva inibição em alimentos, devido às várias interações que podem ocorrer entre os componentes dos óleos essenciais e do alimento (BURT, 2004).

De acordo com os dados representados na Tabela 1A, APÊNDICE A, verifica-se que os dois óleos essenciais, em todas as concentrações testadas, apresentaram significativa atividade antimicrobiana sobre a *Salmonella enterica* Enteritidis S64 na carne moída, com destaque para o óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), que apresentou as menores contagens em relação ao óleo de orégano (*Origanum vulgare*). Essas diferenças de eficiência devem-se à variação da composição do óleo, interações entre eles e os componentes da carne e, principalmente, à sensibilidade da cepa utilizada aos constituintes de cada óleo.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais na menor concentração (0,39% p/v), apesar de não eliminar totalmente a população bacteriana, promoveu redução considerável. O óleo de capim-limão reduziu a população de *S. Enteritidis* em 2,09 Log₁₀ UFC/g, enquanto o óleo de orégano, na mesma concentração, reduziu a população em 1,15 Log₁₀ UFC/g, logo nas primeiras

horas de contato (tempo 0). No decorrer do armazenamento, verificou-se que, para ambos os óleos, praticamente não houve variação na população bacteriana, prevalecendo assim um efeito bacteriostático. Tendência semelhante foi observada também para a concentração de 0,78% p/v para os dois óleos, onde, inicialmente (tempo 0) foi verificado pronunciado efeito bactericida, no qual a redução do patógeno chegou a 3,58 e 2,43 Log_{10} UFC/g para os óleos de capim-limão e orégano, respectivamente.

Posteriormente, pouca variação da população bacteriana foi observada durante os tempos de estocagem (Gráfico 1).

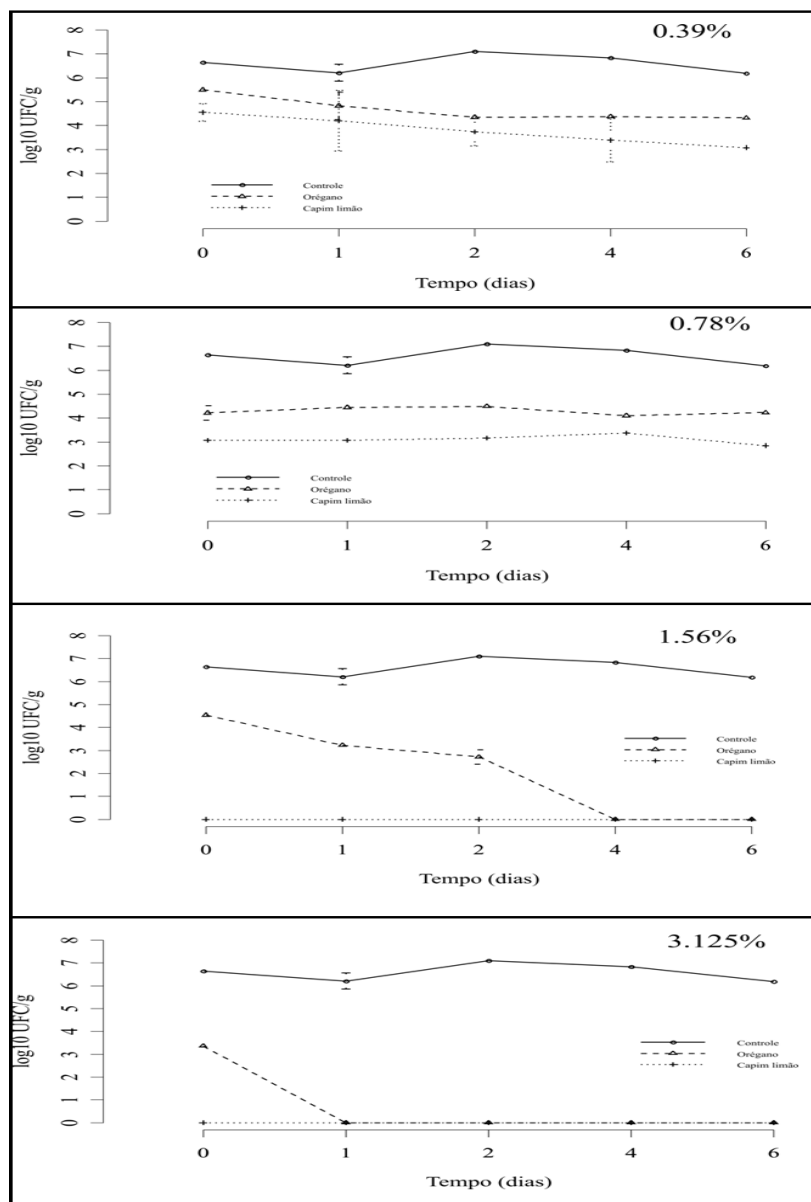


Gráfico 1 Efeito dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão) sobre *S. Enteritidis* S64 em carne moída bovina durante armazenamento à temperatura de 7°C por seis dias. controle = sem óleo (0%)

Uma possível explicação para isto é que ao adicionar os óleos na carne com *S. Enteritidis*, estes estavam prontamente disponíveis para alcançar seu alvo (bactéria); porém, com o decorrer da estocagem os óleos essenciais foram se dissolvendo na fase lipídica da carne e/ou reagindo com as proteínas, tornando-se menos disponíveis para a ação bactericida, porém ainda, capazes de exercerem efeito bacteriostático. Este fato também foi observado em estudo de Govaris et al. (2010) com carne de carneiro picada e inoculada com 10^4 UFC/g de *S. Enteritidis* sob refrigeração, onde amostras tratadas com 0,6% de óleo essencial de orégano tiveram redução de 2,43 Log_{10} UFC/g no dia 2, e em seguida a população foi mantida praticamente inalterada.

