



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Câmpus de São José do Rio Preto

MARÍLIA GONÇALVES CATTELAN

**Atividade antibacteriana de óleo essencial de orégano  
(*Origanum vulgare*): ações *in vitro* e *in situ* para  
preservação de alimento**

São José do Rio Preto  
2015

## **Marília Gonçalves Cattelan**

Atividade antibacteriana de óleo essencial de orégano  
(*Origanum vulgare*): ações *in vitro* e *in situ* para preservação de  
alimento

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann (*in memoriam*)

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho

São José do Rio Preto  
2015

Cattelan, Marília Gonçalves.

Atividade antibacteriana de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) : ações in vitro e in situ para preservação de alimento / Marília Gonçalves Cattelan -- São José do Rio Preto, 2015

118 f. : il., tabs.

Orientador: Fernando Leite Hoffmann

Coorientador: Alexandre Rodrigo Coelho

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Alimentos - Microbiologia.  
3. Orégano. 4. Essências e óleos essenciais. 5. Anti-infecciosos.  
6. Alimentos - Avaliação sensorial. I. Hoffmann, Fernando Leite.  
II. Coelho, Alexandre Rodrigo. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.  
IV. Título.

CDU – 663.12

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

## **Marília Gonçalves Cattelan**

Atividade antibacteriana de óleo essencial de orégano  
(*Origanum vulgare*): ações *in vitro* e *in situ* para preservação de  
alimento

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho  
UTFPR – Londrina / PR  
Co-orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriane Elisabete Antunes de Moraes  
UNICAMP – Limeira / SP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Silva Fazio  
IMES – Catanduva / SP

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz  
UNESP – São José do Rio Preto / SP

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi  
UNESP – São José do Rio Preto / SP

São José do Rio Preto  
27 de novembro de 2015

*Aos meus pais, Grácia e José Wanderley, e ao prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann (in memoriam) dedico com amor este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todo amparo nesta jornada;

Aos meus pais, Grácia e José Wanderley, e aos meus irmãos, Renan, Rafael, Simara e Letícia, pelo amor incondicional, pelo aprendizado evolutivo diário e por serem meu porto seguro;

Ao professor Dr. Fernando Leite Hoffmann (*in memoriam*), que me acolheu em um momento tão delicado de sua vida, agradeço por ser um exemplo de dedicação, ética, honestidade e amor para com a vida e com a área acadêmica;

Ao professor Dr. Alexandre Rodrigo Coelho, pela confiança, comprometimento, dedicação e ensinamentos durante a execução deste trabalho;

Aos meus familiares pelo apoio, amor e momentos compartilhados;

À Tânia M. V. Gonçalves, amiga de todas as horas, agradeço pelos ensinamentos, pelos momentos e pela presença sempre tão constante, confortante e certa;

As professoras Dr<sup>a</sup>. Adriana Barbosa Santos e Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Conti-Silva, pelas sugestões, auxílio, correções, aprendizados e amizade;

Aos professores Dr<sup>a</sup>. Adriane Elisabete Antunes de Moraes, Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Silva Fazio, Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi, Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz, Dr<sup>a</sup>. Juliana Guerra de Oliveira e Dr<sup>a</sup>. Raquel Guttierres Gomes pelas sugestões e correções desta pesquisa;

As professoras Dr<sup>a</sup>. Natália Soares Janzantti e Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Mauro, pelo auxílio nas análises de composição centesimal;

À Priscila Juliana Pinsetta Sales, pela presença constante, pela paciência para comigo e por todo carinho;

As minhas amigas-irmãs Caroline A. Cunha e Lilian Lee, pela presença tão constante mesmo diante da distância física;

As amigas Gisele Bueno, Lina M. Grajales Agudelo, Irene Freitas, Ariane Chiarelli, Tatiane Silva, Mariana Garcia e Juliana Ferreira, por tornarem

meus dias mais sutis, bem-humorados e por todo o incentivo ao longo deste período;

A Daiane Bertholin, Catharina Calochi, Aline Teodoro, Sabrina Casarotti, Janaína Alves, Juliana Rezende, Juliano Borsato, Katieli Todisco, Mara Lina e Maurício Bonatto, pelo auxílio, convívio e aprendizado diários;

A Ana Sílvia Mattos, Arthur Oliveira, Vanessa Tomé, Caroline Gipsy e Bruna Martins, agradeço pela ajuda em algumas análises, pelas risadas e pelo convívio;

À Gabriela Balthazar, que em tão pouco tempo se tornou tão essencial, agradeço pela amizade, companheirismo, ensinamentos e momentos compartilhados;

Ao Ginaldo V. dos Santos, amigo de longa data, pela permanente acolhida. E aos demais técnicos e amigos Alana Silveira, Luiz Camolezi e José Jesuíno, por todo o auxílio na pesquisa;

A Patrícia, Rachel e Senhora “Benê” Hoffmann, pelo carinho, paciência e disponibilidade;

Aos amigos do GAEBEM (Grupo de Amparo Espiritual Bezerra de Menezes), pelo elo fraterno e contínuo;

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, DETA, do IBILCE-UNESP;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo auxílio financeiro por meio de bolsa concedida;

A todos aqueles que fazem parte de quem eu sou,

*meus sinceros agradecimentos.*

*“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta”.*

(Francisco Cândido Xavier)

## RESUMO

Em virtude da incidência de doenças veiculadas por alimentos e do interesse crescente no emprego de conservantes naturais para substituir os aditivos químicos, esta pesquisa objetivou avaliar os efeitos *in vitro* e *in situ* do óleo essencial de orégano (OEO), empregado individualmente e em combinação com sal (cloreto de sódio), sobre duas bactérias contaminantes de alimentos, *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Para tanto, empregou-se uma amostra comercial de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.), que foi caracterizada por cromatografia gasosa. Os ensaios de resistência *in vitro* foram efetuados por meio do procedimento de difusão em ágar por disco. A contagem microbiana foi padronizada em  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. O efeito do OEO e do sal foi avaliado em planejamento fatorial  $2^2$  com um ponto central. Para o estudo *in situ* foi proposto como sistema alimentício um condimento preparado de orégano, composto por leite em pó integral, água, óleo vegetal de soja, extrato de soja em pó, OEO e sal, sendo os dois últimos constituintes os fatores cujos níveis foram avaliados. Para tanto, empregou-se um delineamento composto central rotacional, com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 repetições do ponto central. A aceitação sensorial dos condimentos formulados com diferentes quantidades de OEO e de sal foi avaliada em relação aos seguintes atributos sensoriais: aparência, aroma, textura, sabor e aceitação global, empregando uma escala hedônica de nove pontos. A intenção de compra foi pesquisada por uma escala de cinco pontos estruturada. As distintas formulações do condimento preparado de orégano foram avaliadas centesimalmente por meio de análises dos teores de cinzas, lipídeos, proteínas e umidade. A caracterização cromatográfica do OEO revelou

que o produto composto majoritariamente por carvacrol (65,1 %) e p-cimeno (12,0 %). Não houve diferença significativa na aceitação das amostras ( $P > 0,05$ ). A análise de agrupamento mostrou que a formulação de condimento preparado de orégano com quantidades intermediárias de sal e OEO foi bem aceita pelos julgadores. As formulações de condimento com baixos teores de sal, independentemente da quantidade OEO, apresentaram maior intenção de compra. As distintas formulações de condimento preparado de orégano apresentaram perfis centesimais similares, destacando-se os lipídeos presentes em teores de 57,89 a 60,09 % e a umidade entre 31,99 e 32,33 %. Os resultados da atividade antibacteriana *in vitro* sugerem que a inibição de ambas as espécies bacterianas foi similar para um mesmo tratamento, sendo possível constatar a existência de diferença ( $P \leq 0,05$ ) somente entre os tratamentos OEO 0,4 % e aqueles com os menores teores de OEO (0,2 %) combinados com o sal. Para a *E. coli* foi verificado, no estudo *in situ*, o efeito do OEO e da interação entre o OEO e o sal sobre a contagem bacteriana, o que permitiu descrever matematicamente a contagem da cepa em função dos teores de OEO e sal ( $P \leq 0,10$ ). Por conseguinte, o emprego do OEO em concentrações de até 0,3 % propiciou a menor contagem de *E. coli* em condimento preparado de orégano, embora o mesmo não tenha ocorrido para o *S. aureus*. Ademais, o OEO e o sal exerceram efeitos inversos sobre o desenvolvimento de *E. coli*, o que permite explorar o uso do OEO em quantias superiores às empregadas no presente estudo, visando a redução dos níveis de sal no alimento e permitindo pequenas variações no desenvolvimento de *E. coli*.

Palavras-chave: Óleo essencial. Antimicrobianos naturais. Patógeno de origem alimentar. Avaliação sensorial. Superfície de resposta.

## ABSTRACT

*Due to the incidence of foodborne illnesses and the increasing interest in the use of natural preservatives to replace chemical additives, this research aimed to evaluate in vitro and in situ effects of oregano essential oil (OEO), used individually and in combination with salt (sodium chloride) against two foodborne pathogens, Escherichia coli (ATCC 8739) and Staphylococcus aureus (ATCC 25923). It was employed a commercial sample of oregano essential oil (Origanum vulgare L.), which was characterized by gas chromatography. The in vitro antibacterial assays were conducted by the disc diffusion method. Microbial counts were standardized to  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>. The effect of OEO and salt was evaluated in factorial design  $2^2$  with a central point. For the in situ study was proposed as food system a oregano salad dressing, composed of powdered whole milk, water, vegetable soybean oil, soybean powder extract, OEO and salt. The latter two constituents were factors whose levels were evaluated. For this, it was used a central composite design with four factorial points, four axial points and three repetitions of the central point. Sensory assessment of salad dressing with OEO was evaluated in relation to the following attributes: appearance, aroma, consistence, flavour and overall acceptability. A nine point hedonic scale was employed, besides purchase intent by a structured five point scale. Chromatographic characterization of OEO revealed that the oil was composed mainly of carvacrol (65.1 %) and p-cymene (12.0 %). There was no significant difference in the acceptance of the samples ( $P < 0.05$ ). Cluster analysis showed that formulation with intermediate quantities of salt and OEO was preferred by the judges. Oregano essential oil salad dressings with low salt content, regardless of OEO amount, presented*

*higher intention to purchase. The distinctive oregano salad dressings formulations showed similar profiles, especially lipids present in levels from 57.89 to 60.09 % and the moisture between 31.99 and 32.33 %. The results of the in vitro antibacterial activity suggest that inhibition of both bacterial species was similar to the same treatment. It was possible to confirm the existence of differences ( $P \leq 0.05$ ) between OEO 0.4 % and those treatments with OEO lower levels (0.2 %) combined with the salt. For *E. coli* it was verified the effect and interaction between OEO and the salt on the bacterial count, allowing mathematically describe the development of the strain in function of OEO and salt amounts ( $P \leq 0.10$ ). The use of OEO at concentrations up to 0.3 % promoted the development control of *E. coli* in oregano salad dressing, although it has not occurred to *S. aureus*. OEO and salt exert opposite effects on the development of *E. coli*, which allows exploiting the use of OEO in amounts higher than those employed in this study, aiming at the reduction of salt levels in the food and allowing small variations in the development *E. coli*.*

*Keywords: Essential oil. Natural antimicrobials. Foodborne pathogen. Sensory evaluation. Surface response analysis.*

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1 – Revisão de Literatura

### CAPÍTULO 2 – Óleo essencial de orégano: efeito na aceitação sensorial

**Figura 1** – Distribuição dos julgadores no espaço multidimensional em relação aos atributos sensoriais do condimento preparado de orégano: (a) aroma, (b) sabor e (c) aceitação global..... 69

**Figura 2** – Distribuição percentual da intenção de compra de amostras de condimento preparado de orégano..... 71

### CAPÍTULO 3 – Efeito da adição de óleo essencial de orégano e de sal (NaCl) sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

**Figura 1** – Atividade antibacteriana *in vitro* sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*..... 90

**Figura 2** – Contagem média de *E. coli* e *S. aureus* (log UFC.g<sup>-1</sup>) referente aos tratamentos empregados no estudo do efeito antibacteriano *in situ*..... 95

**Figura 3** – Diagrama de pareto dos efeitos para a contagem de *Escherichia coli* (log UFC.g<sup>-1</sup>) em condimento preparado de orégano..... 97

**Figura 4** – Superfície de resposta (a) e diagrama de contorno (b) para a contagem de *Escherichia coli* (log UFC.g<sup>-1</sup>) em função das concentrações de óleo essencial de orégano (OEO) e de sal em condimento preparado de orégano..... 99

**Figura 5** – Diagrama de pareto dos efeitos para a contagem de *Staphylococcus aureus* (log UFC.g<sup>-1</sup>) em condimento preparado de orégano... 101

### CAPÍTULO 4 – Conclusões gerais

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1 – Revisão de Literatura**

<b>Tabela 1</b> – Componentes majoritários de alguns óleos essenciais de especiarias.....	28
<b>Tabela 2</b> – Alguns óleos essenciais de especiarias selecionados que exibem propriedades antimicrobianas sobre micro-organismos deteriorantes de alimentos.....	31

### **CAPÍTULO 2 – Óleo essencial de orégano: efeito na aceitação sensorial**

<b>Tabela 1</b> – Delineamento experimental com as variáveis codificadas e reais empregadas no desenvolvimento das formulações de condimento preparado de orégano.....	64
<b>Tabela 2</b> – Aceitação sensorial das formulações de condimento preparado de orégano utilizadas neste experimento.....	68

### **CAPÍTULO 3 – Efeito da adição de óleo essencial de orégano e de sal (NaCl) sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***

<b>Tabela 1</b> – Delineamento experimental com as variáveis codificadas e reais que compõem o planejamento fatorial $2^2$ com um ponto central.....	82
<b>Tabela 2</b> – Delineamento experimental com as variáveis reais empregadas nas formulações de condimento de orégano, utilizadas no estudo antibacteriano <i>in vitro</i> .....	83
<b>Tabela 3</b> – Delineamento experimental com as variáveis codificadas e reais empregadas nas formulações de condimento preparado de orégano, utilizadas no estudo antibacteriano <i>in situ</i> .....	84
<b>Tabela 4</b> – Perfil cromatográfico do óleo essencial de orégano usado nesta pesquisa.....	88
<b>Tabela 5</b> – Composição centesimal das formulações de condimento preparado de orégano.....	89
<b>Tabela 6</b> – Diâmetros de inibição da atividade antibacteriana <i>in vitro</i> sobre <i>Escherichia coli</i> , para os tratamentos empregados neste estudo.....	91
<b>Tabela 7</b> – Diâmetros de inibição da atividade antibacteriana <i>in vitro</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , para os tratamentos empregados neste estudo.....	92
<b>Tabela 8</b> – Regressão múltipla para ajuste do modelo de segunda ordem e análise de variância da regressão para os dados de contagem microbiana ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ) de <i>Escherichia coli</i> em condimento preparado de orégano.....	96
<b>Tabela 9</b> – Análise de variância para a variável contagem de <i>Escherichia coli</i> ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ) em condimento preparado de orégano.....	96
<b>Tabela 10</b> – Regressão múltipla para ajuste do modelo de segunda ordem e análise de variância da regressão para os dados de contagem microbiana ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ) de <i>Staphylococcus aureus</i> em condimento preparado de orégano.....	100
<b>Tabela 11</b> – Análise de variância para a variável contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ) em condimento preparado de orégano.....	100

### **CAPÍTULO 4 – Conclusões gerais**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>Aw</b>	Atividade de água
<b><i>B. cereus</i></b>	<i>Bacillus cereus</i>
<b><i>B. subtilis</i></b>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CNS</b>	Conselho Nacional de Saúde
<b>DAEC</b>	<i>E. coli</i> de aderência difusa
<b>DCCR</b>	Delineamento Composto Central Rotacional
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>DPPH</b>	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
<b>DTA</b>	Doença Transmitida por Alimento
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EaggEC</b>	<i>E. coli</i> enteroagregativas
<b>EAEC</b>	
<b>EIEC</b>	<i>E. coli</i> enteroinvasivas
<b>EPEC</b>	<i>E. coli</i> enteropatogênicas
<b>ETEC</b>	<i>E. coli</i> enterotoxigênicas
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FRAP</b>	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
<b>GRAS</b>	<i>Usually Recognized as Safe</i>
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i>
<b><i>K. pneumoniae</i></b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>MHA</b>	Ágar Müller-Hinton
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NMP</b>	Número Mais Provável

<b>OE</b>	Óleo Essencial
<b>OEO</b>	Óleo Essencial de Orégano
<b>ORAC</b>	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PCA</b>	Ágar Padrão para Contagem
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b><i>S. marcescens</i></b>	<i>Serratia marcescens</i>
<b>STEC</b>	<i>E. coli Shiga</i> toxigênica
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TEAC</b>	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>CFU</b>	
<b>USA</b>	<i>United States of America</i>
<b><i>Y. enterocolitica</i></b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Temperatura na escala graus Celsius
°C.min <sup>-1</sup>	Relação graus Celsius por minuto
µg	Micrograma
µg.mL <sup>-1</sup>	Relação micrograma por mililitro
cm	Centímetro
Fe	Elemento químico ferro
g	Gramma
γ	Letra grega gama
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
kV.cm <sup>-1</sup>	Relação quilovolt por centímetro
log	Escala logarítmica
m	Metro
mg	Miligrama
mg.mL <sup>-1</sup>	Relação miligrama por mililitro
Min	Minuto
mL	Mililitro
mL.100 g <sup>-1</sup>	Relação mililitro por cem grammas
mL.min <sup>-1</sup>	Relação mililitro por minuto
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NMP.g <sup>-1</sup>	Relação Número Mais Provável por grama
peso.peso <sup>-1</sup>	Relação peso por peso
ppm	Parte por milhão
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
UFC.g <sup>-1</sup>	Relação Unidade Formadora de Colônia por grama
UFC.mL <sup>-1</sup>	Relação Unidade Formadora de Colônia por mililitro
v.v <sup>-1</sup>	Relação volume por volume
volume.peso <sup>-1</sup>	Relação volume por volume
α	Letra grega alfa
β	Letra grega beta

$\mu\text{L}$

Microlitro

$\mu\text{m}$

Micrômetro

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>08</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
Lista de Figuras.....	12
Lista de Tabelas.....	13
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	14
Lista de Símbolos.....	16
<b>Introdução e objetivos.....</b>	<b>19</b>
1 Introdução.....	20
2 Objetivos.....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
Referências.....	22
<b>CAPÍTULO 1 – Revisão de literatura.....</b>	<b>23</b>
1 Especiarias.....	24
1.1 Definições.....	24
1.2 Histórico do uso de especiarias.....	24
2 Óleos essenciais.....	26
2.1 Definições.....	26
2.2 Obtenção dos óleos essenciais.....	26
2.3 Composição dos óleos essenciais.....	27
2.4 Propriedades dos óleos essenciais.....	29
2.4.1 Atividade antimicrobiana.....	29
2.4.1.1 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	32
2.4.1.2 Atividade antimicrobiana <i>in situ</i> .....	37
2.4.1.3 Mecanismos de ação antimicrobiana.....	40
2.4.2 Atividade antioxidante.....	42
2.5 Aspectos legais do uso de óleos essenciais.....	45
3 Micro-organismos.....	46
3.1 <i>Escherichia coli</i> .....	46
3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	47
Referências.....	49
<b>CAPÍTULO 2 – Óleo essencial de orégano: efeito na aceitação sensorial...</b>	<b>59</b>
RESUMO.....	60
ABSTRACT.....	61
1 Introdução.....	62
2 Material e métodos.....	64
2.1 Matérias-primas.....	64
2.2 Processamento do condimento preparado de orégano.....	64
2.3 Avaliação sensorial.....	65
2.4 Análise estatística.....	66
3 Resultados e discussão.....	67
4 Conclusões.....	72
5 Referências.....	73

<b>CAPÍTULO 3 – Efeito da adição de óleo essencial de orégano e de sal (NaCl) sobre <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>76</b>
RESUMO.....	77
ABSTRACT.....	78
1 Introdução.....	79
2 Material e métodos.....	81
2.1 Matérias-primas.....	81
2.2 Cultura bacteriana.....	81
2.3 Estudo do efeito antimicrobiano <i>in vitro</i> .....	82
2.4 Processamento dos condimentos preparados de orégano.....	83
2.5 Estudo do efeito antimicrobiano <i>in situ</i> .....	84
2.6 Perfis microbiológicos dos condimentos preparados de orégano.....	84
2.7 Composição centesimal dos condimentos preparados de orégano.....	85
2.8 Perfil cromatográfico do óleo essencial de orégano.....	85
2.9 Análise estatística.....	86
3 Resultados e discussão.....	87
3.1 Perfis microbiológicos dos condimentos preparados de orégano.....	87
3.2 Perfil cromatográfico do óleo essencial de orégano.....	87
3.3 Composição centesimal dos condimentos preparados de orégano.....	89
3.4 Atividade antibacteriana.....	90
3.4.1 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> .....	90
3.4.2 Atividade antibacteriana <i>in situ</i> .....	94
4 Conclusões.....	104
5 Referências.....	105
<b>CAPÍTULO 4 – Conclusões finais.....</b>	<b>110</b>
1 Conclusões finais.....	111
2 Sugestões para pesquisas futuras.....	112
<b>ANEXOS.....</b>	<b>113</b>
ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	114
ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	116
ANEXO 3 – Ficha sensorial de caracterização dos provadores.....	117
ANEXO 4 – Ficha de avaliação sensorial da aceitação das amostras de condimento preparado de orégano.....	118

# ***Introdução e objetivos***

---

## 1 Introdução

Doenças relacionadas à alimentação e, em particular, aquelas veiculadas por alimentos constituem um dos maiores problemas de saúde pública mundial, ocasionando até mesmo a morte. Devido a fatores relacionados ao estilo de vida da população de países desenvolvidos, como a aquisição de diversos produtos industrializados prontos para o consumo com ou sem adição de calor, a propagação dessas doenças é favorecida (PESAVENTO et al., 2015).

Dada a crescente demanda por alimentos seguros e com elevada qualidade, e visando reduzir o risco e a incidência de doenças transmitidas por alimentos, órgãos governamentais são levados a adotar medidas cada vez mais eficazes relacionadas à produção de alimentos (IVANOVIC et al., 2012).

Com a finalidade de preservar os produtos alimentícios e estender a vida-de-prateleira, a indústria alimentícia faz uso de aditivos sintéticos (PESAVENTO et al., 2015). Porém, dada a suspeita sobre a toxicidade de alguns aditivos químicos, tornou-se evidente a busca por compostos naturais que possam ser empregados nos alimentos como conservadores (OLIVEIRA et al., 2012). Adicionalmente, a redução no uso de compostos como o sal e o açúcar, por questões dietéticas, tende a aumentar o interesse no uso de especiarias (CATTELAN et al., 2013).

As propriedades antimicrobianas e antioxidantes de muitas especiarias e seus óleos essenciais (OE) são conhecidas há tempos, porém somente nos últimos anos os consumidores se atentaram devidamente ao uso dessas substâncias (DUSSAULT; VU; LACROIX, 2014). Óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis, de baixo peso molecular, biossintetizadas em diversos órgãos das plantas (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012). Esses compostos, denominados secundários, são responsáveis pelas propriedades biológicas exercidas pelos OEs (BAKKALI et al., 2008).

Diversos OEs são categorizados como seguros ou GRAS, *Generally Recognized as Safe*, pelo *US Food and Drug Administration* – FDA (BURT, 2004; BENAVIDES; VILLALOBOS-CARVAJAL; REYES, 2012) e, embora diversos estudos evidenciem as propriedades *in vitro* dos óleos essenciais sobre distintas cepas microbianas, as informações sobre efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais nos produtos alimentícios e sua interação com os componentes dos alimentos ainda são escassas (PESAVENTO et al., 2015).

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

A proposta deste estudo foi investigar os efeitos antibacterianos *in vitro* e *in situ* do óleo essencial de orégano sobre duas espécies bacterianas potencialmente transmitidas por alimentos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial de orégano, individualmente ou em combinação com o sal (cloreto de sódio) sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.
- Analisar as interações entre os fatores estudados, concentrações de óleo essencial de orégano e de sal, sobre o desenvolvimento microbiano *in vitro*, por meio de um planejamento fatorial  $2^2$  com um ponto central.
- Estudar a atividade antibacteriana *in situ* do óleo essencial de orégano sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em condimento preparado tipo patê de orégano.
- Avaliar as interações entre os fatores estudados, concentrações de óleo essencial de orégano e de sal, sobre o desenvolvimento microbiano *in situ*, por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR).
- Verificar a aceitação do condimento preparado de orégano em relação aos atributos sensoriais aparência, aroma, textura, sabor e aceitação global, além da intenção de compra do produto.
- Traçar o perfil cromatográfico do óleo essencial de orégano, de modo a correlacioná-lo com os possíveis efeitos antimicrobianos.

## REFERÊNCIAS

BAJPAI, V. K.; BAEK, W.-H. KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734, 2012.

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

BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J. E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 232-239, 2012.

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

CATTELAN, M. G. et al. Antibacterial activity of oregano essential oil against foodborne pathogens. **Nutrition & Food Science**, v. 43, n. 2, p. 169-174, 2013.

DUSSAULT, D.; VU, K. D.; LACROIX, M. *In vitro* evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. **Meat Science**, v. 96, p. 514-520, 2014.

IVANOVIC, J. et al. *In vitro* control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. **Food Control**, v. 25, p. 110-116, 2012.

OLIVEIRA, H. et al. Bacteriophage endolysins as a response to emerging foodborne pathogens. **Trends in Food Science & Technology**, v. 28, p. 103-115, 2012.

PESAVENTO, G. et al. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v. 54, p. 188-199, 2015.

# ***Capítulo 1***

---

*Revisão bibliográfica*

## 1 Especiarias

### 1.1 Definições

O termo especiaria deriva do latim *species*, significando *a priori* uma mercadoria de valor especial, e não apenas um item de comercialização (MILLER, 1969 *apud* VAN DER VEEN; MORALES, 2015). As definições modernas, por sua vez, relacionam as especiarias com plantas de origens tropicais, usualmente empregadas como condimentos ou com propósitos farmacológicos; porém nenhuma definição transmite integralmente a gama de finalidades a que se destinam as especiarias (VAN DER VEEN; MORALES, 2015).

De acordo com a legislação vigente no Brasil, Regulamento Técnico para Especiarias, Temperos e Molhos, “especiarias são produtos constituídos por partes (raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes, talos) de uma ou mais espécies vegetais, tradicionalmente utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas” (BRASIL, 2005).

Designações semelhantes são utilizadas pela ISO (*International Organization for Standardization*) e pelo FDA (*Food and Drug Administration*), em que especiarias e condimentos são definidos, na primeira organização, como “produtos vegetais ou suas misturas livres de matérias estranhas, empregados para agregar sabor, tempero e transmitir aroma em alimentos” e, na segunda, como “qualquer substância vegetal aromática inteira, em partes ou moída, exceto as substâncias tradicionalmente consideradas alimentos, como cebola, alho e aipo, cuja função significativa nos alimentos é o tempero e não a nutrição, e a partir do qual nenhuma parte de qualquer óleo volátil ou outro princípio aromatizante foi removido” (RAGHAVAN, 2007 *apud* WU et al., 2012).

### 1.2 Histórico do uso de especiarias

A história do uso de ervas aromáticas na preservação de alimentos data de tempos imemoriais. As especiarias e seus óleos essenciais são utilizados há séculos pelos antigos egípcios e em países asiáticos como a Índia e a China (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010), sendo indispensáveis aos povos, seja por rituais

praticados, por sua utilização como temperos de alimentos ou na medicina (MENDES, 1993).

A documentação a respeito do uso de especiarias na alimentação e na medicina data, substancialmente, do período compreendido entre os séculos XIII e XV, com mudanças importantes na geopolítica mundial (FREEDMAN, 2015). Na busca por especiarias nas Índias foram descobertos, por exemplo, territórios da África, os Açores, as Ilhas de Cabo Verde, a América e, particularmente, o Brasil (OURIVES, 1997). Sabe-se que a maioria das especiarias possui origem oriental, sendo introduzidas no ocidente somente após a descoberta do Novo Mundo (CEYLAN; FUNG, 2004).

A produção de óleos essenciais, por sua vez, ocorre há mais de 2000 anos, no extremo Oriente, sendo as tecnologias mais modernas desenvolvidas na Arábia, no século IX. Neste período, o uso de especiarias com propósitos medicinais tornou-se secundário quando comparado ao emprego dessas substâncias com finalidades sensoriais (TAJKARIMI ; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

No atual contexto, o uso de especiarias permanece como uma prática amplamente difundida. Elas são utilizadas em produtos alimentícios com o objetivo de propiciar o aumento da vida-de-prateleira, devido às suas propriedades antimicrobianas e/ou antioxidantes, além de melhorar os atributos sensoriais (PIRBALOUTI et al., 2010).

## **2 Óleos essenciais**

### **2.1 Definições**

Óleos essenciais são misturas voláteis, de baixo peso molecular, que são biossintetizadas em diversos órgãos das plantas a que pertencem (BAJPAL; BAEK; KANG, 2012). De acordo com a sua origem biossintética, os compostos presentes nos óleos essenciais podem ser classificados em dois grupos, terpenos e aromáticos (CALO et al., 2015). Dentre os terpenos, os monoterpenos (C10) e os sesquiterpenos (C15) são os mais representativos, sendo que os monoterpenos constituem até 90 % dos óleos essenciais. Em menores concentrações podem ocorrer, ainda, os hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (BAKKALI et al., 2008).

Os terpenos incluem grupos distintos de hidrocarbonetos alifáticos, ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres acíclicos, peróxidos e fenóis (BAJPAL; BAEK; KANG, 2012). Os compostos aromáticos, por sua vez, compreendem aldeídos, álcoois, fenóis e substâncias derivadas de metoxilo e metilenodioxo. Esses compostos são responsáveis pelas propriedades biológicas exercidas pelos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

### **2.2 Obtenção dos óleos essenciais**

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis, geralmente presentes em concentrações baixas (LUCCHESI; CHEMAT; SMADJA, 2004). Existem diversos métodos de extração dos OE e, embora pareça relativamente simples isolar esses compostos, a composição do óleo pode variar em decorrência do método de extração empregado. O método mais utilizado no processo de extração é a destilação, incluindo a hidro destilação e a destilação por arraste a vapor (MASANGO, 2005), destacando-se, ainda, as extrações com solvente e extração por Soxhlet (LUCCHESI; CHEMAT; SMADJA, 2004; CASSEL et al., 2009), prensagem a frio ou maceração (TAJKARIMI ; IBRAHIM; CLIVER, 2010; CALO et al., 2015).

Porém, como os compostos presentes nos óleos essenciais são sensíveis ao calor e às alterações químicas, não raro existem relatos da perda de alguns compostos voláteis, baixa eficiência na extração, degradação de compostos insaturados e de ésteres devido aos efeitos térmicos e à presença de água nos processos. Além disso, podem ser encontrados resíduos de compostos tóxicos que são empregados como solventes na extração (LUCCHESI; CHEMAT; SMADJA, 2004).

Como os OEs são constituídos por compostos polares e apolares, alguns desses componentes podem ser perdidos durante a extração, em decorrência da técnica empregada. A polaridade torna os compostos solúveis em água e essa solubilidade, por sua vez, ocorre em função das propriedades físicas do sistema como a pressão, a temperatura e o potencial químico. Quando métodos de hidro destilação são empregados, em decorrência da solubilidade dos compostos polares, parte deles pode ser perdida em águas residuais do processo. Mesmo que uma nova destilação com a água residual obtida seja realizada, o processo pode se tornar oneroso (MASANGO, 2005).

Em função das limitações de processo, novas técnicas têm sido empregadas na extração de óleos essenciais, dentre as quais se destacam aquelas por fluidos supercríticos (CASSEL et al., 2009), ultrassom (PINGRET; FABIANO-TIXER; CHEMAT, 2014) e micro-ondas (LUCCHESI; CHEMAT; SMADJA, 2004; FILLY et al., 2014).

### **2.3 Composição dos óleos essenciais**

Os óleos essenciais podem conter de 20 a 60 compostos, presentes em distintas concentrações, sendo dois ou três deles definidos como compostos majoritários, presentes em concentrações de 20 até 85 %, enquanto os demais compostos apresentam-se em níveis classificados como traços (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015). Geralmente os compostos majoritários são aqueles que determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008; LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015). A Tabela 1 ilustra os componentes majoritários presentes em óleos essenciais de algumas especiarias empregadas em alimentos.

Alguns fatores, porém, influenciam na composição dos óleos essenciais, sendo eles, a espécie, a origem da planta, a parte de que se originam do vegetal (folha, caule, casca, semente, entre outros), ciclo vegetativo, clima, composição do solo, época de colheita e o método de extração empregado na obtenção do óleo essencial da especiaria. A influência dos fatores mencionados reflete, portanto, nas propriedades dos óleos essenciais (MASOTTI et al., 2003; ANGIONI et al., 2006 *apud* BAKKALI et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2013; CALO et al., 2015).

**Tabela 1** – Componentes majoritários de alguns óleos essenciais de especiarias

Nome do óleo essencial	Nome científico	Parte da planta	Componentes majoritários	Composição aproximada (%)	Referência
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Folhas	$\alpha$ -pineno Bornil acetato Cânfora 1,8-Cineol Limoneno	2 – 25 0 – 17 2 – 14 3 – 89 9,3	Burt (2004); Calo et al. (2015)
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Casca da árvore	Trans-cinamaldeído Eugenol	65 13,2	Calo et al. (2015)
Cravo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Botão da flor	Eugenol Eugenil acetato Eucaliptol	7,5 – 85 8 – 15 3,2	Burt (2004); Calo et al. (2015)
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Flores e Folhas	Carvacrol Timol $\gamma$ -Terpineno p-Cimeno	Traços – 80 Traços – 64 2 – 52 Traços – 52	Bonfanti et al. (2012); Burt (2004); Calo et al. (2015); De Falco et al. (2014)
Sálvia	<i>Salvia officinalis</i> L.	Folhas	Cânfora $\alpha$ -pineno $\beta$ -pineno 1,8-Cineol	6 – 15 4 – 5 2 – 10 6 – 14	Burt (2004)
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Folhas	Timol Carvacrol $\gamma$ -Terpineno p-Cimeno	10 – 64 2 – 11 2 – 31 10 – 56	Burt (2004)

Adaptada de CATTELAN (2012).

De acordo com Bonfanti et al. (2012), o gênero *Origanum* compreende aproximadamente 70 espécies, subespécies, variedades ou híbridos do orégano,

resultando em uma diversidade morfológica e química. Trata-se de um gênero amplamente difundido em regiões próximas do mar Mediterrâneo, sendo que a Turquia tem destaque na produção e comercialização. A espécie mais difundida no mundo é a *Origanum vulgare* L., cujas partes botânicas e extratos são bastante empregados na indústria alimentícia devido às propriedades farmacológicas da especiaria, na culinária e na produção de bebidas espirituosas. Devido ao seu forte aroma, o consumo da especiaria seca é praticamente impossível, devendo ser empregada em matrizes alimentícias neutras, de modo a propiciar aroma e sabor agradáveis.

Sabe-se que os compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais extraídos de distintos tipos de orégano estão relacionados com a atividade biológica elevada que esses compostos exercem (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015). Há estudos que confirmam os benefícios do orégano para a saúde humana, no tratamento de doenças respiratórias, distúrbios gastrintestinais, desordens urinárias e dermatológicas (GÜNDÜZ; GÖNÜL, KARAPINAR, 2010). Além disso, dentre as propriedades biológicas do orégano, destacam-se as antimicrobianas e as antioxidantes (BURT, 2004; CATTELAN et al., 2013; LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015).

## **2.4 Propriedades dos óleos essenciais**

Algumas plantas, seus extratos e/ou princípios ativos possuem atividade antibacteriana relatada (ARORA; KAUR, 1999; NASCIMENTO et al., 2007; BURT, 2004; HOLLEY; PATEL, 2005; FAZIO; GONÇALVES; HOFFMANN, 2009; IVANOVIC et al., 2012; CATTELAN et al., 2013). As ervas possuem níveis distintos de atividade biológica sendo, porém, efetivas contra diversos micro-organismos em concentrações variadas (PIRES et al., 2009).

### **2.4.1 Atividade antimicrobiana**

O primeiro estudo científico sobre o potencial antimicrobiano de uma especiaria data da década de 1880. Trata-se de um estudo sobre o efeito do óleo essencial de canela sobre esporos de *Bacillus anthracis*. Em outro trabalho, o cravo

foi empregado para retardar a deterioração em carnes, xaropes, molhos e doces. Existem relatos acadêmicos que, em 1910, canela e mostarda foram efetivas na preservação de molho de maçã. Desde então, outras especiarias tornaram-se foco de estudos científicos sobre seu potencial efeito antimicrobiano (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Os componentes bioativos de especiarias possuem atividade antimicrobiana bem documentada, com atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BURT, 2004; HOLLEY; PATEL, 2005; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009; FERREIRA et al., 2010; SILVA, J. et al., 2010). Porém, de acordo com Burt (2004), óleos essenciais de especiarias são geralmente menos efetivos contra bactérias Gram-negativas devido à presença da membrana externa na célula, atuando como uma barreira física que dificulta a difusão dos compostos com efeito antimicrobiano. A Tabela 2 traz dados de alguns óleos essenciais de especiarias que possuem atividade antimicrobiana sobre determinadas cepas deteriorantes de alimentos.

A diversidade de espécies de especiarias com atividade antimicrobiana permite uma ampla variedade de estudos em áreas distintas. Pesquisas recentes buscam um antimicrobiano ideal, ou seja, aquele que apresenta um amplo espectro de ação sobre os micro-organismos, além de menores toxicidade, custo e índice de resistência bacteriana (ALVARENGA et al., 2007). No que diz respeito à Ciência e Tecnologia de Alimentos, o estudo de um antimicrobiano ideal é imprescindível para o desenvolvimento de sistemas de bioconservação de alimentos (TRAJANO et al., 2009).

As especiarias e seus derivados assumiram, portanto, importância relevante para serem utilizados como potenciais agentes inibitórios de micro-organismos, com ação inibitória sobre cepas distintas, revelando uma nova perspectiva para seu emprego na indústria alimentícia (CATTELAN et al., 2013).

É imprescindível, porém, atentar para a quantidade de óleo essencial a ser aplicada nos alimentos visto que este é um fator determinante na aceitação sensorial dos produtos (CHOULIARA et al., 2007).

**Tabela 2** – Alguns óleos essenciais de especiarias selecionados que exibem propriedades antimicrobianas sobre micro-organismos deteriorantes de alimentos

<b>Óleo Essencial</b>	<b>Efetivo contra</b>	<b>Referência</b>
Alecrim	<i>Bacillus cereus</i>	Ivanovic et al. (2012)
	<i>Escherichia coli</i>	Moreira et al. (2005); Rota et al. (2008); Pintore et al. (2002); Ivanovic et al. (2012); Teixeira et al. (2013)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Rota et al. (2008); Teixeira et al. (2013)
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	Ivanovic et al. (2012)
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Rota et al. (2008); Teixeira et al. (2013)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rota et al. (2008); Pintore et al. (2002)
Canela	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pintore et al. (2002)
	<i>Escherichia coli</i>	Senhaji; Faid; Kalalou (2007)
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Yuste; Fung (2003)
Cravo	<i>Staphylococcus aureus</i>	Yuste; Fung (2003)
	<i>Escherichia coli</i>	Moreira et al. (2005); Ushimaru et al. (2007); Teixeira et al. (2013)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Trajano et al. (2009); Teixeira et al. (2013)
Manjeriço	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Ushimaru et al. (2007); Teixeira et al. (2013)
	<i>Escherichia coli</i>	Moreira et al. (2005); Trajano et al. (2009)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sartoratto et al. (2004)
Orégano	<i>Escherichia coli</i>	Seydim; Sarikus (2006); Castilho et al. (2012); Teixeira et al. (2013)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Seydim; Sarikus (2006); Castilho et al. (2012); Teixeira et al. (2013)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Castilho et al. (2012)
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Teixeira et al. (2013)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sartoratto et al. (2004); Seydim; Sarikus (2006); Castilho et al. (2012)
	Sálvia	<i>Escherichia coli</i>
<i>Salmonella</i> Enteritidis		Ivanovic et al. (2012)
<i>Salmonella</i> Typhimurium		Delamare et al. (2007); Teixeira et al. (2013)
<i>Staphylococcus aureus</i>		Delamare et al. (2007); Özkan et al. (2010)
Tomilho	<i>Escherichia coli</i>	Rota et al. (2008); Ivanovic et al. (2012); Teixeira et al. (2013)
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	Ivanovic et al. (2012)
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Rota et al. (2008); Teixeira et al. (2013); Pires et al. (2013)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sartoratto et al. (2004); Rota et al. (2008)

A atividade antibacteriana de muitas plantas deve-se aos compostos sintetizados no metabolismo secundário. Tais produtos são conhecidos por suas substâncias ativas (NASCIMENTO et al., 2007). Dentre os grupos químicos conhecidos com ação antibacteriana pode-se mencionar principalmente os compostos fenólicos, as quinonas, os taninos, as cumarinas, os alcalóides e as flavonas e seus compostos (TAJKARIMI ; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

O óleo essencial de orégano possui um amplo espectro de ação antimicrobiana devido, ao menos em parte, ao alto teor de compostos fenólicos em sua composição, tais como carvacrol e timol (PREUSS et al., 2005; BONFANTI et al., 2012). Outros estudos relacionam a composição química com as propriedades antimicrobianas de diferentes espécies de orégano, bem como sua aplicação em preparações comerciais, com o propósito de atuarem como antimicrobianos e antioxidantes (BURT, 2004; CASTILHO et al., 2012).

#### 2.4.1.1 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Os testes de sensibilidade a antimicrobianos da área de saúde são padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), dos EUA, e têm por objetivo analisar os agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos. No caso dos óleos essenciais, porém, a metodologia proposta pelo CLSI não pode ser executada exatamente da forma como encontra-se descrita, devido às suas propriedades químicas, tais como insolúveis em água, quando comparadas às das substâncias normalmente empregadas nos métodos propostos pelo CLSI, que possuem natureza hidrófila (NASCIMENTO et al., 2007).