Nas concentrações de 1,56% e 3,125% v/p, o óleo de capim-limão mostrou atividade bactericida de 100%, logo nas primeiras horas de contato (tempo 0), enquanto que para o óleo de orégano este mesmo resultado só foi alcançado após quatro dias de armazenamento na concentração de 1,56% e um dia para 3,125% v/p do óleo (Gráfico 1). Essa menor atividade antibacteriana do orégano, comparada ao capim-limão deve-se, em parte, ao fato de que proteínas e gorduras têm a propriedade de se ligar ou solubilizar com compostos fenólicos (no caso timol e carvacrol), reduzindo sua disponibilidade para a ação bactericida na carne moída (HAYOUNI et al., 2008). Além disso, entre os compostos não fenólicos, aqueles com função aldólica se destacam como agentes antimicrobianos. O cinamaldeído apresenta excelente atividade antimicrobiana. No entanto, outros aldeídos como geranial, neral e citronelal exibem atividade moderada contra bactérias patogênicas como *S. Typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* (OUSSALAH et al., 2007).

Alguns resultados de pesquisa têm demonstrado que geralmente, óleos essenciais que possuem na sua constituição compostos fenólicos são mais efetivos sobre bactérias Gram positivas, enquanto aqueles que possuem citral são efetivos contra ambas as bactérias Gram positivas e negativas

(MASTROMATTEO; CONTE; DEL NOBILE, 2010). Assim, era de se esperar a menor efetividade do óleo de orégano visto que a bactéria utilizada é Gram negativa e a carne usada no experimento possui 22,66% de proteínas, 2,45% de gorduras (Tabela 1) Cutter e Hruska (2000) sugerem que a gordura do alimento pode formar uma capa protetora em torno das bactérias, protegendo-as dos agentes antimicrobianos. Vários autores afirmam que a atividade antimicrobiana de óleos essenciais em alimentos é menor que no meio de cultura devido às interações destes com componentes do alimento, como proteínas e gorduras (BURT, 2004; SHELEF; JYOTHI; BULGARELLI, 1984). Gill et al. (2002) sugerem que a grande disponibilidade de nutrientes em alimentos, comparados aos meios utilizados em laboratório, pode facilitar a reparação dos danos celulares mais rapidamente. A susceptibilidade da bactéria ao efeito antimicrobiano dos óleos essenciais dependem de fatores intrínsecos (teores de gordura, proteína, pH, água, presença de antioxidantes, conservantes, dentre outros) e extrínsecos (temperatura, atmosfera dentro da embalagem, fisiologia do microrganismo) (BURT, 2004; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

É perceptível no presente trabalho que o aumento da concentração de óleo essencial, tanto de orégano como de capim-limão, na carne, implicou também em aumento na redução da população bacteriana. O óleo de capim-limão, por exemplo, no tempo zero, reduziu a população bacteriana de 4,55 $\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$ na concentração de 0,39% p/v para zero na concentração de 3,125% p/v. Comportamentos semelhantes foram verificados por vários autores para os mais diversos óleos e extratos vegetais e cepas bacterianas (BILIADERIS, 2009; CAREAGA et al., 2003; DUAN; ZHAO, 2009; ZHANG et al., 2009; ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS). Hayouni et al. (2008) observaram em seu trabalho com carne picada, que no terceiro dia de armazenamento refrigerado houve o decréscimo na contagem de *S. Enteritidis* de 2,1 $\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$, 2,6 Log_{10}

UFC e 2,8 Log₁₀ UFC nas concentrações de 1,5%, 2% e 3% v/p de óleo essencial de Sálvia (*Salvia officinalis*), respectivamente.

Uma possível explicação para isto é que a maior concentração de óleos essenciais implica na maior disponibilidade dos compostos antimicrobianos para agir sobre a membrana da célula bacteriana, levando a maior redução do número de células viáveis.

É bem difundido na literatura que os óleos essenciais afetam as células bacterianas por vários mecanismos antimicrobianos, incluindo ataque da bicamada de fosfolípidios da membrana celular, interrompendo os sistemas enzimáticos, comprometendo o material genético da bactéria, e formando hidroxiperóxidos devido à oxidação dos ácidos graxos insaturados (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). O caráter hidrofóbico do carvacrol, composto majoritário do óleo de orégano, sugere que este se solubiliza na membrana citoplasmática, resultando em um aumento da fluidez da membrana e extravasamento dos íons sódio e potássio, levando a um abaixamento do gradiente de pH e colapso do potencial de membrana, inibindo a síntese de ATP, levando por fim à morte da célula (BURT, 2004; ULTEE et al., 2000). O mecanismo de ação do citral, componente majoritário do capim-limão, discutido anteriormente parece ter sido mais efetivo para a bactéria testada que a ação do carvacrol presente no orégano.