Embora existam métodos diferentes para o estudo antimicrobiano *in vitro* de compostos naturais, nem todos possuem o mesmo princípio. Por conseguinte, os resultados obtidos nas análises podem apresentar grande disparidade (VALGAS et al., 2007). Os métodos mais empregados para avaliações quantitativas e qualitativas do efeito *in vitro* de óleos essenciais e especiarias são os métodos de diluição, de difusão e bio-autográfico (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Como técnicas qualitativas, capazes de fornecerem indícios da presença ou ausência de substâncias com efeito antimicrobiano, são empregados os métodos de difusão e bio-autográfico. Por outro lado, as técnicas de diluição permitem

determinar a concentração inibitória mínima de um composto, sendo o método classificado como quantitativo (VALGAS et al., 2007). O ideal é que todos os métodos de avaliação antimicrobiana sejam confiáveis, possam ser reproduzidos e validados (NASCIMENTO et al., 2007).

A avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais é efetuada inicialmente por técnicas de triagem *in vitro*, geralmente pelo método de difusão em ágar. Esse método pode ser realizado por meio da utilização das técnicas de difusão em ágar por disco ou por poço (VALGAS et al., 2007). A primeira trata-se de uma metodologia em que um disco de papel filtro impregnado com a solução teste de OE é colocado na superfície de um meio de cultura, geralmente Ágar Müller-Hinton, inoculado com o micro-organismo que se deseja inibir. A formação de zonas de inibição é avaliada após incubação das placas em condições condizentes com o micro-organismo empregado no estudo. Trata-se de uma metodologia adaptada a partir da técnica padronizada para o estudos de sensibilidade microbiana a antibióticos (BAUER et al., 1966; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000; FISCHER; PHILIPS, 2008).

Na técnica de difusão em ágar por poço são feitas perfurações no ágar já solidificado e inoculado com a cepa microbiana teste. Uma alíquota do óleo essencial, ou solução teste, é transferida para o poço e, em seguida, a placa é incubada nas condições pré-estabelecidas (DORMAN; DEANS, 2000).

A técnica de diluição em caldo, por sua vez, é utilizada para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de um agente necessário para inibir o desenvolvimento ou exterminar determinado micro-organismo. Nessa técnica, as soluções antimicrobianas são testadas em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento do micro-organismo é considerada a concentração inibitória mínima. A técnica de microdiluição em caldo é uma adaptação da macrodiluição, e envolve o uso de pequenos volumes de caldo inseridos em microplacas de 96 poços, próprios para esse uso (ALVES et al., 2008).

Um empecilho comumente observado na técnica de difusão em ágar é a difusão irregular dos componentes lipofílicos, resultando em concentrações desiguais do óleo no ágar e, por conseguinte, em regiões com atividade antimicrobiana variável. Tornou-se comum, então, o emprego de solventes, como o etanol, detergentes ou agentes emulsificantes, como o Tween 20, Tween 80 e o

dimetil sulfóxido (DMSO), visando facilitar a dispersão do óleo essencial no meio de cultura (NASCIMENTO et al., 2007). Para evitar efeitos desses agentes no desenvolvimento microbiano, preconiza-se o uso de uma relação adequada entre o óleo e o emulsificante (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999). Alguns pesquisadores propuseram que os emulsificantes Tween 20 e Tween 80, por exemplo, sejam empregados em concentrações que variam entre 0,5 e 20,0 % (NASCIMENTO et al., 2007).

Entre os diversos fatores que influenciam na ação antimicrobiana *in vitro* destacam-se a diversidade na composição e no teor de substâncias bioativas devido a fatores como diferenças entre as variedades, o grau de maturação da planta (GILL et al., 2002; HOLLEY; PATEL, 2005), as características físico-químicas dos compostos antimicrobianos, tais como volatilidade, hidrofobicidade e compatibilidade com o teste empregado (HOLLEY; PATEL, 2005), a solubilidade do óleo e de seus componentes, as propriedades do emulsificante usado no teste (NASCIMENTO et al., 2007), a contagem microbiana, a espécie microbiana empregada no teste (GILL et al., 2002; HOLLEY; PATEL, 2005), a presença de proteínas, amido ou lipídeos, capazes de formar complexos, neutralizando o efeito antimicrobiano ou dificultando o acesso do composto inibitório ao sítio de atuação celular. Por conseguinte, é evidente a necessidade de protocolos padronizados para a avaliação *in vitro* do potencial antimicrobiano de compostos naturais, embora seja pouco provável que um único método possa ter aplicação generalizada (HOLLEY; PATEL, 2005).

Estudo conduzido por Weerakkody et al. (2010), a respeito da atividade antimicrobiana de algumas especiarias e ervas pouco utilizadas frente a bactérias veiculadas por alimentos, os pesquisadores empregaram extratos aquosos, etanólicos e hexânicos sobre *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Foram empregadas as técnicas de difusão em ágar por disco e ensaios de diluição em caldo. Os resultados indicaram que, para a maioria das especiarias, o tipo de solvente utilizado influenciou de modo significativo a atividade antimicrobiana. Em geral, os extratos foram mais efetivos frente às bactérias Gram-positivas e não foi possível correlacionar as técnicas, pressupondo que o emprego de somente uma técnica para avaliar o potencial antimicrobiano pode ser inconclusivo.

Das; Rath; Mohapatra (2011) constataram o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de canela e cravo sobre alguns patógenos isolados de alimentos consumidos popularmente em ruas da Índia, em que *Arizona* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Vibrio* spp. foram 100 % sensíveis aos óleos essenciais. Empregando também os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*) sobre bactérias contaminantes de alimentos, Trajano et al. (2009) obtiveram resultados inibitórios dos óleos sobre todas as cepas bacterianas submetidas aos ensaios (*B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. enterica*, *S. marcescens* e *Y. enterocolitica*). Em ambos os estudos, a técnica de difusão em ágar por disco foi empregada para avaliar o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais sobre as cepas estudadas.

Em outra investigação sobre a interferência da origem e do teor de compostos fenólicos presentes no óleo essencial de orégano (OEO) de cinco marcas comerciais provenientes de diferentes regiões do mundo, na atividade antimicrobiana de *Salmonella* Enteritidis, Silva J. et al. (2010) concluíram que o componente principal presente nas distintas marcas de OEO era o carvacrol. A atividade antibacteriana foi avaliada pela técnica de difusão por poço, empregando soluções alcoólicas de 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 % dos OEO; como resultados, todos os óleos exibiram efeito sobre a espécie empregada no estudo e o OEO proveniente da região do Mediterrâneo, contendo teores significativos de p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno, apresentou efeito antimicrobiano potencializado.

Ao estudarem o efeito inibitório de óleo essencial de orégano sobre cepas bacterianas distintas, Cattelan et al. (2013) compararam as técnicas *in vitro* de difusão em ágar por disco e por poço. Os achados permitiram concluir que somente para a cepa *S. aureus* a técnica de difusão em ágar por disco mostrou-se mais efetiva, enquanto que para *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *S. Typhimurium* não foi possível verificar diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os resultados obtidos nas duas técnicas.

Santurio et al. (2007), ao avaliarem a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) frente a 60 amostras de *Salmonella enterica* distribuídas entre 20 sorovares, todos isolados de carcaças de aves, obtiveram resultados de

efetividade dos óleos essenciais de orégano e de tomilho, com variações de susceptibilidade sobre os distintos sorovares de *Salmonella enterica*. As concentrações inibitórias mínimas foram de 529  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 961  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, para os óleos de orégano e tomilho.

Em avaliação *in vitro*, empregando a técnica de difusão em ágar por disco, Cattelan (2012) avaliou o efeito inibitório dos óleos essenciais de alecrim, coentro, cravo, manjerição, orégano, sálvia e tomilho sobre as espécies bacterianas *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Typhimurium*. A autora observou que o óleo essencial que exibiu maior efeito antibacteriano foi o de orégano, sendo que o aumento da concentração desse óleo propiciou o aumento da atividade antibacteriana, exceto sobre *P. aeruginosa* e *B. cereus*. Os óleos essenciais de cravo e de tomilho também apresentaram inibição microbiana.

Barros et al. (2009) evidenciaram o elevado potencial biológico do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) na inibição da viabilidade de células de *S. aureus* e na supressão de algumas de suas características fisiológicas, como a tolerância a sais e à atuação de algumas enzimas.

Investigando a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos hexânicos de OEO, oriundos da Ilha da Madeira (Portugal), frente a 10 estirpes de bactérias e leveduras patogênicas ou deteriorantes de alimentos, Castilho et al. (2012) relataram que os óleos essenciais e os extratos de n-hexano apresentaram atividade moderada quando empregada a técnica de diluição em caldo. Os autores indicaram que a atividade de todas as amostras sobre *S. aureus* parecia estar relacionada com a presença do timol e do carvacrol, ambos bactericidas a 100  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Com relação à *E. coli*, a espécie foi inibida por duas amostras de óleos essenciais e quatro extratos de n-hexano, sendo novamente relatado que o timol e o carvacrol foram bactericidas a 100  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

Empregando, também, o óleo essencial de orégano dentre outros compostos, Dussault; Vu; Lacroix (2014) evidenciaram o efeito de concentração inibitória mínima do óleo sobre *B. cereus* (CIM = 261 ppm), *E. coli* (CIM = 625 ppm), *L. monocytogenes* (CIM = 521 ppm), *S. aureus* (CIM = 417 ppm) e *P. aeruginosa* (CIM = 2083 ppm).

#### 2.4.1.2 Atividade antimicrobiana *in situ*

Embora o número de estudos sobre o efeito da adição de óleos essenciais como conservantes de alimentos seja crescente desde os anos 1990, ainda são escassas as informações sobre o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais empregados em combinação com outras técnicas para a preservação de alimentos (FRANGOS et al., 2010).

Para que se obtenha o efeito antimicrobiano em um produto alimentício, é imprescindível que a concentração de óleo essencial empregado no experimento seja superior àquela empregada em estudos *in vitro* (BURT, 2004; BAJPAI; BAEK; KANG, 2012). Firouzi et al. (2007) relatam que, embora o efeito antimicrobiano *in vitro* dos óleos essenciais de orégano e noz-moscada sejam substanciais, quando utilizados em alimentos a quantidade dos óleos essenciais necessita ser de 1 a 3 % superior àquela empregada no estudo *in vitro*, concentrações muito superiores às aceitas sensorialmente por avaliadores.

A eficácia de muitos antimicrobianos pode ser influenciada pelos fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento, tais como nutrientes disponíveis, atividade de água, pH, microbiota presente no alimento, presença de antimicrobianos naturais do produto, composição gasosa, temperatura de armazenamento e umidade relativa (BURT, 2004).

Interações entre os constituintes presentes nos alimentos e o emprego de óleos essenciais podem ocorrer, causando efeitos aditivos, antagônicos e sinérgicos (NYCHAS, 1995; BURT, 2004; DELGADO et al., 2004; AIT-OUAZZOU et al., 2013). Uma análise inerente aos óleos essenciais utilizados individualmente ou em combinação com outras substâncias permite empregá-los para alcançar a sinergia de efeitos letais sobre os micro-organismos, empregando baixas concentrações dos constituintes e evitando alterações sensoriais adversas nos alimentos. Sabe-se que os mais bem sucedidos tratamentos empregados na indústria alimentícia são aqueles que, em combinação, conseguem proporcionar excelentes obstáculos ao desenvolvimento microbiano. O conhecimento sobre os mecanismos de ação de barreira auxilia na otimização das condições de tratamento mais efetivas (AIT-OUAZZOU et al., 2013).

Gill et al. (2002) sugeriram que a grande disponibilidade de nutrientes em alimentos, quando comparados aos meios de cultura, permite que as bactérias reparem as injúrias celulares rapidamente. Existem indícios de que concentrações elevadas de gordura e/ou de proteínas nos alimentos protejam as células bacterianas da ação de óleos essenciais (GLASS; JOHNSON, 2004; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Outros pesquisadores sugerem, ainda, que os lipídeos e as proteínas sejam capazes de absorver os extratos de especiarias, reduzindo o efeito antimicrobiano desses compostos (SHEKARFOROUSH; FIROUZI; KAFSHDOZAN, 2014).

Os carboidratos presentes nos alimentos parecem não exercer efeito significativo sobre a atuação dos óleos essenciais empregados como agentes antimicrobianos (SHELEF; JYOTHI; BULGARELLI, 1984 *apud* BAJPAI; BAEK; KANG, 2012). O NaCl, por sua vez, provoca uma redução da atividade de água ( $A_w$ ) do alimento e, conseqüentemente, a prevenção do desenvolvimento de diversas cepas microbianas patogênicas (FRANGOS et al., 2010). A possível interação entre os compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais e os componentes enzimáticos pode limitar a eficácia antimicrobiana dos óleos essenciais nos alimentos (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 2001).

Como a maioria dos alimentos é composta principalmente por água, carboidratos, lipídeos, proteínas e sais, é importante analisar a influência desses componentes na atividade antimicrobiana (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004). Portanto, a aplicação de óleos essenciais em alimentos deve propiciar estudos para determinar e quantificar o efeito dos componentes dos alimentos sobre a atividade antimicrobiana (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009).

Em estudo sobre o efeito *in situ* de alguns óleos essenciais de especiarias e oleoresinas foram constatadas reduções na taxa de desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* de 19 e 10 % quando óleos essenciais de orégano e canela, respectivamente, foram adicionados em presunto, na concentração de 500 ppm (DUSSAULT; VU; LACROIX, 2014). Em trabalho similar, avaliando o efeito *in situ* da adição de óleos essenciais de alecrim, orégano e tomilho sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* em almôndegas, Pesavento et al. (2015) evidenciaram o efeito dos óleos essenciais em concentrações de 1 e 2 %

sobre as cepas estudadas, relatando ainda que as concentrações de óleos essenciais empregadas propiciaram alteração no sabor do alimento. Em almôndegas cozidas, por sua vez, concentrações de 0,5 % dos óleos essenciais provocaram redução significativa na contagem microbiana, revelando o potencial uso dos três óleos como conservantes de alimentos.

Shekarforoush; Firouzi; Kafshdozan (2014) obtiveram resultados significativos na redução da contagem de aeróbios mesófilos em cortes de frangos para churrasco, armazenados a 8 e 20 °C, tratados com óleo essencial de orégano em combinação com um emulsificante comercial. Quando as amostras foram tratadas apenas com o óleo essencial, a redução na contagem microbiana não foi significativa, sugerindo o uso potencial do óleo essencial em combinação com o emulsificante para a inibição microbiana.

Cattelan (2012), em estudo *in situ*, evidenciou que o óleo essencial de orégano em concentrações de 2 e 5 % promoveu a redução da contagem de *Escherichia coli* em queijos tipo Minas Frescal, sendo que a maior concentração de OEO empregada possibilitou a redução do contaminante em cinco ciclos logarítmicos durante o período de armazenamento.

Govaris et al. (2011), avaliando o efeito da atividade antibacteriana de óleos essenciais de orégano e tomilho sobre *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 em queijo Feta embalado e armazenado sob atmosfera modificada, notaram redução no tempo de sobrevivência dos patógenos de 10 dias, quando foram empregadas concentrações dos óleos essenciais de 0,1 mL.100 g<sup>-1</sup>. Na concentração do óleo essencial de orégano de 0,2 mL.100 g<sup>-1</sup>, observou-se redução do tempo de sobrevivência dos patógenos de 50 % quando comparada à amostra controle, que não fora tratada com os óleos essenciais.

Pesquisando o efeito dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), Barbosa et al. (2016) contaminaram caldos de legumes e vegetais folhosos, separadamente, com três espécies bacterianas patogênicas, a *Listeria monocytogenes*, a *Escherichia coli* e a *Salmonella* Enteritidis. Os resultados obtidos indicaram que os óleos, em combinação e isoladamente, reduziram as contagens das três espécies bacterianas após 24 h. O mesmo foi observado quando os pesquisadores contaminaram vegetais folhosos com as

bactérias em estudo, conseguindo inibir também os micro-organismos anteriormente presentes nos vegetais, como bactérias mesófilas, enterobactérias e fungos.

Gündüz; Gönül; Karapinar (2010) evidenciaram que alfaces lavadas com uma solução contendo 75 ppm de óleo essencial de orégano apresentou eficácia similar à do alimento lavado com solução de cloro a 50 ppm, na inibição de *Salmonella* Typhimurium. Em estudo similar, conduzido por Moore-Neibel et al. (2013), o óleo essencial de orégano foi empregado em concentrações de 0,1; 0,3 e 0,5 % na lavagem de vegetais folhosos (duas variedades de alface, espinafre madura e espinafre *baby*) contaminados com *Salmonella* Newport, evidenciando que o efeito antibacteriano de todas as soluções de óleo essencial aumentava com o incremento do tempo de lavagem dos vegetais.

Ait-Ouazzou et al. (2013), em estudo sobre o efeito combinado de tratamentos físicos e carvacrol na inativação de *E. coli* O157:H7 em sucos de maçã, manga, laranja e tomate, relataram os efeitos letais sobre a bactéria quando empregado calor brando (54 e 60° C) ou campo elétrico pulsado (30 kV.cm<sup>-1</sup>) em combinação com 1,3 mM de carvacrol.

Em avaliação da eficácia da aplicação dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), isoladamente e em combinação, para inibir *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, *in vitro* e em uvas de mesa (*Vitis labrusca* L.), Souza et al. (2013) obtiveram resultados de inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos dos fungos testados e da microbiota autóctone das uvas contaminadas artificialmente, armazenadas em temperatura ambiente (25° C) e sob refrigeração (12° C). Além disso, os autores relataram que foram preservadas as características físico-químicas e os atributos sensoriais das uvas ao longo do tempo de armazenamento (12 e 24 dias), indicando o potencial da combinação dos óleos de orégano e alecrim em concentrações sub-letais para controlar o desenvolvimento de fungos patogênicos de frutas em uvas de mesa.

#### 2.4.1.3 Mecanismos de ação antimicrobiana

O largo espectro antimicrobiano dos óleos tem sido evidenciado há alguns anos, porém o mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado.

Diversos mecanismos foram propostos para explicar a ação dos compostos químicos presentes nos óleos essenciais (BURT, 2004), visto que a ação antimicrobiana não pode ser atribuída a somente um dos compostos presentes nos óleos (BAJPAI, BAEK; KANG, 2012). Porém, em decorrência de seus estudos, diversos pesquisadores sugerem que os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais são consequência de danos estruturais e funcionais na membrana celular bacteriana (TAJKARIMI ; IBRAHIM; CLIVER, 2010; BAJPAI, BAEK; KANG, 2012).

A estereoquímica e a lipofilicidade, entre outros fatores, podem ser afetados positiva ou negativamente pela ação biológica dos compostos (VELURI et al., 2004). A perda de constituintes celulares, pelo aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática também foi documentada (BURT, 2004; SILVA, J. et al., 2010), assim como a formação de peróxidos em decorrência da oxigenação de ácidos graxos insaturados e a habilidade de redução do pH no interior das células bacterianas (TAJKARIMI ; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Sabe-se que os compostos fenólicos presentes em alguns óleos essenciais são hidrofóbicos e o seu sítio de ação é a membrana celular. Esses compostos se acumulam na bicamada lipídica causando desarranjo na função e na estrutura da membrana, penetrando na célula bacteriana e exercendo a atividade inibitória no citoplasma celular, por meio de lise e de liberação do conteúdo intracelular (BURT, 2004; HOLLEY; PATEL, 2005; ARQUES et al., 2008; McMEEKIN et al., 2010; TAJKARIMI ; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Embora a perda de determinadas quantias do conteúdo intracelular possa ser tolerada sem a perda da viabilidade, a extensa perda de moléculas e íons pode levar à morte celular (DENYER; HUGO, 1991). A obstrução na permeabilidade da membrana citoplasmática é outro fator que pode acarretar o perecimento celular, de acordo com Li et al. (2011).

Alguns autores sugerem que a membrana ao redor da parede celular de bactérias Gram-negativas pode restringir a difusão de compostos hidrofóbicos devido à cobertura de lipopolissacarídeos presentes (DAVIDSON; BRANEN, 2005 *apud* GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009; CALO et al., 2015). Porém, isso não significa que as bactérias Gram-positivas sejam sempre mais susceptíveis (BURT, 2004). Bactérias Gram-negativas são geralmente mais resistentes aos metabólitos antimicrobianos de plantas e, muitas vezes, não são inibidos por eles (TAJKARIMI ; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Em se tratando de óleos essenciais, a presença do grupo hidroxila em compostos fenólicos como o carvacrol e o timol é de suma importância para a atividade antimicrobiana. Existem indícios de que os óleos essenciais atuem em enzimas envolvidas na regulação energética (VIUDA-MARTOS et al., 2008) ou na síntese de compostos estruturais celulares. Além disso, a atuação em compostos proteicos também foi relatada (BURT, 2004).

#### **2.4.2 Atividade antioxidante**

De acordo com Velioglu et al. (1998), antioxidantes são compostos capazes de inibir ou retardar a oxidação de lipídeos ou de outras moléculas por meio da inibição das etapas de iniciação ou de propagação das reações oxidativas. Nos alimentos, a oxidação lipídica é deletéria, influenciando na composição química do alimento e em características sensoriais capazes de torná-lo desagradável ou inaceitável para o consumo. Além disso, compostos nocivos podem ser formados e ácidos graxos essenciais e vitaminas podem ser degradados (EMBUSCADO, 2015).