Observa-se ainda que, para os dois óleos testados, as menores concentrações (0,39% e 0,78%), em um primeiro momento tiveram efeito bactericida, e posteriormente efeito bacteriostático. Já para concentrações maiores (1,56% e 3,125%) verificou-se acentuado efeito bacteriostático, chegando a total eliminação da *Salmonella* na carne. Apesar de não se poder atribuir a atividade antimicrobiana de um óleo essencial apenas ao seu composto majoritário, estudos com o óleo de capim-limão (86% de citral) e citral puro mostraram que este último apresentou atividade duas vezes maior que a

atividade do óleo de capim-limão sobre *E. coli* e *S. enterica* em vinhos, comportamento que também foi verificado para o carvacrol puro quando comparado com óleo de orégano (80% carvacrol) (FRIEDMAN et al., 2006). Hayouni et al., 2008, estudando o efeito antimicrobiano de óleos essenciais sobre *S. Enteritidis* verificaram atividade bacteriostática do óleo de *Schimus molle* (Bálsamo) nas concentrações entre 0,02-0,1% v/p. É importante salientar que este vegetal possui o composto majoritário ρ -cymeno, precursor do carvacrol, um dos componentes majoritários presentes no óleo de orégano. Entretanto, em concentrações maiores, 2 e 3% de óleo de *S. molle*, os mesmo autores observaram alta atividade bactericida sobre a bactéria, chegando a redução de 2,2 Log₁₀ UFC/g em 15 dias de estocagem. De forma geral, em baixas concentrações (<1%) os óleos essenciais exibem atividade bacteriostática, entretanto em altas concentrações (>1,5%) este apresenta-se essencialmente bactericida (HAYOUNI et al., 2008). Resultados semelhantes também foram obtidos com óleo de *S. officinalis* (0,2-0,5 µg/g) em carne experimentalmente contaminada com *B. cereus*, *S. aureus* e *S. Typhimurium* (SHELEF; JYOTHI; BULGARELLI, 1984).

Baseado na legislação brasileira vigente (BRASIL, 2001), as concentrações mínimas de óleos essenciais necessárias para garantir a legalidade da carne recém moída seria de 1,56% para o óleo de capim-limão e de 3,125% para o óleo de orégano. Porém, levando em conta possíveis alterações organolépticas indesejáveis na carne devido a essas concentrações de óleo, e tendo em vista que a *Salmonella* sempre está associada a uma microbiota acompanhante, geralmente deteriorativa, e que dificilmente contagens tão altas de *Salmonella* (>10⁵ UFC/g) estariam presentes em produtos cárneos sem que antes a carne desenvolva aspecto deteriorado, concentrações de 0,39% p/v de óleo de capim-limão ou de 0,78% p/v de óleo de orégano já seriam suficientes para garantir a segurança alimentar.

4.4 Contagem de aeróbios psicrotróficos

Os resultados da contagem em placas de microrganismos psicrotróficos da carne moída sem inóculo e sem óleo (controle) durante os dias de armazenamento são representados no Gráfico 2.

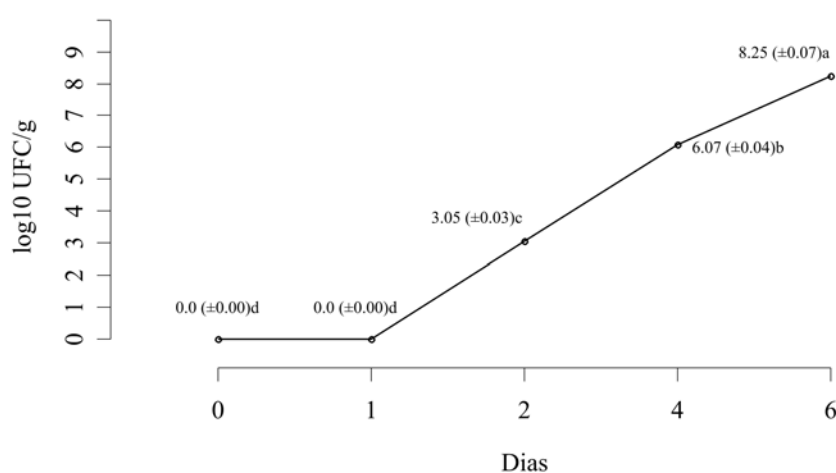


Gráfico 2 Contagem média de aeróbios psicrotróficos em carne moída bovina (controle). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Scott-Knott 5%)

Nos tempos 0 e 1 dia não foi verificada contagem de psicrotróficos, o que demonstra a importância de uma assepsia eficiente durante todo o experimento, como a que foi realizada no presente trabalho. Em estudos de Oliveira et al. (2008) foram encontradas populações de aeróbios psicrotróficos, em média, de 6,09 Log₁₀ UFC/g em peças de carne (Patinho) inteiras e de 7,19 Log₁₀ UFC/g para a mesma peça, porém moídas em cinco estabelecimentos processadores de carnes na cidade de Lavras - MG. Estes autores atribuíram às altas contagens de bactérias na carne a pouca higiene na obtenção e manipulação

desta, o que foi confirmado pelas altas contagens bacterianas obtidas no moedor de carne e nas mãos dos manipuladores.