A fim de evitar os possíveis efeitos tóxicos advindos do uso de alguns antioxidantes sintéticos em óleos, gorduras e demais produtos em que são empregados (LIM et al., 2011; HUSSAIN et al., 2013), visando a estabilidade oxidativa desses produtos e a demanda por produtos com teores reduzidos de aditivos químicos, os pesquisadores cada vez mais focam seus estudos no emprego de substâncias naturais, como os óleos essenciais, que exercem propriedades antioxidantes (EMBUSCADO, 2015).

Dentre os compostos naturais que possuem propriedades antioxidantes destacam-se as especiarias. Sabe-se que o efeito antioxidante de várias plantas é atribuído principalmente aos compostos fenólicos, dentre os quais encontram-se os flavonóides, os ácidos fenólicos e os terpenos fenólicos, que possuem a capacidade de sequestrar radicais livres, doar átomos de hidrogênio ou elétrons e quelar íons metálicos (PIETTA; SIMONETTI; MAURI, 1998; SRIVASTAVA; VANKAR, 2012; EMBUSCADO, 2015).

De acordo com Brewer (2011), os principais antioxidantes fenólicos de plantas podem ser divididos em quatro grupos: os ácidos fenólicos (ácidos gálico, caféico e rosmarínico), os diterpenos fenólicos (carnasol e ácido carnósico), os flavonóides

(catequina e quercetina) e os óleos voláteis (eugenol, carvacrol, timol, mentol, entre outros).

Diversos métodos podem ser empregados para avaliar a atividade antioxidante de substâncias naturais, sendo os mais frequentes DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), entre outros (KIRKA; ARSLAN, 2008; EMBUSCADO, 2015).

Extratos de ervas da família *Lamiaceae* (manjerona, orégano, sálvia, alecrim, tomilho e manjericão) possuem elevado conteúdo fenólico total (CHEN; SUI; HO, 1992). Segundo Dilas et al. (2012), o alecrim possui atividade antioxidante quando empregado em salsichas (EL-ALIM et al., 1999), em carne de porco cozida e armazenada sob refrigeração (HUISMAN et al., 1994) e em maionese enriquecida com óleo de peixe (SORENSEN; NIELSEN; JACOBSEN, 2010). Além disso, estudos *in vivo* relataram que a suplementação da dieta de peru (BOTSOGLOU et al., 2007) e de galinhas poedeiras (FLOROU-PANERI et al., 2006) com alecrim promoveu a melhora da estabilidade oxidativa da carne de peru e dos ovos de galinha. Zhang et al. (2010) relataram que a atividade antioxidante de extratos de alecrim está diretamente relacionada com a presença do ácido carnósico na erva.

O óleo essencial de manjerona possui quantidades significativas de ácido rosmarínico e carnosol, o que confere ao óleo o poder de inibir os radicais hidroxila (OH). Estudo sugere que extratos de sálvia possuem a habilidade de inibir radicais livres; dentre os compostos encontrados na especiaria, merecem destaque alguns dos relatados para o óleo essencial de alecrim, como o carnosol, o rosmanol e o rosmadial (BREWER, 2011).

Os monoterpenos fenólicos do tomilho, timol e carvacrol são os principais compostos que contribuem para o aroma característico de seu óleo essencial. Eles são responsáveis, também, pela inibição da peroxidação lipídica (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNY, 2006). O óleo essencial de tomilho exibe eficácia na inibição da ação dos radicais livres e da oxidação lipídica induzidas pelo  $Fe^{+2}$ /ascorbato e  $Fe^{+2}/H_2O_2$  (BOZIN et al., 2006).

A canela (*Cinnamomum zeylanicum*) possui uma série de componentes antioxidantes, incluindo os ácidos vanílico, caféico, gálico, *p*-cumárico, *p*-hidróxibenzóico, ferúlico e *p*-hidroxibenzaldeído (MUCHUWETI et al., 2007). O

principal componente do óleo essencial da folha de canela é o eugenol, com efeito inibitório significativo sobre radicais hidroxila, atuando também como quelante de metais, inibindo a formação de dienos conjugados e a geração de compostos secundários provenientes da peroxidação lipídica (BREWER, 2011).

Compostos fenólicos também estão presentes em elevadas concentrações em extratos de orégano (*Origanum vulgare* L.), sejam eles aquosos, etanólicos ou metanólicos. Destacam-se o ácido rosmarínico, bem como os ácidos fenólicos carboxílicos e glicosídeos (BREWER, 2011).

A atividade antioxidante das especiarias varia de acordo com o local em que a planta foi cultivada e do substrato utilizado na metodologia de avaliação (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNY, 2006). Existem relatos que os antioxidantes mais polares são mais ativos em lipídeos puros, ao passo que os não-polares são mais ativos em substratos polares. Trata-se do paradoxo polar (FRANKEL et al., 1996), que surge para explicar, ao menos em parte, a variação da atividade antioxidante para diferentes ervas e especiarias em alimentos distintos.

Os efeitos dos antioxidantes naturais sobre os lipídios foram extensivamente estudados nos últimos anos, sendo os mecanismos de atuação dessas substâncias relacionados ao tipo de emulsão formada, efeitos antagônicos e sinérgicos, temperatura, concentração, a tendência de o sistema ser hidrofílico ou lipofílico e o número e local da ligação do grupo hidroxila (BAKKALI et al., 2008).

Pesquisas indicam que os antioxidantes presentes nos óleos essenciais são benéficos à saúde humana, baseado no fato de que muitas doenças ocorrem devido à sobrecarga de reações oxidativas decorrentes do consumo excessivo de carne, açúcar e gordura. Os antioxidantes possuem ação antimutagênica (CLARK, 2002) e anticarcinogênica, eliminando os radicais livres (COLLINS, 2005). Porém, esses efeitos dependem da concentração dos compostos antioxidantes naturais (SAKAGAMI; OI; SATOH, 1999). Existe relato de que concentrações elevadas de alguns polifenóis podem induzir a danos no DNA celular, o que suscita o emprego dos antioxidantes naturais em concentrações não muito elevadas (FAN; LOU, 2004).

## 2.5 Aspectos legais do uso de óleos essenciais

Os óleos essenciais são categorizados como seguros ou GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela *US Food and Drug Administration* – FDA (BENAVIDES; VILLALOBOS-CARVAJAL; REYES, 2012). Porém, existem algumas limitações sobre a dose diária aceitável de consumo (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015). De acordo com Burt (2004), diversos óleos essenciais e seus compostos voláteis são comercializados como aromatizantes com uso geralmente permitido na União Européia, sendo também utilizados nos EUA. Os óleos essenciais podem ser designados legalmente como “novos aditivos”, desde que sejam empregados em alimentos com propósitos que não os sensoriais.

A Comunidade Européia produz constantemente recomendações e leis para o emprego de OE, visando manter a qualidade dos alimentos que podem facilmente ser deteriorados por bactérias patogênicas. Nos EUA, no Japão e na Austrália, o emprego de OE em embalagens ativas é permitido (DAINELLI et al., 2008, *apud* LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015). Na Europa, porém, uma lista dos ingredientes permitidos para serem empregados em embalagens ativas ainda encontra-se em estudo devido à necessidade de dados toxicológicos (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015). Existe, portanto, a necessidade de estudos toxicológicos mais detalhados sobre o emprego de OE em alimentos, visando garantir a segurança desses produtos (BURT, 2004; BAJPAI; BAEK; KANG, 2012; LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015).

### 3 Micro-organismos

#### 3.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* capaz de fermentar a lactose com produção de gás, tanto em temperaturas de 35 °C quanto naquelas situadas na faixa de 44,5 a 45,5 °C; deste modo, a espécie enquadra-se tanto no grupo dos coliformes a 35 °C quanto dos coliformes a 45 °C (SILVA, N. et al., 2010). Trata-se de uma bactéria bacilar, não esporulada, sendo classificada como Gram-negativa. É um micro-organismo mesófilo típico, que cresce em temperaturas desde 7 a 10 °C até 50 °C. Sua atividade de água ( $A_w$ ) mínima de crescimento é 0,95 (ADAMS; MOSS, 1997).

Existem evidências de que em 1700 a *E. coli* havia sido reconhecida como causadora de diarreia infantil. A espécie bacteriana foi reconhecida como patógeno de origem alimentar em 1971, nos EUA, embora surtos de origem alimentar tenham sido registrados na Europa no ano de 1947 e associados à *E. coli* (JAY, 2005).

De acordo com Newell et al. (2010), as linhagens de *E. coli* causadoras de doenças intestinais podem ser agrupadas em, pelo menos, seis grupos com base nas características de virulência específica e traços fenotípicos. Dentre esses grupos, encontram-se as *E. coli* enteroagregativas (EaggEC ou EAEC), as *E. coli* de aderência difusa (DAEC), as *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), as *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), as *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) e as *E. coli* Shiga toxigênica (STEC). Surtos alimentares são particularmente associados com cepas STEC e, em menor grau, com linhagens EPEC, ETEC e EaggEC.

Nos últimos anos, a *E. coli* O157 tornou-se uma ameaça à saúde em todo o mundo, causando, de acordo com dados de Scallan et al. (2011) *apud* Liu et al. (2015), em média 63 mil casos da doença, 2000 hospitalizações e 20 óbitos por ano nos EUA. Os casos da doença, quando originadas de cepas de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), são superiores a 17 mil por ano e, para as cepas *E. coli* Shiga toxigênicas que não são classificadas como O157 (STEC), os casos ultrapassam a média de 112 mil por ano (SCALLAN et al., 2011). Na União Européia, por sua vez, no ano de 2012 foram confirmados mais de 5 mil casos de infecções por *E. coli* verotoxigênica (DONATO et al., 2015).

De um modo geral, linhagens distintas de *E. coli* podem ocorrer em carnes e seus produtos, leites e derivados, frutos do mar, água, vegetais, hortaliças e alimentos prontos para o consumo (JAY, 2005). É de extrema importância, portanto, a adoção de medidas eficazes para prevenir a incidência deste patógeno em alimentos, por meio do preparo e manipulação em condições higiênico-sanitárias adequadas, refrigeração ou cocção dos alimentos em temperaturas que evitem a proliferação microbiana e o emprego de substâncias que possam controlar o desenvolvimento da espécie bacteriana.

### **3.2 *Staphylococcus aureus***

O gênero *Staphylococcus* inclui mais de 30 espécies, sendo algumas delas com ocorrência em alimentos, dentre as quais destaca-se o *S. aureus* (JAY, 2005). *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, catalase positivos, causadores de diversas doenças em humanos, incluindo gastriterites. De acordo com Barros et al. (2009), *S. aureus* encontra-se entre as quatro causas mais comuns de doenças de origem alimentar.

O primeiro estudo de uma doença de origem alimentar estafilocócica ocorreu em 1894 e, em 1914, um pesquisador conseguiu reproduzir em si mesmo os efeitos e sintomas da doença por meio do consumo de leite inoculado com uma cultura de *S. aureus*. A gastriterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contenham uma ou mais toxinas, as quais são produzidas somente por algumas espécies e linhagens de estafilococos (JAY, 2005). Essas toxinas são pré-formadas no alimento pela cepa enterotoxigênica e a intoxicação causada por *S. aureus* depende da habilidade da cepa em sobreviver e se multiplicar em diferentes condições, e produzir diversos compostos extracelulares (BARROS et al., 2009).

É comum a presença de estafilococos, ainda que em pequenas quantidades, em quase todos os alimentos de origem animal ou naqueles que foram manipulados, como os vegetais minimamente processados, a não ser que algum tratamento térmico tenha sido aplicado para destruir esses micro-organismos (JAY, 2005; EL-HADEDY; EL-NOUR, 2012). Sabe-se que a manipulação humana dos produtos alimentares, além da infecção/colonização do gado ou dos trabalhadores das propriedades rurais constituem importantes fontes para a contaminação dos

alimentos com *S. aureus* (CRAGO et al., 2012). De acordo com Scallan et al. (2011), nos EUA ocorrem por ano, em média, mais de 240 mil casos de doença estafilocócica veiculada por alimentos, com aproximadamente 1000 hospitalizações e 6 óbitos.

Uma característica importante a respeito dos estafilococos é a sua habilidade em adquirir resistência a praticamente todos os antimicrobianos em uso, o que demanda uma atenção constante em termos de saúde pública (BARROS et al., 2009). Na última década, no Canadá e nos EUA, as taxas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) têm aumentado. Embora associado a infecções hospitalares, o isolamento de *S. aureus* MRSA foi documentado em retalhos de carnes de porco e bovina, leite e queijos bovinos (CRAGO et al., 2012).

## REFERÊNCIAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1997.

AIT-OUAZZOU, A. et al. Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in apple, mango, orange and tomato juices. **Food Control**, v. 32, n. 4, p. 159-167, 2013.

ALVARENGA, A. L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.

ALVES, E. G. A. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ANGIONI, A. et al. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4364-4370, 2006.

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

ARQUES, J. L. et al. Inactivation of gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. **European Food Research and Technology**, v. 227, n.1, p. 77-82, 2008.

BAJPAI, V. K.; BAEK, W.-H; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734, 2012.

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

BARBOSA, I. M. et al. Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables. **Food Control**, v. 59, p. 468-477, 2016.

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. **Food Science and Technology - LWT**, v. 42, p. 1139-1143, 2009.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493, 1966.

BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J. E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and

oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 232-239, 2012.

BONFANTI, C. et al. Emerging cultivation of oregano in Sicily: sensory evaluation of plants and chemical composition of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 160-165, 2012.

BOTSOGLOU, N. A. et al. The incorporation of dehydrated rosemary leaves in the rations of turkeys and their impact on the oxidative stability of the produced raw and cooked meat. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 58, p. 312-320, 2007.

BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1822-1828, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC ANVISA nº 276, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 22 set. 2005. Seção 1.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 221-247, 2011.

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

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CASSEL, E. et al. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 171-176, 2009.

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

CATTELAN, M. G. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias em alimentos**. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2012.

CATTELAN, M. G. et al. Antibacterial activity of oregano essential oil against foodborne pathogens. **Nutrition & Food Science**, v. 43, n. 2, p. 169-174, 2013.

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

CHEN, Q.; SUI, H.; HO, C. T. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 69, p. 999-1002, 1992.

CHOULIARA, E. et al. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4° C. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 607-617, 2007.

CLARK, S. F. The biochemistry of antioxidants revisited. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 17, p. 5-17, 2002.

COLLINS, A. R. Antioxidant intervention as a route to câncer prevention. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1923-1930, 2005.

CRAGO, B. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. **Food Microbiology**, v. 32, p. 202-205, 2012.

DAINELLI, D. et al. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19 (S1), p. S103-S112, 2008.

DAS, M.; RATH, C. C.; MOHAPATRA, U. B. Bacteriology of a most popular street food (Panipuri) and inhibitory effect of essential oils on bacterial growth. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 5, p. 564-571, 2011.

DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. Food antimicrobials – an introduction. **Antimicrobial in Food**. CRC Press, p. 1-9, 2005.

DE FALCO, E. et al. Growth, essential oil characterization, and antimicrobial activity of three wild biotypes of oregano under cultivation condition in Southern Italy. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 242-249, 2014.

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

DELGADO, B. et al. Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distribution. **Food Microbiology**, v. 21, 327-334, 2004.

DENYER, S. P.; HUGO, W. B. **Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane**. In: Denyer, S.P., Hugo, W.B. (Eds.), Mechanisms of Action of Chemical Biocides. Oxford: Oxford Blackwell Scientific Publication, p. 171-188, 1991.

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

DILAS, S. et al. *In vitro* antioxidant and antiproliferative activity of three rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract formulations. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 2052-2062, 2012.

DONATO, R. et al. Antibacterial activity of Tuscan *Artemisia annua* essential oil and its major components against some foodborne pathogens. **Food Science and Technology - LWT**, v. 64, p. 1251-1254, 2015.

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

DUSSAULT, D.; VU, K. D.; LACROIX, M. *In vitro* evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. **Meat Science**, v. 96, p. 514-520, 2014.

EL-ALIM, S. et al. Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 277-285, 1999.

EL-HADEDY, D.; EL-NOUR, S. A. Identification of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from Egyptian food by conventional and molecular methods. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 129-135, 2012.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods** (2015), doi: 0.1016/j.jff.2015.03.005.

FAN, P.; LOU, H. Effects of polyphenols from grape seeds on oxidative damage to cellular DNA. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 267, p. 67-74, 2004.

FAZIO, M. L. S.; GONÇALVES, T. M. V.; HOFFMANN, F. L. Determinação da atividade antibacteriana de romã (*Punica granatum* L.). **Higiene Alimentar**, v. 23, n. 168/169, p. 54-56, 2009.

FERREIRA, J. P. et al. Effects of the components of two antimicrobial emulsions on food-borne pathogens. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 227-230, 2010.

FILLY, A. et al. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: From laboratory to pilot and industrial scale. **Food Chemistry**, v. 150, p. 193-198, 2014.

FIROUZI, R. A. et al. Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 2626-2630, 2007.

FISCHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 156-164, 2008.

FLOROU-PANERI, P. et al. Effect of feeding rosemary and  $\alpha$ -tocopheryl acetate on hen performance and egg quality. **The Journal of Poultry Science**, v. 43, p. 143-149, 2006.

FRANGOS, L. et al. Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. **Food Microbiology**, v. 27, p. 115-121, 2010.

FRANKEL, E. N. et al. Antioxidant activity of rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 131-135, 1996.

FREEDMAN, P. Health, wellness and the allure of spices in the Middle Ages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, p. 47-53, 2015.

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

GLASS, K. A.; JOHNSON, E. A. Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acids. **Food Microbiology**, v. 21, p. 675-682, 2004.

GOVARIS, A. et al. Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese package under modified atmosphere. **Food Science and Technology - LWT**, v. 44, p. 1240-1244, 2011.

GÜNDÜZ, G. T.; GÖNÜL, S. A.; KARAPINAR, M. Efficacy of oregano oil in the inactivation of *Salmonella* Typhimurium on lettuce. **Food Control**, v. 21, p. 513-517, 2010.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 142-150, 2009.

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

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

HUISMAN, M. et al. The combined effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and modified atmosphere packaging as protection against warmed over flavour in cooked minced meat. **Food Science and Technology - LWT**, v. 198, p. 57-59, 1994.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two. **Food Science and Technology**, v. 50, p. 185-192, 2013.

IVANOVIC, J. et al. *In vitro* control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. **Food Control**, v. 25, p. 110-116, 2012.

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

KIRKA, Y.; ARSLAN, E. Antioxidant capacity and total phenolic content of selected plants from Turkey. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 2038-2046, 2008.

LI, M. et al. Use of natural antimicrobials from a food safety perspective for control of *Staphylococcus aureus*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, p. 1240-1254, 2011.

LIM, H. S. et al. Quality and antioxidant properties of bread containing turmeric (*Curcuma longa L.*) cultivated in South Korea. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1577-1582, 2011.

LIU, H. et al. Control of *Escherichia coli* O157 on beef at 37, 22 and 4° C by T5-, T1-, T4- and O1- like bacteriophages. **Food Microbiology**, v. 51, p. 69-73, 2015.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. et al. *In vitro* toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 81, p. 9-27, 2015.

LUCCHESI, M. E.; CHEMAT, F.; SMADJA, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. **Journal of Chromatography A**, v. 1043, p. 323-327, 2004.

MASANGO, P. Cleaner production of essential oils by steam distillation. **Journal of Cleaner Production**, v. 13, p. 833-839, 2005.

MASOTTI, V. et al. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7115-7121, 2003.

McMEEKIN, et al. Ecophysiology of food-borne pathogens: Essential knowledge to improve food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S64-S78, 2010.

MENDES, J. E. F. **Especiarias**. Instituto de Investigação Científica e Tropical. Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia. 200 p. 1993.

MILLER, J. I. **The spice trade of the Roman Empire: 29 B.C. to A.D. 641**. Oxford: Clarendon Press, 1969.

MOORE-NEIBEL, K. et al. Antibacterial activity of oregano oil against antibiotic-resistant *Salmonella enterica* on organic leafy greens at varying exposure times and storage temperatures. **Food Microbiology**, v. 34, p. 123-129, 2013.

MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 565-570, 2005.

MUCHUWETI, M. et al. Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. **American Journal of Food Technology**, v. 2, p. 414-420, 2007.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S3-S15, 2010.

NYCHAS, G. J. E. Natural antimicrobials from plants. In G. W. Gould (Ed.). **New methods of food preservation**. London: Blackie Academic and Professional, 1995.

OLIVEIRA, H. et al. Bacteriophage endolysins as a response to emerging foodborne pathogens. **Trends in Food Science & Technology**, v. 28, p. 103-115, 2012.

OURIVES, E. A. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana de condimentos vegetais (ervas aromáticas) em meio de cultura e peito de frango picado frente a *P. fluorescens***. 1997. 180 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997.

ÖZKAN, G. et al. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from *Salvia pisidica*. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 186-190, 2010.

PESAVENTO, G. et al. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v. 54, p. 188-199, 2015.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4487-4490, 1998.