A baixa contagem de psicotróficos ($0 \text{ Log}_{10} \text{UFC/g}$) nos primeiros dias de armazenamento registrada no presente trabalho, pode, além da assepsia eficiente, ser também função da metodologia empregada para determinação deste grupo de microrganismos, uma vez que o método de plaqueamento por superfície (*Spread Plate*) possui limite de detecção de 100 UFC/g (SILVA et al., 2007). Assim, durante os tempos 0 e 1 dia, as bactérias psicotróficas, em pequena quantidade, provavelmente estavam em fase “Lag”, na qual ocorre adaptação da bactéria ao meio (carne, temperatura, luminosidade, etc.), onde, apesar de haver intensa atividade metabólica (síntese de novas enzimas), não há reprodução celular. Esta fase é prolongada quando as células estão em um meio onde a fonte de carbono não está prontamente disponível, como é o caso da carne.

A partir do tempo 2 dias, observou-se um aumento da população psicotrófica ($3,05 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$), o que esperava-se, visto que as bactérias já estavam adaptadas ao meio, entrando na etapa conhecida como “Fase de aceleração positiva”, na qual ocorre o início da multiplicação celular. No tempo 4 dias, verifica-se que a população bacteriana dobrou ($6,07 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$) em relação ao tempo 2 dias ($3,05 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$). Tem-se então a “Fase de crescimento exponencial” (Fase Log). Esta etapa é caracterizada pela multiplicação celular acelerada e intensa atividade metabólica. Dois dias depois (tempo 6), nota-se que, apesar de haver aumento da população ($8,25 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$), este ocorre a uma taxa menor. Esta fase pode ser caracterizada como a “Fase de desaceleração” ou “aceleração negativa”, a qual ocorre quando a concentração de um ou mais nutrientes começa a ser limitante.

Concomitantemente à análise de *Salmonella enterica* Enteritidis S64 foi realizada a quantificação de aeróbios psicotróficos no último dia de

armazenamento (dia 6) nas amostras de carne com e sem adição de óleos essenciais. No tratamento controle (0% de O.E + *S. Enteritidis* S64) a contagem de psicotróficos (Tabela 3) foi de 8,35 Log₁₀ UFC/g, resultado praticamente igual àquele encontrado para a carne sem *Salmonella*, 8,25 Log₁₀ UFC/g, (Gráfico 2), demonstrando assim que a presença do patógeno inoculado não influenciou no desenvolvimento da microbiota psicotrófica presente na carne. Este resultado pode ser atribuído ao próprio comportamento da *Salmonella*, que por ser uma bactéria mesófila, e estar em condições desfavoráveis (refrigeração), não se constituiu uma competidora para a microbiota psicotrófica, mais bem adaptada às condições de estocagem da carne.

Diferenças significativas na população de psicotróficos foram observadas entre os tratamentos 0% e 0,39% p/v para os dois óleos avaliados, apesar da pequena redução (< 1 Log₁₀ UFC/g) verificada entre as duas concentrações (Tabela 3). Para a concentração 0,39% a população de psicotróficos para os dois óleos foram estatisticamente semelhantes (7,41 e 7,55 Log₁₀ UFC/g para o orégano e capim-limão, respectivamente). O aumento da concentração dos dois óleos na carne de 0,39% para 3,125% foi acompanhado pela redução da microbiota de 57,3% para o óleo de orégano e de 54,56% para o capim-limão. Isto é resultado da maior disponibilidade dos compostos antimicrobianos na carne à medida que maiores concentrações de óleo são adicionadas à mesma. Esse comportamento também foi notado por Zinoviadou, Koutsoumanis e Biliaderis (2009) que, trabalhando com filmes protéicos contendo diferentes concentrações de óleo essencial de orégano em pedaços de carne, verificaram maior redução na Contagem Total de Células Viáveis para a maior concentração de óleo testada (1,5% p/p). Alguns pesquisadores têm relatado que os compostos fenólicos de diferentes fontes vegetais podem inibir diversos agentes patogênicos de origem alimentar, e que o

teor total de fenólicos está altamente relacionado com a atividade antimicrobiana.

Tabela 3 População de aeróbios psicrotróficos (Log_{10} UFC/g) no sexto dia de armazenamento presentes nas amostras de carne moída bovina inoculadas com *Salmonella enterica* Enteritidis S64 tratadas com óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*)

Tratamento	Concentração (%)	Log_{10} UFC/g
Controle	0.00	8.35 (± 0.01) ^a
<i>Origanum vulgare</i>	0.39	7.41 (± 0.03) ^{bc}
<i>Origanum vulgare</i>	0.78	7.18 (± 0.01) ^c
<i>Origanum vulgare</i>	1.56	5.24 (± 0.08) ^f
<i>Origanum vulgare</i>	3.125	3.16 (± 0.09) ^h
<i>Cymbopogon citratus</i>	0.39	7.55 (± 0.04) ^b
<i>Cymbopogon citratus</i>	0.78	6.67 (± 0.01) ^d
<i>Cymbopogon citratus</i>	1.56	6.24 (± 0.02) ^e
<i>Cymbopogon citratus</i>	3.125	3.43 (± 0.07) ^g

Médias \pm Erro Padrão. Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si (Tukey 5%)

Diferentemente do ocorrido com a *Salmonella*, onde o óleo de capim-limão foi o mais efetivo (Gráfico 1), de forma geral, o óleo de orégano apresentou maior eficiência na redução dos psicrotróficos na carne (Tabela 3). Este fato também foi observado por Barbosa et al. (2009) avaliando o efeito antimicrobiano de óleos essenciais sobre a microbiota psicrotrófica em carne picada. Estes autores verificaram que todos os óleos testados causaram redução destas bactérias, com destaque para o óleo de orégano (redução de 0,4 Log_{10} UFC/g em 24 horas), seguido pelos óleos de tomilho e capim-limão. Souza, Stamford e Lima (2006) também observaram significativa atividade antimicrobiana exercida pelo óleo essencial de orégano sobre o crescimento da microbiota nativa (aeróbios mesófilos) em carne, especialmente na concentração de 80 $\mu\text{L/mL}$. A maior eficiência do óleo de orégano na população psicrotrófica

pode estar relacionada com as espécies de bactérias que estavam presentes na carne. Apesar de não ter sido feita a identificação destas, diversos autores relatam que os psicrotróficos mais comuns encontrados em carnes e produtos cárneos são *Aeromonas*, *Carnobacterium*, *Brochothrix*, *Lactobacillus* e *Pseudomonas*, sendo esta última mais recorrente nestes produtos (COATES et al., 1995; SKANDAMIS; NYCHAS, 2002). O óleo de orégano pode ter tido maior efetividade frente a uma ou mais destas espécies, resultando em uma maior redução microbiana global quando comparado com o óleo de capim-limão.

Apesar dos dois óleos essenciais, em todas as concentrações testadas, apresentarem atividade antimicrobiana, nenhum tratamento foi capaz de eliminar por completo a microbiota psicrotrófica. Isso se deve, pelo menos em parte, devido ao fato da carne ser um alimento propício ao crescimento microbiano (fatores intrínsecos como nutrientes, pH, atividade de água) e a temperatura de estocagem (7°C), temperatura essa ótima para o crescimento e manutenção da integridade dos microrganismos psicrotróficos, facilitando a reparação de possíveis injúrias causadas pelos óleos essenciais. Isso pode ser comprovado pela maior população de psicrotróficos no tratamento controle (8,35 Log₁₀ UFC/g) (Tabela 3) quando comparado com a contagem de *S. Enteritidis* (controle - 6,19 Log₁₀ UFC/g) (Tabela 1A, Apêndice A), mesmo esta tendo sido inoculada a uma concentração inicial de 10⁵ UFC/g. Este fato também foi observado por Skandamis, Tsigarida e Nychas (2002) que, trabalhando com filés de carne contendo 0,8% p/v de óleo essencial de orégano, verificaram a eliminação total da *S. Typhimurium* inoculada (concentração inicial do inóculo igual a 3,5 Log₁₀UFC/g), enquanto a microbiota aeróbica presente, apesar de ter reduzido, não chegou a ser eliminada por completo. Além disso, é bem difundido que, quanto maior e mais diversificada a microbiota do substrato, mais

difícil será a instalação de uma ação antimicrobiana significativa por parte de uma dada substância (MENON; GAR, 2001; NOSTRO et al., 2004).

De forma resumida, a efetividade dos óleos avaliados frente às bactérias psicrotróficas na carne moída poderia, em ordem decrescente, ser assim representada: 3,125% orégano > 3,125% capim-limão > 1,56% orégano > 1,56% capim-limão > 0,78% capim-limão > 0,78% orégano \geq 0,39% orégano = 0,39% capim-limão.

Com os resultados obtidos neste trabalho pode-se sugerir uma possível utilização dos óleos de orégano e capim-limão na redução da população bacteriana autóctone, seja ela patogênica ou deterioradora.

5 CONCLUSÃO

- a) Os óleos essenciais de orégano e capim-limão apresentaram efeitos inibitórios sobre o crescimento, tanto de *Salmonella enterica* Enteritidis S64 quanto da microbiota psicotrófica, acompanhante em carne moída bovina em todas as concentrações testadas.
- b) O óleo essencial de capim-limão promoveu maior redução na contagem de *Salmonella*, enquanto o óleo de orégano mostrou-se mais eficiente contra a microbiota psicotrófica.
- c) Os óleos essenciais de orégano e capim-limão se mostraram promissores na redução de microrganismos psicotróficos e na eliminação de *Salmonella enterica* Enteritidis em carne moída bovina.