PINGRET, D.; FABIANO-TIXER, A.-S.; CHEMAT, F. An improved ultrasound Clevenger extraction of essential oils. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 9-12, 2014.

PINTORE, G. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 15-19, 2002.

PIRBALOUTI, A. G. et al. Bioactivity of Iranian medicinal plants against *Yersinia enterocolitica*. **Nutrition & Food Science**, v. 40 n. 5, p. 515-522, 2010.

PIRES, A. C. S. et al. Increased preservation of sliced mozzarella cheese by antimicrobial sachet incorporated with allyl isothiocyanate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1002-1008, 2009.

PIRES, C. et al. Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 224-231, 2013.

PREUSS, H. et al. Effects of essential oils and monolaurin on *Staphylococcus aureus*: *in vitro* and *in vivo* studies. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 15, p. 279-285, 2005.

RAGHAVAN, S. **Handbook of spices, seasonings, and flavorings**. Boca Raton: CRC Press, 2007.

ROTA, M. C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v. 19, p. 681-687, 2008.

SAKAGAMI, H.; OI, T.; SATOH, K. Prevention of oral diseases by polyphenols (Review). **In vivo**, v. 13, p. 155-172, 1999.

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**, v.37, n.3, p. 803-808, 2007.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 7-15, 2011.

SENHAJI, O.; FAID, M.; KALALOU, I. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by Essential Oil from *Cinnamomum zeylanicum*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 234-236, 2007.

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, v. 39, p. 639-644, 2006.

SHEKARFOROUSH, S. S.; FIROUZI, R.; KAFSHDOZAN, K. Antimicrobial activities of oregano and nutmeg essential oils combined with emulsifier/stabilizer compound in ready-to-cook barbecued chicken. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 15, n. 2, p. 159-163, 2014.

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**, v. 49, p. 737-740, 1984.

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**, v. 30, n. 1, p. 136-141, 2010. Suplemento.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo: Varela, 2010.

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

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

SORENSEN, A. D. M.; NIELSEN, N.S.; JACOBSEN, C. Oxidative stability of fish oil-enriched mayonnaise-based salads. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, 476-487, 2010.

SOUZA, L. L. et al. Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic Aspergilli and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, p. 312-318, 2013.

SRIVASTAVA, J.; VANKAR, P. S. Principal phenolic phytochemicals and Antioxidant property in Eucalyptus bark. **Nutrition & Food Science**, v. 42, p. 412-421, 2012.

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

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidante properties of comercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 587-595, 2013.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

USHIMARU, P. I. et al.. Antibacterial activity of medical plant extracts. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 717-719, 2007.

VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VAN DER VEEN, M.; MORALES, J. The Roman and Islamic spice traded: new archaeological evidende. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, p. 54-63, 2015.

VELIOGLU, Y. S. et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

VELURI, R. et al. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1077-1082, 2004.

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

WEERAKKODY, N. S. et al. *In vitro* antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. **Food Control**, v. 21, p. 1408-1414, 2010.

WU, M. t al. An ethnobotanical survey of medicinal spices used in Chinese hotpot. **Food Research International**, v. 48, p. 226-232, 2012.

YANISHLIEVA, N. Y.; MARINOVA, E.; POKORNY, B. J. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, p. 776-793, 2006.

YUSTE, J.; FUNG, D. Y. C. Evaluation of *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* counts in apple juice with cinnamon, by conventional media and thin agar layer method. **Food Microbiology**, v. 20, p. 365-370, 2003.

ZHANG, Y. et al. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. **Food Chemistry**, v. 118, p. 656-662, 2010.

# ***Capítulo 2***

---

*Óleo essencial de orégano: efeito na aceitação sensorial*

## RESUMO

Esta pesquisa visou avaliar a aceitação sensorial de condimentos formulados com diferentes quantidades de óleo essencial de orégano (OEO) e sal (NaCl), apresentando como um ponto de partida para o uso especiarias como um conservante natural em alimentos. Os condimentos contendo OEO foram avaliados em relação aos seguintes atributos sensoriais: aparência, aroma, textura, sabor e aceitação global. Cinco formulações foram desenvolvidas com variação dos níveis de OEO e cloreto de sódio através de um delineamento fatorial  $2^2$  com existência de um ponto central. A escala hedônica de nove pontos foi utilizada para avaliação da aceitação sensorial, além da análise da intenção de compra por uma escala de cinco pontos estruturada. Não houve diferença estatística significativa na aceitação das amostras ( $P > 0,05$ ). A análise de agrupamento mostrou que a formulação com quantidades intermediárias de sal e OEO foi a preferida pelos julgadores. As formulações de condimento com baixos teores de sal, independentemente da quantidade OEO, apresentaram maior intenção de compra. Devido ao interesse crescente no uso de conservantes naturais para substituir aditivos químicos, este estudo fornece um ponto de partida para novas investigações relacionadas à aceitação sensorial de OEO nos alimentos, sugerindo um emprego promissor do óleo essencial.

Palavras-chave: Orégano. Óleo essencial. Avaliação sensorial. Especiaria. Escalonamento multidimensional

## ABSTRACT

*This research aimed to evaluate sensory acceptability of salad dressing formulated with different quantities of oregano essential oil (OEO) and salt as a starting point for the use of the spice as a natural preservative in food. Sensory assessment of salad dressing with OEO was evaluated in relation to the following attributes: appearance, aroma, consistence, flavour and overall acceptability. Five formulations were developed with variation in the levels of OEO and sodium chloride through a 2<sup>2</sup> factorial design with a central point. A nine point hedonic scale was employed, besides purchase intent by a structured five point scale. There was no significant difference in the acceptance of the samples ( $P > 0.05$ ). Cluster analysis showed that formulation with intermediate quantities of salt and OEO was preferred by the consumers. Oregano essential oil salad dressings with low salt content, regardless of OEO amount, presented higher intention to purchase. Finding the balance between pleasant flavour and significant reduction of the use of salt in foods for dietary reasons is a complex challenge. Furthermore, studies need to be performed concerning interaction between amounts of essential oils and salt. Due to an increasing interest in the use of natural preservatives to replace chemical additives, this study provided a starting-point for further investigations concerning sensory acceptability of OEO in food.*

*Keywords: Oregano. Essential oil. Sensory evaluation. Spice. Multidimensional scaling*

## 1 Introdução

Devido à crescente demanda mundial por alimentos saudáveis e de qualidade, agências governamentais de vários países são levadas a adotar medidas legislativas cada vez mais eficazes relacionadas à segurança dos alimentos. Conseqüentemente, há um interesse em pesquisas que visam alternativas ao emprego de aditivos químicos para uso racional como conservantes de alimentos (IVANOVIC et al., 2012). O emprego de especiarias mostra como foco principal o consumo de alimentos na sua forma mais natural (BURT, 2004; VIUDA-MARTOS et al., 2010; CATTELAN, 2012; CATTELAN et al., 2013), devido a um questionamento incessante sobre a segurança do uso de aditivos químicos e redução das concentrações de cloreto de sódio nos alimentos por razões dietéticas, o que tende a aumentar o uso de outros aromatizantes (WHO, 2002; BURT, 2004).

Óleos essenciais e extratos naturais de plantas são empregados para estender a vida útil e melhorar a estabilidade lipídica dos alimentos (MOHAMED; MANSOUR, 2012). Além disso, algumas plantas, seus extratos, óleos essenciais e/ou ingredientes ativos possuem atividade antimicrobiana bem documentada (ÖZCAN; ERKMEN, 2001; USHIMARU et al., 2007; YOSSA et al., 2010; CASTILHO et al., 2012; CATTELAN et al., 2013). Entre os compostos com ações antibacteriana e antioxidante, os compostos fenólicos merecem destaque. De acordo com Bonfanti et al. (2012), o gênero *Origanum* é difundido na região do Mediterrâneo, com a utilização do orégano como tempero. Entre as 70 variedades da especiaria, *Origanum vulgare* L. possui grande relevância, sendo empregado como um tempero pela indústria, na produção de bebidas espirituosas e na área farmacológica. Há relatos de utilização do óleo essencial de orégano como um suplemento dietético para combater infecções e aliviar problemas digestivos e de pele (CHO et al., 2012). Os quatro principais componentes do óleo essencial de orégano em percentual de conteúdo são os compostos fenólicos carvacrol e timol, além dos hidrocarbonetos monoterpenos p-cimeno e terpineno (GOULAS; KONTOMINAS, 2007). Carvacrol é geralmente classificado como o principal componente do óleo essencial de orégano. É um composto fenólico hidrofóbico, com atividade antimicrobiana bem documentada contra bactérias e fungos (BURT, 2004; GUARDA et al., 2011), além de possuir atividade antioxidante (BASER, 2008) e apresentar um potencial elevado

para promover a extensão da vida-de-prateleira e a segurança dos produtos alimentares (RUBILAR et al., 2013).

Devido ao aroma intenso do orégano, uma opção é o uso de seu óleo essencial em matrizes de alimentos para proporcionar um equilíbrio entre a aceitação sensorial e as propriedades exercidas pela especiaria (AZEREDO et al., 2011; BONFANTI et al., 2012). Embora existam estudos que comprovem resultados extremamente importantes em relação à utilização de óleos essenciais com atividades antimicrobianas e antioxidantes, estudos sobre os efeitos combinados destes óleos e de sais em matrizes de alimentos são escassos (FRANGOS et al., 2010).

As investigações da ação de compostos bioativos de óleo essencial de orégano e sua interação com outros constituintes de alimentos devem ser efetuadas em produtos alimentícios com matrizes simples como condimentos preparados que, por sua vez, são emulsões de óleo em água que podem facilmente sofrer oxidação durante o processamento e ao longo do período de armazenamento (TSENG; ZHAO, 2013). Assim, é de primordial importância a utilização de especiarias para melhorar a estabilidade microbiológica, a fim de reduzir a utilização de aditivos químicos para a preservação de alimentos. Devido ao grande potencial do emprego de óleo essencial de orégano em matrizes de alimentos, o objetivo deste estudo foi o de avaliar a aceitação sensorial de condimentos preparados formulados com diferentes quantidades de óleo essencial de orégano e cloreto de sódio (sal).

## 2 Material e métodos

### 2.1 Matérias-primas

As matérias-primas empregadas nesta pesquisa foram adquiridas no mercado local de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Para a elaboração dos condimentos preparados de óleo essencial de orégano foram utilizados: óleo de soja (Vila Velha - Louis Dreyfus Commodities Brasil), extrato de soja integral em pó (Mãe Terra Produtos Naturais Ltda), leite em pó integral (Itambé Alimentos S/A), sal refinado – cloreto de sódio (Lebre - Norte Salineira S/A), óleo de orégano essencial (Laszlo Aromaterapia Ltda) e água mineral.

### 2.2 Processamento do condimento preparado de orégano

Óleo vegetal de soja (64,12 g), água mineral (30,53 g), leite em pó integral (3,8 g) e extrato de soja integral (1,55 g) foram constantemente agitados, com o auxílio de um misturador de baixa velocidade (Walita - RI 2044). O OEO e o cloreto de sódio (variáveis independentes) foram adicionados no final de cada mistura, para observar as variações destes ingredientes em cada formulação, tal como descrito no delineamento experimental ilustrado na Tabela 1, em um planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central. As variáveis dependentes para o modelo experimental foram os atributos da aceitação sensorial: aparência, aroma, textura, sabor e aceitação global do produto.

**Tabela 1** – Delineamento experimental com as variáveis codificadas e reais empregadas no desenvolvimento das formulações de condimento preparado de orégano

Formulação	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais <sup>a</sup>	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentração de Sal (%)	Concentração de OEO (%)
F1	-1	-1	1,14	0,2
F2	+1	-1	1,30	0,2
F3	0	0	1,22	0,3
F4	-1	+1	1,14	0,4
F5	+1	+1	1,30	0,4

<sup>a</sup> Percentagens de OEO e sal em relação a 100 g de mistura de água mineral, leite integral em pó, óleo vegetal de soja e extrato de soja integral em pó (peso.peso<sup>-1</sup>).

### 2.3 Avaliação sensorial

A análise da aceitação sensorial dos condimentos preparados de orégano foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, de São José do Rio Preto. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição, de acordo com a resolução CNS/196/96 (Parecer 42100, Anexo 1), e os julgadores manifestaram anuência ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexo 2) antes da realização do teste.

A análise sensorial foi conduzida com as cinco formulações do condimento preparado de orégano, de modo a avaliar a influência do OEO e do sal na aceitação sensorial. Os condimentos preparados de orégano foram avaliados por 60 julgadores não treinados que foram encaminhados para cabines individuais com luz branca e temperatura ambiente variando de 20 a 25 °C. O painel de julgadores foi composto por professores, estudantes de graduação e de pós-graduação e funcionários do Instituto. A intolerância dos julgadores a qualquer um dos produtos componentes da formulação do condimento constituiu critério de exclusão.

Quantidades referentes a uma colher (de chá) dos condimentos preparados de orégano foram servidas, separadamente, sobre torradas juntamente com um copo de 200 mL de água para limpeza do paladar. As amostras foram apresentadas aos julgadores de forma monádica, minimizando o efeito de comparação das amostras pelos julgadores, empregando um planejamento inteiramente casualizado com blocos completos, ou seja, todos os julgadores avaliaram a aceitação de todas as amostras preparadas. As amostras foram codificadas com três dígitos aleatórios e a apresentação aos julgadores foi feita de forma aleatorizada (MEILGAARD et al., 1999).

Inicialmente, os julgadores foram instruídos a responder um questionário de caracterização, indicando sexo, idade e frequência de consumo do produto (Anexo 3). Posteriormente, as cinco amostras de condimento preparado de orégano foram apresentadas aos julgadores e avaliadas segundo a aceitação concernente aos atributos aparência, aroma, textura, sabor e aceitação global utilizando uma escala estruturada de 9 pontos, variando de 1: desgostei extremamente, 5: nem gostei, nem desgostei a 9: gostei extremamente (MEILGAARD et al., 1999). O Anexo 4 contém os critérios da ficha sensorial aplicada para a avaliação da aceitação sensorial das

amostras. A intenção de compra das amostras também foi avaliada por meio de uma escala de 5 pontos, variando de 1: certamente não compraria, 3: tenho dúvida se compraria a 5: certamente compraria.

#### **2.4 Análise estatística**

A aceitação sensorial das amostras, em relação aos atributos aparência, aroma, textura, sabor e aceitação global, foi avaliada por meio de estatística descritiva e análise de variância. A intenção de compra foi analisada por meio de um gráfico de frequência. A possível correlação entre os atributos sensoriais de cada uma das formulações foi verificada empregando-se o teste de correlação de Pearson, considerando-se correlação forte coeficiente superior a 0,70 e P-valor menor ou igual a 0,05 (LEIGHTON; SCHONFELDT; KRUGER, 2010).

Além disso, os dados da aceitação sensorial foram avaliados por análise multivariada, aplicando análise de agrupamento, seguida de escalonamento multidimensional, com o objetivo de verificar a disposição dos julgadores em relação à aceitação das amostras do condimento preparado de orégano. O nível de significância de todos os testes estatísticos foi de 5 %. Empregou-se o software Statistica®, versão 7.0.61.0 (STATISTICA, 2004), para as análises estatísticas.

### 3 Resultados e discussão

O óleo essencial de orégano foi escolhido em detrimento a outros óleos essenciais em decorrência dos resultados positivos de um estudo prévio efetuado por Cattelan (2012), no qual foi observado o efeito antimicrobiano de distintos óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos, com destaque para o óleo essencial de orégano. Optou-se arbitrariamente por empregar no experimento um produto similar a um patê, sendo aqui referido como condimento preparado de orégano, conforme dispõe a legislação vigente (BRASIL, 2005). A formulação padrão do produto foi obtida em fase pré-experimental e resultou nas características sensoriais similares às de um condimento preparado com aceitação de consumo no Brasil. A partir da formulação padrão, foram elaborados outros condimentos preparados que diferiam entre si nas concentrações de OEO e de sal.

No que diz respeito ao consumo do produto, observou-se que a maioria dos julgadores consome condimentos preparados, pelo menos, duas vezes por semana (22,0 a 36,7 %), seguido por raramente (19,0 a 31,7 %), mensalmente (13,0 a 21,7 %), semanalmente (5,0 a 8,3 %) e diariamente (1,0 a 1,7 %).

As faixas médias de valores para os atributos avaliados sensorialmente foram as seguintes: 7,0 a 7,6 para a aparência, 6,1 a 6,4 para o aroma, 6,9 a 7,4 para textura, 5,6 a 6,2 para o sabor e 6,2 a 6,7 para aceitação global (Tabela 2). Todos os modelos matemáticos construídos para explicar os efeitos do óleo essencial de orégano e sal na aceitação sensorial mostraram falta de ajuste, provavelmente porque todos os atributos sensoriais dos condimentos preparados de orégano foram igualmente aceitos, bem como a aceitação global (Tabela 2). A mediana para a aceitação geral variou entre "gostei levemente" (6,0) e "gostei moderadamente" (7,0), semelhante aos resultados relatados por Azeredo et al. (2011) para a aceitação sensorial de vegetais higienizados com óleo essencial de orégano variando entre "gostei levemente" e "nem gostei nem desgostei" em uma escala hedônica.

Em todas as formulações foi possível encontrar correlações fortes ( $P \leq 0,05$ ) do atributo sabor com a aceitação global (F1:  $r = 0,91$ ; F2:  $r = 0,84$ ; F3:  $r = 0,87$ ; F4:  $r = 0,85$ ; F5:  $r = 0,83$ ), sugerindo que o sabor foi o atributo diretamente correlacionado com a aceitação global das amostras. Na amostra F4 foi possível verificar correlação

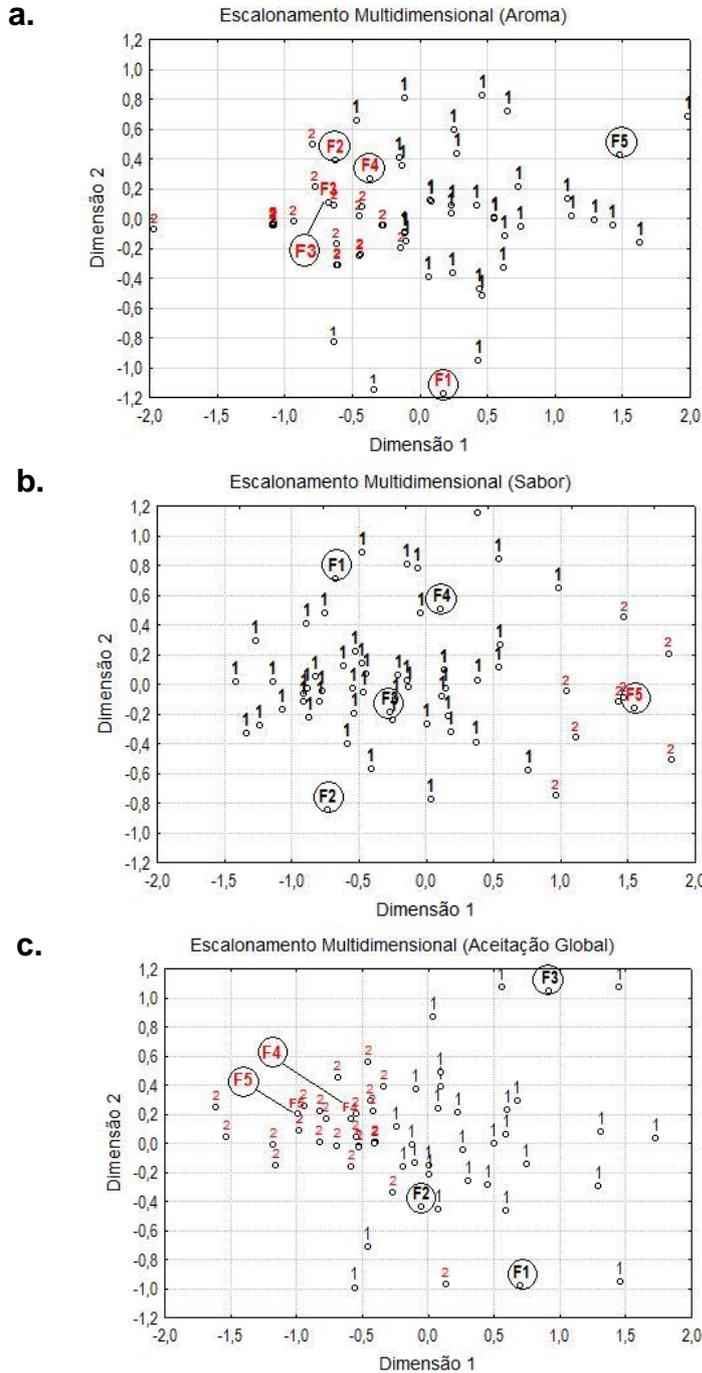
entre a aparência e a textura ( $r = 0,71$ ;  $P \leq 0,05$ ), sugerindo que a aparência exerceu alguma influência na aceitação da textura para a amostra em questão (Tabela 2).

**Tabela 2** – Aceitação sensorial das formulações de condimento preparado de orégano utilizadas neste experimento

Atributo Sensorial	Formulação <sup>1</sup>	Média (Desvio Padrão)	Mediana	Valor P da ANOVA
Aparência	F1	7,5 (0,9)	8,0	0,064
	F2	7,4 (1,2)	8,0	
	F3	7,6 (1,1)	8,0	
	F4	7,0 (1,3)	7,0	
	F5	7,1 (1,3)	7,0	
Aroma	F1	6,3 (1,2)	6,0	0,773
	F2	6,1 (1,2)	6,0	
	F3	6,2 (1,2)	6,0	
	F4	6,2 (1,2)	6,0	
	F5	6,4 (1,3)	6,0	
Textura	F1	7,3 (1,2)	7,0	0,321
	F2	7,2 (1,3)	7,0	
	F3	7,4 (1,2)	8,0	
	F4	6,9 (1,4)	7,0	
	F5	7,1 (1,3)	7,0	
Sabor	F1	6,2 (1,9)	7,0	0,275
	F2	5,7 (2,0)	6,0	
	F3	6,0 (1,7)	6,0	
	F4	6,2 (1,7)	7,0	
	F5	5,6 (2,2)	6,0	
Aceitação global	F1	6,7 (1,4)	7,0	0,321
	F2	6,3 (1,4)	6,0	
	F3	6,5 (1,4)	7,0	
	F4	6,5 (1,5)	7,0	
	F5	6,2 (1,5)	6,5	

<sup>1</sup> F1, F2, F3, F4 e F5: formulações de 1 a 5 correspondem a cada formulação do condimento preparado de OEO contendo distintas concentrações de OEO e sal. F1 = 1,14 % sal e 0,2 % de OEO; F2 = 1,30 % de sal e 0,2% de OEO; F3 = 1,22 % de sal e 0,3 % de OEO; F4 = 1,14 % de sal e 0,4 % de OEO; F5 = 1,30 % de sal e 0,4 % de OEO.

**Figura 1** – Distribuição dos julgadores no espaço multidimensional em relação aos atributos sensoriais do condimento preparado de orégano: (a) aroma, (b) sabor e (c) aceitação global



F1, F2, F3, F4 e F5: formulações de 1 a 5 correspondem a cada formulação do condimento preparado de OEO contendo concentrações distintas de OEO e sal. F1 = 1,14 % sal e 0,2 % de OEO; F2 = 1,30 % de sal e 0,2% de OEO; F3 = 1,22 % de sal e 0,3 % de OEO; F4 = 1, 14 % de sal e 0, 4 % de OEO; F5 = 1,30 % de sal e 0,4 % de OEO.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

A análise de agrupamento para a aceitação do aroma resultou em dois grupos, o primeiro com a formulação F5 (35 julgadores) e o segundo (25 julgadores) com as formulações F1, F2, F3 e F4 (Fig 1a). Amostras do mesmo grupo foram avaliadas de forma semelhante pelos julgadores. Os dois grupos formados alocaram os julgadores próximos ao valor nulo para ambas as dimensões estudadas. Deve notar-se que, apesar de o aroma acentuado do óleo essencial orégano, ele não foi considerado desagradável pelos julgadores. Isso também foi relatado por Viuda-Martos et al. (2010), ao comprovarem que a adição de óleos essenciais de orégano e de tomilho em salsichas bologna não desagradou os avaliadores no julgamento do atributo aroma.

A análise de agrupamento para o atributo sabor resultou em dois grupos: o primeiro constituído por F1, F2, F3 e F4 (50 julgadores), indicando uma maior preferência para estas formulações, e o segundo grupo formado pela amostra F5 (10 julgadores), formulação com maiores teores de sal e óleo essencial de orégano (Fig. 1b). Em um estudo sobre o uso de óleo essencial de orégano em ovas de bacalhau, Mexis; Chouliara; Kontominas (2009) observaram que a concentração de 0,1 % (v/p) de óleo essencial promoveu um sabor descrito como forte pelos julgadores.

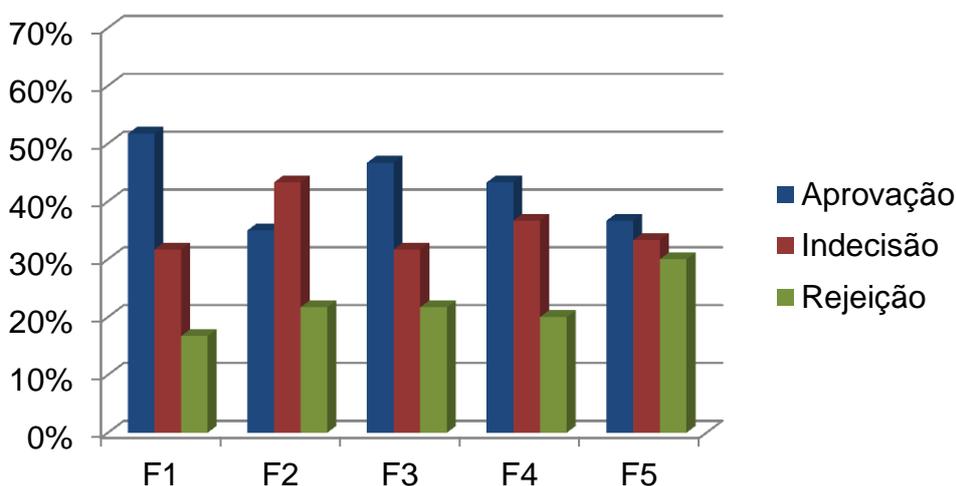
Em relação à aceitação global, foi possível verificar também a formação de dois grupos: um deles com as formulações F1, F2 e F3 (34 julgadores) e o outro constituído pelas formulações F4 e F5 (26 julgadores) (Fig. 1c), sendo a quantidade de julgadores próxima nos dois grupos.

As amostras F1, F3 e F4 apresentaram intenção de compra elevada, enquanto a F5 resultou em intenção oposta (Fig. 2). Isto sugere que as formulações de condimento preparado de orégano com menores concentrações de sal, independente do teor de óleo essencial de orégano, ocasionaram maior intenção de compra. A combinação de concentrações mais elevadas de óleo essencial de orégano e de sal (F5) foi aquela que propiciou a maior rejeição dos julgadores. Resultados semelhantes foram relatados por Azeredo et al. (2011), quando os julgadores foram questionados sobre a sua intenção de compra de produtos hortícolas tratados com óleos essenciais de orégano e alecrim, indicando resultados semelhantes entre a possível aquisição e a indecisão para a compra dos vegetais.

Olmedo e colaboradores (2013) relataram que os óleos essenciais representam uma nova oportunidade no processamento de alimentos, devido à rotulagem e a imagem de “produto natural”. Embora, os óleos essenciais possuam

algumas desvantagens, incluindo a interferência nas características sensoriais, ajustes na formulação de condimentos preparados de orégano são necessários, visando fornecer uma formulação mais equilibrada e um produto mais saboroso, quando o óleo essencial de orégano e o cloreto de sódio são combinados. Encontrar o equilíbrio entre o sabor agradável e a redução significativa da utilização de cloreto de sódio em alimentos por motivos dietéticos é um grande desafio. Além disso, tende a aumentar a utilização de outras substâncias que conferem sabor aos alimentos como óleos essenciais, que são geralmente reconhecidos como seguros pelo FDA - *US Food and Drug Administration* (RUBILAR et al., 2013).

**Figura 2** – Distribuição percentual da intenção de compra de amostras de condimento preparado de orégano



F1, F2, F3, F4 e F5: formulações de 1 a 5 correspondem a cada formulação do condimento preparado de orégano contendo distintas concentrações do óleo essencial de orégano (OEO) e sal. F1 = 1,14 % sal e 0,2 % de OEO; F2 = 1,30 % de sal e 0,2% de OEO; F3 = 1,22 % de sal e 0,3 % de OEO; F4 = 1,14 % de sal e 0,4 % de OEO; F5 = 1,30 % de sal e 0,4 % de OEO.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

#### **4 Conclusões**

As variações nas concentrações de óleo essencial de orégano e sal não produziram efeitos significativos na aceitação dos condimentos preparados de orégano. A análise de agrupamento mostrou que a formulação com quantidades intermediárias de sal e OEO foi a preferida pelos julgadores em relação aos atributos sensoriais sabor e avaliação global. As formulações de condimento com baixos teores de sal, independentemente da quantidade OEO, apresentaram maior intenção de compra. Encontrar o equilíbrio entre sabor agradável e redução significativa da utilização de cloreto de sódio em alimentos, por questões salutareas, constitui um grande desafio, que foi parcialmente atingido neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- AZEREDO, G. A. et al. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, p. 1541-1548, 2011.
- BASER, K. H. C. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 3106-3120, 2008.
- BONFANTI, C. et al. Emerging cultivation of oregano in Sicily: Sensory evaluation of plants and chemical composition of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 160-165, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. RDC ANVISA nº 276, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 22 set. 2005. Seção 1.
- BURT, S. Essential oils: Their antimicrobial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- CASTILHO, P. C. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, v. 23, p. 552-558, 2012.
- CATTELAN, M. G. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias em alimentos**. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, 2012.
- CATTELAN, M. G. et al. Antibacterial activity of oregano essential oil against foodborne pathogens. **Nutrition & Food Science**, v. 43, p. 169-174, 2013.
- CHO, S. et al. Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 192-201, 2012.
- FRANGOS, L. et al. Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. **Food Microbiology**, v. 27, p. 115-121, 2010.
- GOULAS, A. E.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. **Food Chemistry**, v. 100, p. 287-296, 2007.

GUARDA, A. et al. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 144-150, 2011.

IVANOVIC, J. et al. *In vitro* control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. **Food Control**, v. 25, p. 110-116, 2012.

LEIGHTON, C. S.; SCHONFELDT, H. C.; KRUGER, R. Quantitative descriptive sensory analysis of five different cultivars of sweet potato to determine sensory and texture profiles. **Journal of Sensory Studies**, v. 25, p. 2-18, 2010.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. CRC Press: Boca Raton, 1999.

MEXIS, S. F.; CHOULIARA, E.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of an O<sub>2</sub> absorber and oregano essential oil on shelf-life extension of Greek cod roe paste (tarama salad) stored at 4 °C. **Innovative Food Science Emerging Technologies**, v. 10, p. 572-579, 2009.

MOHAMED, H. M. H.; MANSOUR, H. A. Incorporating essential oils of marjoram and rosemary in the formulation of beef patties manufactured with mechanically deboned poultry meat to improve the lipid stability and sensory attributes. **Food Science and Technology – LWT**, v. 45, p. 79-87, 2012.

OLMEDO, R. H.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. **Food Science and Technology – LWT**, v. 53, p. 409-417, 2013.

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

RUBILAR, J. F. et al. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 466-474, 2013.

STATISTICA. **Data analysis software system** (version 7.0.61.0), Stat Soft Inc.: Tulsa, 2004.

TSENG, A.; ZHAO, Y. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. **Food Chemistry**, v. 138, p. 356-365, 2013.

USHIMARU, P. I. et al. Antibacterial activity of medical plant extracts. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 717-719, 2007.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Effect of orange dietary fibre, oregano essential oil and packaging conditions on shelf-life of bologna sausages. **Food Control**, v. 21, p. 436-44, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **World health report 2002: Reducing risks, promoting healthy life**. Disponível em: <<http://www.who.int/whr/2002/en/>>. Acesso em: 21 set. 2012.

YOSSA, N. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 in organic soil. **Food Control**, v. 21, p. 1458-1465, 2010.

# ***Capítulo 3***

---

*Efeito da adição de óleo essencial de orégano e sal (NaCl) sobre  
Escherichia coli e Staphylococcus aureus*

## RESUMO

Devido a incidência constante de doenças veiculadas por alimentos e ao interesse no emprego de conservantes naturais para substituir os aditivos químicos, esta pesquisa objetivou avaliar os efeitos *in vitro* e *in situ* da adição de óleo essencial de orégano (OEO) e de sal (NaCl) sobre duas cepas contaminantes de alimentos, *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os ensaios *in vitro* foram efetuados empregando-se o OEO e o sal, individualmente ou em combinação, por meio do procedimento de difusão em ágar por disco. A contagem microbiana foi padronizada em  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. O efeito do OEO e do sal foi avaliado em planejamento fatorial  $2^2$  com um ponto central. Para o estudo *in situ* foi proposto como sistema alimentício um condimento preparado de orégano, composto por leite em pó integral, água, óleo vegetal de soja, extrato de soja em pó, OEO e sal, sendo os dois últimos constituintes os fatores cujos níveis foram avaliados. Empregou-se, para tanto, um delineamento composto central rotacional, com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 repetições do ponto central. O OEO foi caracterizado por cromatografia gasosa e as distintas formulações do condimento preparado de orégano foram avaliadas centesimalmente por meio de análises dos teores de cinzas, de lipídeos, de proteínas e de umidade. O OEO era composto majoritariamente por carvacrol (65,1 %) e p-cimeno (12,0 %). Os condimentos de orégano apresentaram perfis centesimais similares, sendo os lipídeos presentes em teores de 57,89 a 60,09 % e a umidade entre 31,99 e 32,33 %. Os resultados da atividade antibacteriana *in vitro* sugerem que a inibição de ambas as espécies foi similar para um mesmo tratamento, com a existência de diferença ( $P \leq 0,05$ ) somente entre os tratamentos OEO 0,4 % e aqueles com os menores teores de OEO (0,2%) combinados com o sal. Para a *E. coli* foi verificado, no estudo *in situ*, o efeito do OEO e da interação entre o OEO e o sal sobre a contagem bacteriana, o que permitiu descrever matematicamente a contagem bacteriana em função dos teores de OEO e sal ( $P \leq 0,10$ ).

Palavras-chave: Compostos naturais. Conservantes de alimentos. Antimicrobiano. Planejamento fatorial. Superfície de resposta

## ABSTRACT

*As a starting point for the use of the spice as a natural preservative in food systems, this study aimed to evaluate the antibacterial activities of oregano essential oil (OEO) and salt (NaCl) against two bacterial strains: Escherichia coli (ATCC 8739) and Staphylococcus aureus (ATCC 25923). The in vitro antibacterial assays were conducted employing the OEO and salt, separately or in combination, through the disk diffusion method. The microbial count was standardized at  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>. The effect of OEO and salt in bacterial counts was evaluated through a 2<sup>2</sup> factorial design with a central point. For the study in situ, it was employed a salad dressing, composed of whole milk powder, water, vegetable soybean oil, powdered soy extract, oregano essential oil and salt. The latter two constituents were the factors whose levels were evaluated. It is employed for a Central Composite Rotatable Design (CCRD) to optimize bacterial decrease. Oregano essential oil characterized by gas chromatography and the different formulations by analysis of ash, lipids, proteins and moisture. OEO was composed mainly by carvacrol (65.1 %) and p-cymene (12.0 %). Different salad dresses showed similar profiles. Lipids were present in levels from 57.89 to 60.09 % and the moisture between 31.99 and 32.33 %. The average results of the antibacterial activity in vitro showed that inhibition of both bacterial species was similar to the same treatment. It was possible to confirm the existence of a statistically significant difference only between 0.4 % OEO treatments and those with lower levels of OEO (0.2 %) combined with the salt. In the in situ study was verified for E. coli the effect of OEO and the interaction between OEO and the salt on the bacterial count, allowing mathematically describe the strain count in function of OEO and salt content at 10 % significance level.*

*Keywords: Natural compounds. Food preservatives. Antimicrobial. Factorial design. Surface response analysis*

## 1 Introdução

A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) é foco de discussões entre órgãos reguladores e produtores de alimentos, devido à preocupação com estratégias que permitam controlá-las e, conseqüentemente, garantam a inserção de produtos seguros no mercado consumidor (IVANOVIC et al., 2012).

As alterações no perfil epidemiológico dessas enfermidades ocorrem devido à expansão do mercado consumidor, à globalização econômica, às mudanças dos hábitos alimentares e ao aumento no consumo de alimentos industrializados ou produzidos fora do lar (SHINOHARA et al., 2008). Scallan et al. (2011) relataram que, nos Estados Unidos da América, ocorrem em média 228.744 hospitalizações anuais em decorrência de DTAs, sendo que, em aproximadamente 64 % do casos, espécies bacterianas distintas são as responsáveis.

A suspeita sobre a toxicidade de alguns aditivos químicos e o abuso na utilização de compostos como conservantes alimentícios têm demandado medidas legislativas cada vez mais enérgicas no panorama mundial. Como resultado, há um crescente interesse em pesquisas que buscam compostos alternativos para o emprego como conservantes naturais de alimentos (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009; HABERBECK et al., 2012). Além disso, a descoberta de novos agentes antimicrobianos naturais também proporciona aplicações na área médica, tendo em vista o aumento da taxa de infecções ocasionadas por micro-organismos resistentes aos antibióticos (SAĞDIÇ, 2003).

No Brasil, o perfil epidemiológico das DTAs ainda é pouco conhecido, seja por falta de notificação oficial ou porque somente alguns estados e/ou municípios dispõem de estatísticas e levantamentos reais sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos frequentemente envolvidos e fatores contribuintes (VAN OMSON et al., 2006). Dentre os micro-organismos comumente envolvidos em DTAs, podem ser destacados *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus* (MATASYOH et al., 2007 *apud* RANDRIANARIVELO et al., 2009).

*Staphylococcus aureus* causa uma intoxicação alimentar generalizada e muito frequente (BARROS et al., 2009), e sua habilidade em adquirir resistência a praticamente todos os antimicrobianos empregados é um fator de grande preocupação para a saúde pública (GIBBONS, 2004).

As linhagens de *Escherichia coli* causadoras de doenças podem ser agrupadas em pelo menos seis categorias, de acordo com os sintomas clínicos apresentados pelos pacientes e os mecanismos de patogenicidade exibidos pela cepa. Trata-se de um indicador de contaminação fecal em alimentos de origem *in natura*, produtor de enterotoxinas, com habilidade contínua de evoluir para sintomas nunca antes relatados ou caracterizados (NEWELL et al., 2010).

O uso de antimicrobianos naturais em alimentos, como temperos, condimentos e extratos vegetais tende a ser uma alternativa eficaz ao uso de aditivos químicos, principalmente quando empregado em combinação com outras tecnologias já existentes, visando à redução da carga microbiana em alimentos (BURT, 2004; ISAACS et al., 2005; NAZER et al., 2005; DUPONT et al., 2006 *apud* SILVA et al., 2010; CASTILHO et al., 2012). Diversos óleos essenciais de especiarias já encontram-se categorizados como seguros ou GRAS, *Generally Recognized as Safe*, pela *US Food and Drug Administration* – FDA (BURT, 2004; BENAVIDES; VILLALOBOS-CARVAJAL; REYES, 2012) e, embora diversos estudos evidenciem as suas propriedades *in vitro*, as informações sobre os efeitos antimicrobianos nos produtos alimentícios e sua interação com os componentes dos alimentos ainda são escassas (PESAVENTO et al., 2015).

Por conseguinte, a presente pesquisa visou avaliar os efeitos antimicrobianos *in vitro* e *in situ* de óleo essencial de orégano sobre duas bactérias de importância em alimentos, *E. coli* (ATCC 8739) e *S. aureus* (ATCC 25923). Além disso, foi estudado o efeito do óleo essencial de orégano e do sal (cloreto de sódio) sobre o desenvolvimento *in situ* das duas cepas por meio da metodologia de superfície de resposta.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Matérias-primas

Os meios de cultura empregados nesta pesquisa foram provenientes da *HiMedia Laboratories* e o polisorbato 80, Tween 80, da empresa *Sigma Aldrich*. O óleo essencial de orégano (grau de pureza de 100 %) foi adquirido da empresa Laszlo Aromaterapia Ltda. As demais matérias-primas empregadas na elaboração dos condimentos preparados de orégano foram adquiridas de um mercado local de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil, consistindo em óleo de soja (Vila Velha - Louis Dreyfus Commodities Brasil), extrato de soja integral em pó (Mãe Terra Produtos Naturais Ltda.), leite em pó integral (Itambé Alimentos S/A), sal - cloreto de sódio (Lebre - Norte Salineira S/A) e água mineral Leve.

Optou-se por empregar o sal refinado iodado (NaCl) comumente utilizado na produção industrial de alimentos, de modo a obter resultados similares daqueles que podem vir a ocorrer nos produtos alimentícios. Para a avaliação do efeito antibacteriano *in vitro* foram empregadas concentrações do sal diluído em água destilada estéril para compor a solução. Por sua vez, para o estudo antibacteriano *in situ* o sal foi empregado diretamente no alimento, em uma relação peso.peso<sup>-1</sup>. O óleo essencial de orégano foi utilizado no estudo antibacteriano *in vitro* diluído em solução Tween 80 a 0,5 %. Para a análise *in situ*, o OEO foi adicionado diretamente aos condimentos preparados de orégano, em uma relação volume.peso<sup>-1</sup>.

### 2.2 Cultura bacteriana

Para os estudos de efeito antimicrobiano, as cepas *E. coli* (ATCC 8739) e *S. aureus* (ATCC 25923) foram mantidas em Ágar Padrão para Contagem (PCA) a 4° C, e reativadas no mesmo meio de cultura, com incubação a 35 °C por 24 horas. Para a avaliação antimicrobiana *in vitro*, a contagem bacteriana foi padronizada de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland, proporcionando uma concentração de 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (ALVES et al., 2008). Por sua vez, para o estudo *in situ*, a carga bacteriana foi padronizada na concentração de 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, a partir da escala 0,5 Mc Farland com sucessivas diluições.