REFERÊNCIAS

- ABE, S. S. Y. et al. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. **Japanese Journal of Medical Mycology**, Tokyo, v. 44, p. 285-291, 2003.
- ALIGIANS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oil from *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- ALMEIDA, A. S.; GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M. *Salmonella* em corte de carne bovina inteiro e moído. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 96, p. 77-81, 2002.
- ALMEIDA, I. A. Z. C. et al. *Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990–1999. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 59, n. 1/2, p. 33-37, 2000.
- ALMEIDA, R. C. C.; SCHNEIDER, I. S. Aspectos microbiológicos e químicos de produtos alimentícios elaborados com carnes moídas, vendidas no varejo no município de Campinas. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 2, n. 1/2, p. 37-41, 1983.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. Disponível em <<http://www.abiec.com.br>>. Acesso em: 20 jun. 2010.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 16th ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025 p.
- AVERY, S. M. et al. Pulsedfield gel electrophoresis characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from hides of cattle at slaughter. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 65, p. 1172-1176, 2002.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BALDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Vitória: UFES, 2008. 623 p.

BARACAT, R. S. et al. Efeitos da embalagem com atmosfera modificada na conservação da carne bovina porcionada. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2005.

BARBOSA, L. N. et al. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, New York, v. 6, n. 6, p. 725-728, July/Ago. 2009.

BARROS, J. C. et al. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **LWT - Food Science and Technology**, Netherlands, v. 42, p. 1139-1143, 2009.

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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691 de 29 de março 1952, alterado pelos Decretos nº 1255 de 25 de junho 1962, nº 1236 de 2 de setembro de 1994, nº 1812 de 8 de fevereiro de 1996, nº 2244 de 4 de junho de 1997. Regulamenta a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 1997. p. 241.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº83, de 21 de novembro de 2003. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne bovina em conserva (*CORNED BEEF*) e carne moída de bovino. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 24 nov. 2003. Seção 1, p. 29

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 10 jan. 2001.

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

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

CARDOSO, M. G.; SHAN, A. Y. K. V.; SOUZA, J. A. **Fitoquímica e química de produtos naturais**. Lavras: UFLA, 2001. 67 p. (Textos acadêmicos).

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

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Malaleuca artemifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 3, p. 1914-1920, 2002.

CASTRO, D. P. et al. Não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 27-32, 2006.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Guaíba: Agropecuária, 1995. 196 p.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Newport. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 51, n. 25, p. 545-548, Jan./Abr. 2002.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. Outbreak of *Salmonella* serotype Typhimurium infection associated with eating raw ground beef, Wisconsin, 1994. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 44, n. 49, p. 905-909, 1995.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. **Salmonellosis**. 2005. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm#top>. Acesso em: 28 jun. 2010.

CERVATO, C. et al. Antioxidant proprieties of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extrats. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 24, n. 6, p. 453-465, 2000.

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

CHESCA, A. C. et al. Avaliação higiênico-sanitária de produtos cárneos artesanais. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 118, p. 71-75, 2004.

COATES, K. J. et al. The contribution of carcass contamination and the boning process to microbial spoilage of aerobically stored pork. **Food Microbiology**, London, v. 12, p. 49-54, 1995.

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

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

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

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

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

DELAQUIS, P. J. et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, p.101-109, 2002.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. Ottawa: J. Wiley, 2002. 507 p.

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

DUAN, J.; ZHAO, Y. Antimicrobial efficiency of Essential oils and freeze-thaw treatments against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Ser. Enteritidis in Strawberry Juice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, n. 3, p. 131-137, 2009.

DUTTA, B. K. et al. Anticandidal activity of some essential oils of a megabiodiversity hotspot in India. **Mycoses**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 121-124, 2007.

EDUARDO, M. B. P. et al. *Salmonella Enteritidis*: uma importante causa de surtos bacterianos veiculados por alimentos e a necessidade de uma nova regulamentação sanitária para os alimentos implicados – 1999/2003. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 1, n. 8, ago. 2004. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa8_salmo9903.htm>. Acesso em: 28 jun. 2010.

EL-LEITHY, M. A.; RASHAD, F. M. Bacteriological studies on ground meat and its products. **Archiv für Lebensmittelhygiene**, Alfeld, v. 40, n. 3, p. 58-61, 1989.

EMIROĞLU, Z. K. et al. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties, **Meat Science**, London, v. 86, p. 283-288, 2010.

FARAG, R. S. et al. Antimicrobial activity of some Egyptian spice oils. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, p. 665-667, 1989.

FEHLHABER, K.; JANETSCHKE, P. **Higiene veterinária de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1992. 669 p.

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

FISHER, K.; PHILLIPS, C. A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on survival of *campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and food systems. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, n. 6, p. 1232-1240, Dec. 2006.

FLORENTINO, E. R. et al. Avaliação da qualidade microbiológica da carne moída comercializada em Campina Grande. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 47, p. 38-41, 1997.

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

FRANCO, B. D. G. Foodborne diseases in Southern South América. In: MILIOTIS, M. D.; BIER, J. W. **International handbook of foodborne pathogens**. New York: M. Decker, 2003. p. 733-743.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Varela, 2003. 246 p.

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

FRIEDMAN, M. et al. Antimicrobial wine formulations active against the foodborne pathogens *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n.7, p. 245-251, 2006.

FURTADO, C. **Formação econômica do Brasil**. São Paulo: Nacional, 2001.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 629 p.

GIL, J. I. **Manual de inspeção sanitária de carnes**. 2. ed. Lisboa: Fundação Caloust Gulbenkian, 2002. 485 p.