### 2.3 Estudo do efeito antimicrobiano *in vitro*

Para avaliar o efeito do óleo essencial de orégano e do sal, individualmente e em combinação, sobre *E. coli* e *S. aureus*, empregou-se o planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central, conforme apresentado na Tabela 1. As variáveis independentes para o delineamento experimental foram os teores de OEO e de sal; por sua vez, a variável dependente foi a contagem bacteriana.

Por meio de testes preliminares foram definidas as concentrações de cada fator (variável independente), optando-se por não empregar teores de OEO superiores a 0,5 % em virtude dos resultados obtidos por Cattelan et al. (2015), em análise sensorial do condimento preparado de orégano. Na realização do delineamento experimental, a ordem dos ensaios foi estabelecida por meio de sorteio.

**Tabela 1** – Delineamento experimental com as variáveis codificadas e reais que compõem o planejamento fatorial  $2^2$  com um ponto central

Tratamento	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais <sup>a</sup>	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentração de Sal (%)	Concentração de OEO (%)
F1	-1	-1	1,14	0,2
F2	+1	-1	1,30	0,2
F3	0	0	1,22	0,3
F4	-1	+1	1,14	0,4
F5	+1	+1	1,30	0,4

<sup>a</sup> Percentagens de óleo essencial de orégano (OEO) e de sal em relação a 100 g de mistura de água mineral, leite integral em pó, óleo vegetal de soja e extrato de soja integral em pó (peso.peso<sup>-1</sup>).

Para efeitos comparativos da inibição microbiana, foram preparadas, além dos tratamentos exibidos na Tabela 1, amostras contendo exclusivamente o OEO (0,2; 0,3 e 0,4 %) ou o sal (1,14; 1,22 e 1,30 %). Como controle negativo empregou-se água destilada estéril, quando o fator estudado foi o teor de cloreto de sódio. Por sua vez, quando a variável independente avaliada foi a concentração de OEO ou a combinação dos dois fatores, utilizou-se a solução composta por água e Tween 80 a 0,5 %. Os tratamentos utilizados no estudo antibacteriano *in vitro* encontram-se discriminados na Tabela 2.

A sensibilidade das cepas *E. coli* e *S. aureus* sobre o OEO foi avaliada pelo método de difusão em ágar, com modificações (TEPE et al., 2005). Em placas de

Petri contendo Ágar Müeller-Hinton (MHA) foram efetuadas semeaduras por superfície com a cultura bacteriana padronizada em escala 0,5 de Mc Farland. Os discos de papel filtro estéreis, de 6 mm de diâmetro, foram inseridos sobre o ágar previamente inoculado, com o auxílio de uma pinça estéril. Em seguida, alíquotas de 40 µL de cada solução teste foram impregnadas nos discos estéreis. Após incubação a 35° C por 24 horas, os diâmetros de inibição foram mensurados com o auxílio de um paquímetro. Diâmetros de inibição iguais ou superiores a 10 mm foram considerados significativos de atividade antimicrobiana, conforme Hoffmann et al. (1999).

**Tabela 2** – Delineamento experimental com as variáveis reais empregadas nas formulações de condimento de orégano, utilizadas no estudo antibacteriano *in vitro*

Tratamento	Variáveis Reais <sup>a</sup>	
	Teor de Sal (%)	Teor de OEO (%)
F1	1,14	0,20
F2	1,30	0,20
F3	1,22	0,30
F4	1,14	0,40
F5	1,30	0,40
OEO 0,2 %	-	0,20
OEO 0,3 %	-	0,30
OEO 0,4 %	-	0,40
Sal 1,14 %	1,14	-
Sal 1,22 %	1,22	-
Sal 1,30 %	1,30	-

<sup>a</sup> Percentagens de óleo essencial de orégano (OEO) e de sal em relação a 100 g de mistura de água mineral, leite integral em pó, óleo vegetal de soja e extrato de soja integral em pó (peso.peso<sup>-1</sup>).

#### 2.4 Processamento dos condimentos preparados de orégano

Em um misturador de baixa velocidade (Walita – RI 2044) foram constantemente homogeneizados óleo vegetal de soja (64,12 g), água mineral (30,53 g), leite em pó integral (3,8 g) e extrato de soja integral (1,55 g). O OEO e o sal (variáveis independentes) foram adicionados no final de cada mistura, gerando assim um delineamento composto central rotacional (DCCR), ou seja, um planejamento 2<sup>2</sup> incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios (Tabela 3). A variável dependente avaliada foi a contagem bacteriana.

**Tabela 3** – Delineamento experimental com as variáveis codificadas e reais empregadas nas formulações de condimento preparado de orégano, utilizadas no estudo antibacteriano *in situ*

Tratamento	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais <sup>a</sup>	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentração de Sal (%)	Concentração de OEO (%)
1	-1	-1	1,14	0,20
2	+1	-1	1,30	0,20
3	-1	+1	1,14	0,40
4	+1	+1	1,30	0,40
5	-1,41	0	1,11	0,30
6	+1,41	0	1,33	0,30
7	0	-1,41	1,22	0,16
8	0	+1,41	1,22	0,44
9	0	0	1,22	0,30
10	0	0	1,22	0,30
11	0	0	1,22	0,30

<sup>a</sup> Percentagens de óleo essencial de orégano (OEO) e de sal em relação a 100 g de mistura de água mineral, leite integral em pó, óleo vegetal de soja e extrato de soja integral em pó (peso.peso<sup>-1</sup>).

### 2.5 Estudo do efeito antibacterino *in situ*

O produto alimentício foi contaminado com as cepas bacterianas *E. coli* e *S. aureus*, separadamente, sendo a carga microbiana empregada de 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup>. Para a contagem de *E. coli*, empregou-se a metodologia descrita por Kornacki; Johnson (2001) e, para *S. aureus*, o protocolo especificado por Lancette; Bennett (2001). Todas as análises microbiológicas foram efetuadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP de São José do Rio Preto, SP.

### 2.6 Perfis microbiológicos dos condimentos preparados de orégano

Foram analisadas amostras indicativas de condimento preparado de orégano, de acordo com a legislação vigente no Brasil, designada pelo Regulamento Técnico de Padrões Microbiológicos para Alimentos – RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). Para tanto, procedeu-se à pesquisa de coliformes a 45° C, estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* sp., cujos limites legislativos são, respectivamente, 5,0x10 NMP.g<sup>-1</sup>, 1,0x10<sup>2</sup> UFC.g<sup>-1</sup> e ausente em 25 gramas de amostra.

## 2.7 Composição centesimal dos condimentos preparados de orégano

Para a caracterização dos condimentos preparados de orégano, empregados no estudo do efeito antibacteriano *in situ*, as diferentes formulações foram analisadas em triplicata, de acordo com os métodos descritos a seguir.

- Umidade: por secagem em estufa à vácuo a 70° C, até a obtenção de peso constante (AOAC, 1997);
- Cinzas: por incineração em mufla a 550 °C (AOAC, 1997);
- Lipídeos: pelo método de Bligh Dyer (1959);
- Proteínas: conforme metodologia proposta por Kjeldahl, multiplicando o teor de nitrogênio total pelo fator de conversão geral 6,25 (AOAC, 1997);
- Carboidratos totais: o percentual de carboidratos totais foi calculado como a diferença entre 100 e a soma dos percentuais dos demais constituintes.

Como os tratamentos 9, 10 e 11 apresentavam a mesma formulação, a composição centesimal foi efetuada em três amostras e os dados foram empregados para os três tratamentos.

## 2.8 Perfil cromatográfico do óleo essencial de orégano

O perfil cromatográfico do óleo essencial de orégano foi determinado empregando-se um cromatógrafo a gás de alta resolução HP 5890 (Hewlett-Packard), equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou-se uma coluna HP-1 (Hewlett-Packard) 20,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm, com gradiente de temperatura de 40° C, 3 min, 3° C.min<sup>-1</sup> até 150 °C e um sistema de injeção *split* a 200° C em uma razão de 1/200 e detector a 200° C. O gás de arraste foi o hidrogênio (2 mL.min<sup>-1</sup>) e volume de injeção de 1 µL. As amostras foram diluídas em tetrahidrofurano. Esta análise foi realizada no Laboratório de Cromatografia, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Minas Gerais, Campus de Belo Horizonte.

## 2.9 Análise estatística

O estudo da atividade antibacteriana *in vitro* foi conduzido em triplicata, sendo o planejamento inteiramente casualizado. Os fatores estudados foram a influência do óleo essencial de orégano e do sal, em combinação ou individualmente, sobre a inibição bacteriana. Os resultados da análise foram avaliados empregando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, adotando-se o nível de significância de 5 %. Para tanto, fez-se uso do software GraphPad InStat, versão 3.05 (GrapPad Software Inc., La Jolla, EUA).

Para estimar os efeitos dos fatores óleo essencial de orégano e sal sobre a inibição microbiana *in situ* e avaliar a predição ou não do modelo matemático empregou-se a análise de variância (ANOVA) e da metodologia de superfície de resposta, fazendo uso do software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, EUA). As análises foram efetuadas empregando um delineamento composto central rotacional (DCCR), ou seja, um planejamento  $2^2$  incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. A variável dependente avaliada foi a contagem bacteriana, conforme delineamento experimental disposto na Tabela 3. O nível de significância adotado foi de 10 %, devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos que envolvem micro-organismos (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

A composição centesimal das distintas formulações de condimento preparado (teores de carboidratos, cinzas, lipídeos, proteínas e umidade) foi avaliada por meio de estatística descritiva e teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, a 5 % de significância (GrapPad Software Inc., La Jolla, EUA).

### 3 Resultados e discussão

O óleo essencial de orégano foi escolhido, entre outros óleos essenciais, em decorrência dos resultados positivos de um estudo efetuado por Cattelan (2012). Optou-se arbitrariamente por empregar no experimento um produto similar a um patê, sendo neste trabalho referido como um condimento preparado de orégano. A formulação padrão do produto foi obtida após estudos preliminares e resultou nas características sensoriais similares às de um condimento preparado geralmente consumido no Brasil (CATTELAN et al., 2015). A partir da formulação padrão, foram elaborados outros condimentos preparados que diferiam entre si nas concentrações de OEO e de sal.

#### 3.1 Perfis microbiológicos dos condimentos preparados de orégano

As análises efetuadas em todas as amostras indicativas de condimento preparado de orégano, recém-preparadas, resultaram na ausência de *Salmonella* sp. em 25 g, contagens de coliformes a 45° C de  $< 3 \text{ NMP.g}^{-1}$  e de Estafilococos coagulase positiva de  $< 10^2 \text{ UFC.g}^{-1}$ . Deste modo, as amostras avaliadas encontraram-se de acordo com os padrões legais vigentes (BRASIL, 2001), sendo consideradas aptas ao consumo humano.

#### 3.2 Perfil cromatográfico do óleo essencial de orégano

O componente majoritário presente no óleo essencial de orégano utilizado nesta pesquisa foi o carvacrol (65,1 %), seguido pelo p-cimeno (12,0 %),  $\gamma$ -terpineno (6,8 %) e timol (3,4 %), conforme dados exibidos na Tabela 4. Este achado corrobora com o descrito por Silva et al. (2010), quando analisadas cinco marcas de OEO comercializadas no Brasil. Os autores relatam a presença de carvacrol no OEO na faixa de 61,66 a 93,42 %; o timol, por sua vez, representava entre 1,88 a 23,85 % e o p-cimeno entre 0,63 a 15,95 %. Em uma das marcas avaliadas, os autores relataram também a presença de  $\gamma$ -terpineno.

Por sua vez, Bonfanti et al. (2012), em estudo sobre a caracterização de quatro amostras de óleos essenciais de orégano cultivado na Sicília, Itália, e uma amostra comercial, evidenciaram que os componentes majoritários das amostras

eram o timol (26,99 – 63,49 %), o  $\gamma$ -terpineno (6,38 – 23,73 %), o p-cimeno (4,27 – 12,04 %) e o carvacrol (0,54 – 16,49 %).

**Tabela 4** – Perfil cromatográfico do óleo essencial de orégano usado nesta pesquisa

<b>Componente</b>	<b>Composição (%)</b>
$\alpha$ -thujeno	0,4
$\alpha$ -pineno	1,7
canfeno	0,5
$\beta$ -pineno	0,7
mirceno	1,6
$\alpha$ -terpineno	1,0
p-cimeno	12,0
limoneno	0,2
1,6 cineol	0,3
$\gamma$ -terpineno	6,8
cis-hidrato de sabineno	2,4
timol	3,4
carvacrol	65,1
$\beta$ -cariofileno	1,2

Sabe-se que os compostos majoritários presentes nas plantas são aqueles que determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008; LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015). O carvacrol é comumente relatado como o componente majoritário presente no óleo essencial de orégano. Trata-se de um composto fenólico hidrofóbico com atividade antimicrobiana sobre bactérias e fungos já relatada em estudos científicos (BURT, 2004; GUARDA et al., 2011), além de exercer efeito antioxidante (BASER, 2008), o que indica o potencial promissor do composto quando empregado em alimentos visando estender a vida-de-prateleira e obter a estabilidade microbiológica dos produtos (RUBILAR et al., 2013).

Alguns fatores podem influenciar na composição dos óleos essenciais, estando eles relacionados às características intrínsecas da planta, além de fatores climáticos, de cultivo e o método de extração empregado na obtenção do óleo essencial. Em conjunto, esses fatores exercem influência sobre as propriedades dos óleos essenciais. Entretanto, os componentes majoritários presentes continuarão a exercer seu efeito antimicrobiano, permitindo a utilização dos óleos essenciais no controle do desenvolvimento microbiano (MASOTTI et al., 2003; ANGIONI et al., 2006 *apud* BAKKALI et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2013; CALO et al., 2015).

### 3.3 Composição centesimal dos condimentos preparados de orégano

As distintas formulações de condimento preparado de orégano não diferiram ( $P > 0,05$ ) em relação aos teores de carboidratos, lipídeos, proteínas e umidade. Por outro lado, o teor de cinzas, no tratamento 2 (1,30 % de sal e 0,2 % OEO) foi significativamente menor ( $P \leq 0,05$ ) que o 8 (1,30 % de sal e 0,44 % de OEO), conforme apresentado na Tabela 5. Por conseguinte, as distintas formulações de condimento preparado de orégano apresentaram características similares e propícias ao desenvolvimento microbiano, tais como elevados teores de umidade, lipídeos, proteínas e carboidratos.

As formulações (tratamentos) de condimento preparado de orégano diferiram entre si apenas nas concentrações de OEO e de sal, excetuando-se os tratamentos de 9 a 11, que se tratavam das réplicas do ponto central. Em geral, os condimentos apresentaram teores de umidade variando entre 31,99 e 32,33 %, proteínas entre 1,48 e 1,70 %, lipídeos oscilando entre 57,89 e 60,09 %, cinzas entre 1,35 e 1,55 % e carboidratos entre 5,01 e 6,70 %, sendo que os maiores valores de desvio-padrão foram obtidos para carboidratos, que foram calculados pela diferença entre 100 % e a soma dos demais compostos presentes nas amostras.

**Tabela 5** – Composição centesimal das formulações de condimento preparado de orégano

Tratamento <sup>1</sup>	Carboidratos	Cinzas	Lipídeos	Proteínas	Umidade
1	6,50±0,42 <sup>a</sup>	1,36±0,05 <sup>ab</sup>	58,28±0,40 <sup>a</sup>	1,64±0,08 <sup>a</sup>	32,22±0,08 <sup>a</sup>
2	5,97±0,35 <sup>a</sup>	1,35±0,01 <sup>b</sup>	58,86±0,32 <sup>a</sup>	1,58±0,09 <sup>a</sup>	32,25±0,07 <sup>a</sup>
3	6,50±0,51 <sup>a</sup>	1,52±0,02 <sup>ab</sup>	58,25±0,41 <sup>a</sup>	1,62±0,07 <sup>a</sup>	32,12±0,01 <sup>a</sup>
4	5,50±1,86 <sup>a</sup>	1,54±0,01 <sup>ab</sup>	59,25±1,91 <sup>a</sup>	1,54±0,02 <sup>a</sup>	32,17±0,04 <sup>a</sup>
5	6,61±0,76 <sup>a</sup>	1,54±0,03 <sup>ab</sup>	57,92±0,58 <sup>a</sup>	1,59±0,03 <sup>a</sup>	32,35±0,26 <sup>a</sup>
6	6,70±0,68 <sup>a</sup>	1,46±0,06 <sup>ab</sup>	57,89±0,45 <sup>a</sup>	1,70±0,43 <sup>a</sup>	32,25±0,05 <sup>a</sup>
7	6,56±0,11 <sup>a</sup>	1,40±0,01 <sup>ab</sup>	58,32±0,17 <sup>a</sup>	1,50±0,04 <sup>a</sup>	32,23±0,10 <sup>a</sup>
8	6,38±0,49 <sup>a</sup>	1,55±0,01 <sup>a</sup>	58,20±0,42 <sup>a</sup>	1,55±0,08 <sup>a</sup>	32,33±0,09 <sup>a</sup>
9, 10, 11	5,01±2,68 <sup>a</sup>	1,47±0,02 <sup>ab</sup>	60,06±2,68 <sup>a</sup>	1,48±0,05 <sup>a</sup>	31,99±0,18 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup>: Letras distintas na mesma coluna evidenciam que os tratamentos diferem entre si pelo teste de Dunn a 5% de significância. Resultados expressos em termos de média ± desvio-padrão.

<sup>1</sup> Tratamentos de 1 a 9 correspondem às formulações de condimento preparado de orégano contendo distintas concentrações de óleo essencial de orégano (OEO) e sal. 1 = 1,14 % sal e 0,2 % de OEO; 2 = 1,30 % de sal e 0,2 % de OEO; 3 = 1,14 % de sal e 0,4 % de OEO; 4 = 1,30 % de sal e 0,4 % de OEO; 5 = 1,11 % de sal e 0,3 % de OEO; 6 = 1,33 % de sal e 0,3 % de OEO; 7 = 1,22 % de sal e 0,16 % de OEO; 8 = 1,22 % de sal e 0,44 % de OEO; 9, 10 e 11 = 1,22 % de sal e 0,3 % de OEO.

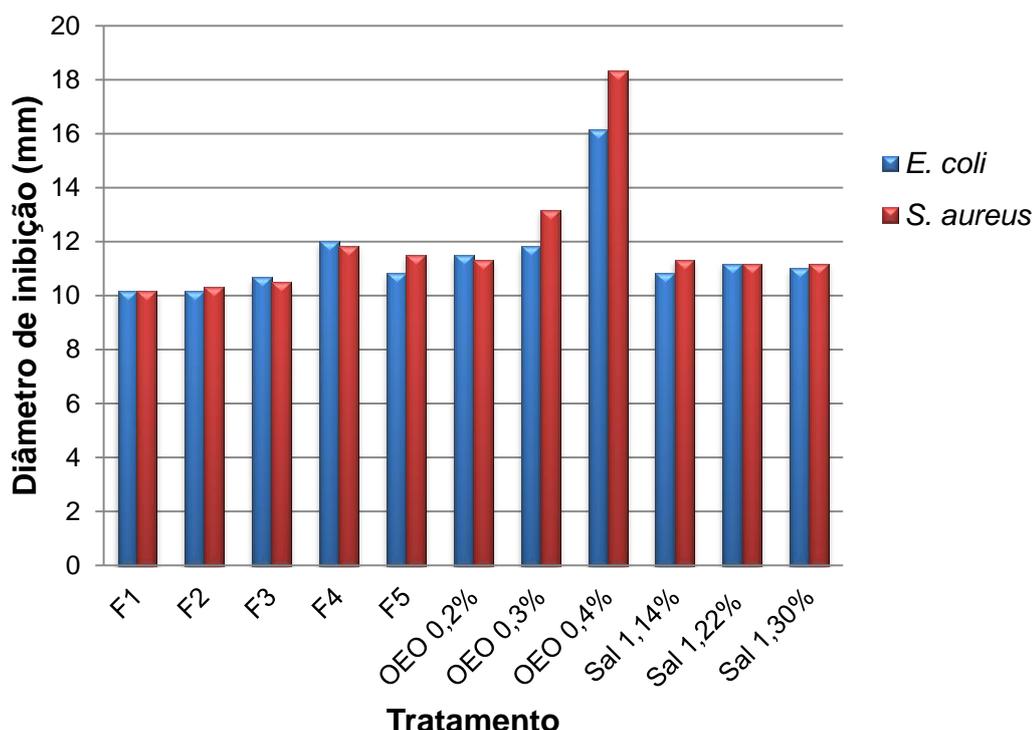
Percentagens de OEO e sal em relação a 100 g de mistura de água mineral, leite integral em pó, óleo vegetal de soja e extrato de soja integral em pó (peso.peso<sup>-1</sup>).

### 3.4 Atividade antibacteriana

#### 3.4.1 Atividade antibacteriana *in vitro*

Os tratamentos mais efetivos de inibição, *in vitro*, da *E. coli* e de *S. aureus* foram aqueles correspondentes ao uso de OEO em concentrações 0,3 e 0,4 % e ao tratamento F4 (Figura 1). Para os demais tratamentos, porém, a inibição foi similar para ambos os micro-organismos. De acordo com Hoffmann et al. (1999), diâmetros de inibição superiores a 10 mm são significativos na inibição do micro-organismo testado.