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

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

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B. *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 137-144, jul./dez. 2003.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B.; DIMAS FILHO, L. Caracterização da produção de capim-limão no estado do Paraná, Brasil. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 385-390, 2007.

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

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

HARPAZ, S. et al. Effect of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea basis fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**, Ames, v. 66, n. 3, p. 410-417, 2003.

HAYOUNI, E. A. et al. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, p. 242-251, 2008.

HEREDIA, N. et al. Microbiological condition of ground meat retailed in Monterrey, Mexico. **Journal of food Protection**, Ames, v. 64, n. 8, p. 1249-1251, 2001.

HOFFMANN, F. L.; CRUZ, C. H. G.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de amostras de carne e de presunto. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 58, p. 52-56, 1998.

JUVEN, B. J. et al. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, p. 626- 631, 1994.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal proprieties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 10, n. 10, p. 813-829, May 2003.

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

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

KULISIC, T. M. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, Oxford, v. 85, n. 4, p. 633-640, May 2004.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 1, p. 58-60, Jan. 2001.

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

LÁZARO, N. S. et al. **Gênero *Salmonella***: características epidemiológicas e laboratoriais. Rio de Janeiro: IOC, 2008. 67 p.

LINDROTH, R. L.; HSIA, M. T. S.; SCRIBER, J. M. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 681-686, 1987.

LOGUERCIO, A. P.; SILVA, W. P.; ALEIXO, J. A. G. Condições higiênicas-sanitárias no processamento de carne bovina moída. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo v. 14, n. 72. p. 60-65, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 544 p.

MAHMOUD, B. S. M. et al. A new technology for fish preservation by combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds. **Food Chemistry**, Oxford, v. 99, p. 656-662, 2006.

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

MARTINS, M. B. G. et al. Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratos* (DC.) Stapf (*Poaceae*) e perfil químico do óleo essencial. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 3, p. 20-29, 2004.

MASTROMATTEO, M.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Combined use of modified atmosphere packaging and natural compounds for food preservation. **Food Engineering Reviews**, New York, v. 2, p. 28-38, 2010.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 70 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

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

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

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Disponível em: <<http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br>>. Acesso em: 29 jun. 2010.

MONTEIRO, L. L. et al. Aplicação de imunoenaios no diagnóstico de doenças veiculadas por produtos de origem animal. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 123, p. 23-29, 2004.

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

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

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.

NOVAK, J. et al. Study of essential oil components in different *Origanum* species by GC and sensory analysis. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 32, n. 2, p. 141-150, 2003.

OLIVEIRA, A. C. B.; GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Avaliação dos alimentos cárneos servidos no programa de alimentação escolar de um município da grande São Paulo: ênfase nos aspectos de tempo e temperatura. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 124, p. 24-29, 2004.

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

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 549-553, 2010.

OLIVEIRA, T. L. C. **Atividade do óleo essencial de segurelha (*Satureja montana* L.) sobre *Clostridium perfringens* em sistemas de emulsão cárneas elaborados com diferentes níveis de nitrito**. 2010. 152 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, Londres, v. 73, p. 236-244, 2006.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

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

PARDI, C. M. et al. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: UFG, 2001. p. 373-380.

PENALVER, P. et al. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Scandinavia, v. 113, p. 1-6, 2005.

- PENNEY, V. et al. The potential of phytopreservatives and nisin to control microbial spoilage of minimally processed fruit yogurts. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlim, v. 5, n. 3, p. 369-375, Sept. 2004.
- PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.
- PINTORE, G. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. from Sardinia and Corsica. **Flavor and Fragrance Journal**, Sassari, v. 17, n. 1, p. 15-19, 2002.
- POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2004. 1102 p.
- PÖSO, A. R.; PUOLANNE, E. Carbohydrate metabolism in meat animals. **Meat Science**, Londres, v. 70, p. 4232-434, 2005.
- PRANDL, O. et al. **Tecnologia e higiene de la carne**. Zaragoza: Acribia, 1994. 854 p.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2004. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 jun. 2010.
- RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEWICKRAMA, K. An integrated strategy to control post-harvest decay of Embul banana by combining essential oils with modified atmosphere packaging. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 40, p. 97-103, 2005.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.
- RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; MARTIN-BELLOSO, O. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella* enteritidis, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in fruit juices. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 69, p. 1579-1586, 2006.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; MARTIN-BELLOSO, O. Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 121, p. 313-327, 2008.

RITTER, R.; SANTOS, D.; BERGMANN, G. P. Contaminação bacteriana da carne moída bovina comercializada em bancas do mercado público de Porto Alegre. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n. 85, p. 50-56, 2001.

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

ROÇA, R. O.; SERRANO, A. M. Abate de bovinos: alterações microbianas da carcaça. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 9, n. 35, p. 8-13, 1995.

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

SADDIQ, A. A.; KHAYYAT, S. A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: citral. **Pesticide Biochemistry Physiology**, Amherst, v. 98, n. 1, p. 89-93, 2010.

SAHIN, F. et al. Biological activities of the essential oil of methanol extract and *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 549-557, 2004.

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

SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 436-441, 2009.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2007. 1102 p.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SHAN, B. et al. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 117, p. 112-119, 2007.

SHELEF, L. A.; JYOTHI, E. K.; BULGARELLI, M. A. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, p. 737-740, 1984.

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

SILVA, J. A. Microbiologia da carcaça bovina: uma revisão. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v. 24, n. 10, p. 62-87, 1997.

SILVA, J. A.; PATARATA, L.; MARTINS, C. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. **Meat Science**, Londres, v. 52, p. 453-459, 1999.

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

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007.

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

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2007. 1102 p.

SINGH, A. et al. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 36, n. 8, p. 787-794, Dec. 2003.

SINGH, N. et al. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil of sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 35, n. 8, p. 720-729, Dec. 2002.

SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and citotoxic activities of *Origanum vulgare* essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 5, p. 1202-1205, 1996.

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

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 79, n. 1-2, p. 35-46, 2002.

SKANDAMIS, P.; TSIGARIDA, E.; NYCHAS, G. J. E. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella thyphimurium* in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. **Food Microbiology**, London, v. 19, p. 97-103, 2002.

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

SOUZA, C. L. et al. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química da carne bovina em açougues do município de Macapá. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 72, p. 60-65, 2000.

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

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

TAWIL, G. G.; YOUSEF, R. T. Activity of volatile oil components against *Candida albicans*. **Alexandria Journal of Pharmaceutical Science**, Egypt, v. 2, p. 23-26, 1988.

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

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. 398 p.

TRAJANO, V. N. et al. Antibacterial property of spice essential oils on food contaminating bacteria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, p. 542-545, 2009.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citrates* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlim. v. 8, p. 253-258, 2007.

UPNMOOR, I. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Guaíba: Agropecuária, 2003. 56 p.

VON HERTWIG, I. F. **Plantas aromáticas e medicinais: plantio, colheita, secagem, comercialização**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 414 p.

WANKE, M.; SKORUPUPINSKA-TUDEK, K.; SWIEZEWSKA, E. Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. **Acta Biochimica Polonica**, Warsaw, v. 48, n. 3, p. 663-672, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Drug-resistant *Salmonella*. **Fact Sheet**, Geneva, n. 139, Apr. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em: 28 jun. 2010.

ZHANG, H. et al. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. **Meat Science**, London, v. 81, p. 686-692, 2009.

ZINOVIADOU, K. G.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science**, London, v. 82, p. 338-345, 2009.

APÊNDICE

Tabela 1A Contagem da população de *Salmonella enterica* Enteritidis S64 em carne moída bovina tratada com diferentes concentrações de óleos essenciais de orégano (*O.vulgare*) e capim-limão (*C. citratus*) durante 6 dias de armazenamento sob refrigeração

Log ₁₀ UFC/g						
Tratamento	Concentração (%)	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 4	Dia 6
<i>CONTROLE</i>	0.00	6.64 (±0.03) ^{Ac}	6.21 (±0.08) ^{Ad}	7.10(±0.25) ^{Aa}	6.83 (±0.02) ^{Ab}	6.19 (±0.03) ^{Ad}
<i>O. vulgare</i>	0.39	5.49 (±0.02) ^{Ba}	4.83 (±0.13) ^{Bb}	4.35(±0.03) ^{Bc}	4.37 (±0.01) ^{Bc}	4.32 (±0.01) ^{Bc}
<i>O. vulgare</i>	0.78	4.21 (±0.07) ^{Db}	4.45 (±0.04) ^{Ca}	4.49(±0.01) ^{Ba}	4.10 (±0.02) ^{Cb}	4.23 (±0.02) ^{Cb}
<i>O. vulgare</i>	1.56	4.54 (±0.03) ^{Ca}	3.23 (±0.03) ^{Db}	2.71(±0.07) ^{Ec}	0.00 (±0.00) ^{Ed}	0.00 (±0.00) ^{Fd}
<i>O. vulgare</i>	3.125	3.36 (±0.03) ^{Ea}	0.00 (±0.00) ^{Eb}	0.00 (±0.00) ^{Fb}	0.00 (±0.00) ^{Eb}	0.00 (±0.00) ^{Fb}
<i>C. citratus</i>	0.39	4.55 (±0.09) ^{Ca}	4.20 (±0.29) ^{Ca}	3.73(±0.14) ^{Cb}	3.38 (±0.21) ^{Db}	3.07 (±0.03) ^{Db}
<i>C. citratus</i>	0.78	3.06 (±0.02) ^{Fb}	3.09 (±0.03) ^{Db}	3.16(±0.04) ^{Db}	3.37(±0.05) ^{Da}	2.84 (±0.05) ^{Ec}
<i>C. citratus</i>	1.56	0.00 (±0.00) ^{Ga}	0.00 (±0.00) ^{Ea}	0.00 (±0.00) ^{Fa}	0.00 (±0.00) ^{Ea}	0.00 (±0.00) ^{Fa}
<i>C. citratus</i>	3.125	0.00 (±0.00) ^{Ga}	0.00 (±0.00) ^{Ea}	0.00 (±0.00) ^{Fa}	0.00 (±0.00) ^{Ea}	0.00 (±0.00) ^{Fa}

Médias ± Erro Padrão. Médias seguidas de letras diferentes maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p≤0.05)