**Figura 1** – Atividade antibacteriana *in vitro* sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*



F1, F2, F3, F4 e F5: formulações de 1 a 5 correspondem aos tratamentos de condimento preparado de orégano contendo diferentes concentrações de óleo essencial de orégano (OEO) e sal. F1 = 1,14 % sal e 0,2 % de OEO; F2 = 1,30 % de sal e 0,2 % de OEO; F3 = 1,22 % de sal e 0,3 % de OEO; F4 = 1,14 % de sal e 0,4 % de OEO; F5 = 1,30 % de sal e 0,4 % de OEO.

Percentagens de OEO e sal em relação a 100 g de mistura de água mineral, leite integral em pó, óleo vegetal de soja e extrato de soja integral em pó (peso.peso<sup>-1</sup>).

**Fonte:** Elaborada pela autora.

É possível verificar, na Figura 1, que para os tratamentos em que o fator avaliado foi o sal, os diâmetros de inibição foram similares independentemente da

concentração utilizada. O mesmo ocorreu para as formulações F1 (0,2 % OEO e 1,14 % sal) e F2 (0,2 % OEO e 1,30 % sal).

As Tabelas 6 e 7 contêm os resultados da atividade antibacteriana *in vitro* promovida pelos tratamentos empregados no estudo sobre *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Para ambos os micro-organismos testados, o tratamento OEO 0,4 % propiciou resultados de inibição superiores àqueles obtidos nos tratamentos F1 e F2 ( $P \leq 0,05$ ). Porém, quando comparados os tratamentos OEO 0,4 % e os demais, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ), sendo que isso também ocorre quando se defrontam as amostras F1 e F2 com tratamentos restantes.

**Tabela 6** – Diâmetros de inibição da atividade antibacteriana *in vitro* sobre *Escherichia coli*, para os tratamentos empregados neste estudo

Tratamento	$\mu \pm s$	Mediana	Valor P
F1	10,17±0,29	10,00 <sup>b</sup>	
F2	10,17±0,29	10,00 <sup>b</sup>	
F3	10,67±0,76	10,50 <sup>ab</sup>	
F4	12,00±0,50	12,00 <sup>ab</sup>	
F5	10,83±0,29	11,00 <sup>ab</sup>	
OEO 0,2 %	11,50±1,00	11,50 <sup>ab</sup>	0,013
OEO 0,3 %	11,83±1,04	11,50 <sup>ab</sup>	
OEO 0,4 %	16,17±0,29	16,00 <sup>a</sup>	
Sal 1,14 %	10,83±0,58	10,50 <sup>ab</sup>	
Sal 1,22 %	11,17±0,76	11,00 <sup>ab</sup>	
Sal 1,30 %	11,00±0,01	11,00 <sup>ab</sup>	

F1, F2, F3, F4 e F5: formulações de 1 a 5 correspondem aos tratamentos de condimento preparado de orégano contendo diferentes concentrações de óleo essencial de orégano (OEO) e sal. F1 = 1,14 % sal e 0,2 % de OEO; F2 = 1,30 % de sal e 0,2 % de OEO; F3 = 1,22 % de sal e 0,3 % de OEO; F4 = 1,14 % de sal e 0,4 % de OEO; F5 = 1,30 % de sal e 0,4 % de OEO.

Percentagens de OEO e sal em relação a 100 g de mistura de água mineral, leite integral em pó, óleo vegetal de soja e extrato de soja integral em pó (peso.peso<sup>-1</sup>).

<sup>a, b</sup>: Letras distintas na mesma coluna evidenciam que os tratamentos diferem entre si pelo teste de Dunn ( $P \leq 0,05$ ).

$\mu \pm s$ : média  $\pm$  desvio padrão

**Tabela 7** – Diâmetros de inibição da atividade antibacteriana *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus*, para os tratamentos empregados neste estudo

Tratamento	$\mu \pm s$	Mediana	Valor P
F1	10,17±0,29	10,00 <sup>b</sup>	
F2	10,33±0,29	10,50 <sup>b</sup>	
F3	10,50±0,50	10,50 <sup>ab</sup>	
F4	11,83±0,58	11,50 <sup>ab</sup>	
F5	11,50±0,01	11,50 <sup>ab</sup>	
OEO 0,2 %	11,33±0,76	11,50 <sup>ab</sup>	0,008
OEO 0,3 %	13,17±1,52	13,50 <sup>ab</sup>	
OEO 0,4 %	18,33±0,58	18,00 <sup>a</sup>	
Sal 1,14 %	11,33±1,04	11,00 <sup>ab</sup>	
Sal 1,22 %	11,17±0,76	11,00 <sup>ab</sup>	
Sal 1,30 %	11,17±0,29	11,00 <sup>ab</sup>	

F1, F2, F3, F4 e F5: formulações de 1 a 5 correspondem aos tratamentos de condimento preparado de orégano contendo diferentes concentrações de óleo essencial de orégano (OEO) e sal. F1 = 1,14 % sal e 0,2 % de OEO; F2 = 1,30 % de sal e 0,2 % de OEO; F3 = 1,22 % de sal e 0,3 % de OEO; F4 = 1,14 % de sal e 0,4 % de OEO; F5 = 1,30 % de sal e 0,4 % de OEO.

Percentagens de OEO e sal em relação a 100 g de mistura de água mineral, leite integral em pó, óleo vegetal de soja e extrato de soja integral em pó (peso.peso<sup>-1</sup>).

<sup>a, b</sup>: Letras distintas na mesma coluna evidenciam que os tratamentos diferem entre si pelo teste de Dunn ( $P \leq 0,05$ ).

$\mu \pm s$ : média  $\pm$  desvio padrão

Cattelan et al. (2013), em investigação sobre o efeito antibacteriano de óleo essencial de orégano sobre micro-organismos patogênicos veiculados por alimentos relataram diâmetros de inibição entre 11 e 32 mm para *E. coli* (ATCC 8739) e de 15 e 38 mm para *S. aureus* (ATCC 25923). No referido estudo, foram empregadas as mesmas cepas e metodologia de avaliação do efeito antimicrobiano *in vitro* (difusão em ágar por disco) utilizadas neste trabalho, permitindo uma corroboração entre os resultados dos estudos e evidenciando que a inibição de *S. aureus* foi superior à obtida para a *E. coli*.

Estudando o efeito antimicrobiano de óleo essencial de orégano incorporado em filmes protéicos de triticale, Aguirre; Borneo; Leo (2013) obtiveram diâmetros médios de inibição sobre *E. coli* (ATCC 25923) de 10,81 milímetros quando o OEO fora empregado na concentração de 1,0 %. Para *S. aureus* (ATCC 29737), o diâmetro de inibição promovido foi de 166,90 mm. Para a espécie *E. coli* os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os obtidos por Aguirre; Borneo; Leo (2013), sendo que o efeito antimicrobiano sobre *S. aureus* diferiu de modo expressivo entre os experimentos.

Nostro et al. (2004) relataram o efeito antimicrobiano do óleo essencial de orégano sobre *S. aureus* (ATCC 25923) com a concentração inibitória mínima (CIM) de 0,125 % (v.v<sup>-1</sup>), sendo a CIM para o componente carvacrol do OEO de 0,03 % (v.v<sup>-1</sup>) e, para o timol, de 0,06 % (v.v<sup>-1</sup>). A eficácia antimicrobiana do óleo essencial de orégano encontra-se diretamente relacionada à proporção e concentrações dos compostos fenólicos presentes, tais como o carvacrol e o timol (PREUSS et al., 2005; BONFANTI et al., 2012; JOUKI et al., 2014; LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015), componentes estes que foram comprovados como os majoritários no presente trabalho, juntamente com o p-cimeno e o  $\gamma$ -terpineno.

Ao investigarem a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos hexânicos de OEO, oriundos da Ilha da Madeira (Portugal), frente a 10 linhagens de bactérias e leveduras patogênicas ou deteriorantes de alimentos, Castilho et al. (2012) relataram que as substâncias apresentaram atividade antibacteriana moderada quando empregada a técnica de diluição em caldo. Os autores indicaram que a atividade de todas as amostras sobre *S. aureus* parecia estar relacionada com a presença do timol e do carvacrol, ambos bactericidas a 100 mg.mL<sup>-1</sup>. Com relação à *E. coli*, a espécie foi inibida por duas amostras de óleos essenciais e quatro extratos de n-hexano, sendo novamente relatado que o timol e o carvacrol foram bactericidas a 100 mg.mL<sup>-1</sup>.

Barros et al. (2009) evidenciaram o elevado potencial biológico do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) na inibição da viabilidade de células de *S. aureus*, por meio da supressão de algumas das características fisiológicas da espécie bacteriana, como a tolerância a sais e à atuação de algumas enzimas.

Neste experimento, foi evidenciado efeito antimicrobiano similar sobre as espécies *E. coli* (Gram-negativo) e *S. aureus* (Gram positivo), à exceção dos tratamentos OEO 0,3 e OEO 0,4 %. Alguns estudos sugerem a efetividade do óleo

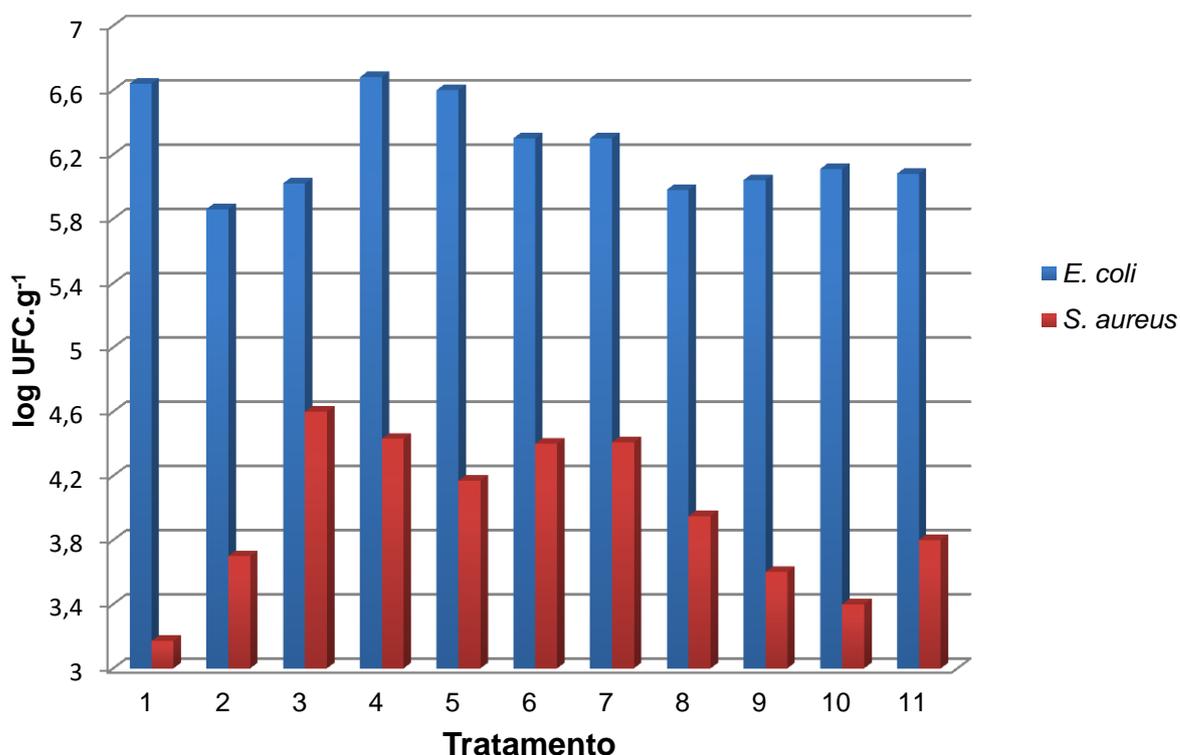
essencial de orégano tanto sobre bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (NAIDU, 2000; BURT, 2004; BENDAHOU et al., 2008; GOVAKIS et al., 2010; CATTELAN, 2013). Porém, é comum o relato de maior resistência ao efeito dos óleos essenciais por parte das bactérias Gram-negativas. Este fato é comumente atribuído às diferenças estruturais existentes entre as células dos dois grupos bacterianos, sendo que os lipopolissacarídeos presentes na parede celular das bactérias Gram-negativas limitam a difusão de compostos hidrofóbicos pela membrana citoplasmática (BURT, 2004; AGUIRRE; BORNEO; LEO, 2013; JOUKI et al., 2014).

A disparidade entre os diâmetros de inibição no teste antibacteriano *in vitro*, para ambos os micro-organismos, podem ser devidos à falta de padronização metodológica para este tipo de estudo, quando empregadas substâncias naturais. Não obstante, devem ser consideradas, ainda, possíveis interferências inerentes aos tipos de solventes, concentrações, cepas microbianas, volume do inóculo, carga microbiana, entre outros fatores empregados (WEERAKKODY et al., 2010). Além disso, sabe-se que a composição química de substâncias vegetais varia dependendo da localização geográfica do cultivo, da parte da planta a partir da qual tais substâncias são obtidas e das variações sazonais (BURT, 2004; BAJPAI; BAEK; KANG, 2012).

### 3.4.2 Atividade antibacteriana *in situ*

A Figura 2 ilustra a contagem média de *E. coli* e de *S. aureus* ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ) referente aos tratamentos empregados no estudo do efeito antibacteriano *in situ*, após a inoculação das amostras de condimento preparado de orégano. Nota-se que, em média, as contagens de *S. aureus* foram inferiores às obtidas para a *E. coli* em todos os tratamentos empregados, evidenciando a maior inibição da bactéria Gram-positiva. Além disso, verifica-se uma maior variabilidade da contagem microbiana, entre os tratamentos, para o micro-organismo *S. aureus* em comparação com a *E. coli*.

**Figura 2** – Contagem média de *E. coli* e *S. aureus* (log UFC.g<sup>-1</sup>) referente aos tratamentos empregados no estudo do efeito antibacteriano *in situ*



Tratamentos de 1 a 11 correspondem às amostras de condimento preparado de orégano contendo distintas concentrações de óleo essencial de orégano (OEO) e sal, com a seguinte combinação de níveis: 1 = 1,14 % sal e 0,2 % de OEO; 2 = 1,30 % de sal e 0,2 % de OEO; 3 = 1,14 % de sal e 0,4 % de OEO; 4 = 1,30 % de sal e 0,4 % de OEO; 5 = 1,11 % de sal e 0,3 % de OEO; 6 = 1,33 % de sal e 0,3 % de OEO; 7 = 1,22 % de sal e 0,16 % de OEO; 8 = 1,22 % de sal e 0,44 % de OEO; 9, 10 e 11 = 1,22 % de sal e 0,3 % de OEO.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

A Tabela 8 resume a avaliação estatística para a variável dependente log UFC.g<sup>-1</sup>, para o micro-organismo *E. coli*, com os efeitos e coeficientes para as variáveis avaliadas neste estudo, concentração de OEO e de sal. A contagem microbiana foi ajustada a um modelo de equação de segunda ordem e os termos foram examinados levando-se em consideração a qualidade do ajuste. A análise de variância, ANOVA, foi empregada para avaliar a adequação do modelo ajustado (Tabela 9). Os valores foram considerados significativos em um intervalo de confiança de 90 %.

**Tabela 8** – Regressão múltipla para ajuste do modelo de segunda ordem e análise de variância da regressão para os dados de contagem microbiana ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ) de *Escherichia coli* em condimento preparado de orégano

<b>Termo</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Erro Puro</b>	<b>t-estimativa</b>	<b>Valor P</b>
Média	6,0767	0,0203	299,71	<b>&lt;0,001</b>
OEO (Linear)	-0,0681	0,0124	-5,47	<b>0,032</b>
OEO (Quadrático)	0,1887	0,0149	12,72	<b>0,006</b>
Sal (Linear)	-0,0315	0,0124	-2,53	0,127
Sal (Quadrático)	0,0328	0,0148	2,21	0,158
OEO <sub>x</sub> Sal	0,3600	0,0176	20,51	<b>0,002</b>
Regressão (ANOVA)	---	---	---	<b>0,009</b>

OEO: concentração de óleo essencial de orégano; Sal: concentração de sal; OEO<sub>x</sub>Sal: concentração de óleo essencial de orégano x concentração de Sal.

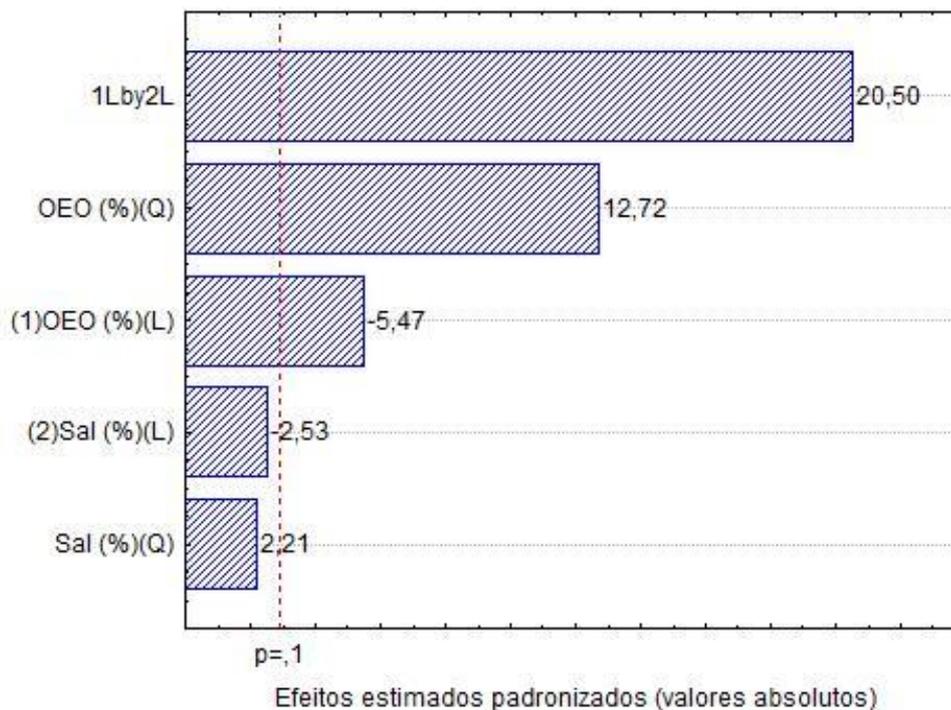
**Tabela 9** – Análise de variância para a variável contagem de *Escherichia coli* ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ) em condimento preparado de orégano

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>F calculado</b>	<b>F crítico*</b>
Regressão	0,7658	5	0,1532	11,35	3,45
Resíduos	0,0674	5	0,0135		
Falta de ajuste	0,0649	3	0,0217	18,08	9,16
Erro Puro	0,0025	2	0,0012		
<b>Total</b>	<b>0,8332</b>	<b>10</b>			

\* $R^2 = 0,8384$ ; Valores tabelados: F regressão (5, 5, 90).

Os dados da Tabela 8 denotam que a interação do OEO e do sal ( $P = 0,002$ ) e os efeitos linear e quadrático da concentração de OEO ( $P = 0,032$  e  $P = 0,006$ , respectivamente) influenciaram significativamente na contagem de *E. coli*. Este fato é ratificado na Figura 3, diagrama de pareto, sendo o maior efeito sobre a contagem da cepa bacteriana exercido pela combinação dos fatores analisados. Os termos não significativos foram incorporados à falta de ajuste para o cálculo do valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a relação entre os valores de  $F_{\text{calculado}}$  e  $F_{\text{crítico}}$ . O coeficiente de determinação obtido foi de 83,82 %, ou seja, possível evidenciar que o modelo matemático proposto explica 83,82 % da variabilidade na variável resposta contagem de *E. coli* ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ), em um intervalo de confiança de 90 %.

**Figura 3** – Diagrama de pareto dos efeitos para a contagem de *Escherichia coli* (log UFC.g<sup>-1</sup>) em condimento preparado de orégano



1Lby2L = interação linear entre as variáveis óleo essencial de orégano (OEO) e sal. Q = efeito quadrático; L = efeito linear.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

De acordo com o teste F (Tabela 9), o modelo é preditivo, visto que o valor F foi superior ao valor de  $F_{\text{crítico}}$ ; adicionalmente, o coeficiente da regressão foi 0,8382, valor próximo de 1. Por conseguinte, um modelo matemático de segunda ordem (1) foi estabelecido para descrever a contagem de *E. coli* em função das concentrações de OEO e de sal. Como o erro puro calculado para os pontos centrais foi baixo em comparação com o total (aproximadamente de 0,3 % do total da soma quadrática) pode-se pressupor uma boa reprodutibilidade nos dados experimentais obtidos.

De acordo com Box; Hunter; Junter (1978), para que uma regressão seja útil para fins preditivos, a relação entre os valores do teste F e do  $F_{\text{crítico}}$  deve ser superior a três. No presente estudo, a relação entre os valores foi de 3,29, ou seja, superior à proposta pelos estudiosos. Por conseguinte, o modelo matemático pode ser considerado preditivo e ajustado ( $P = 0,009$ ).

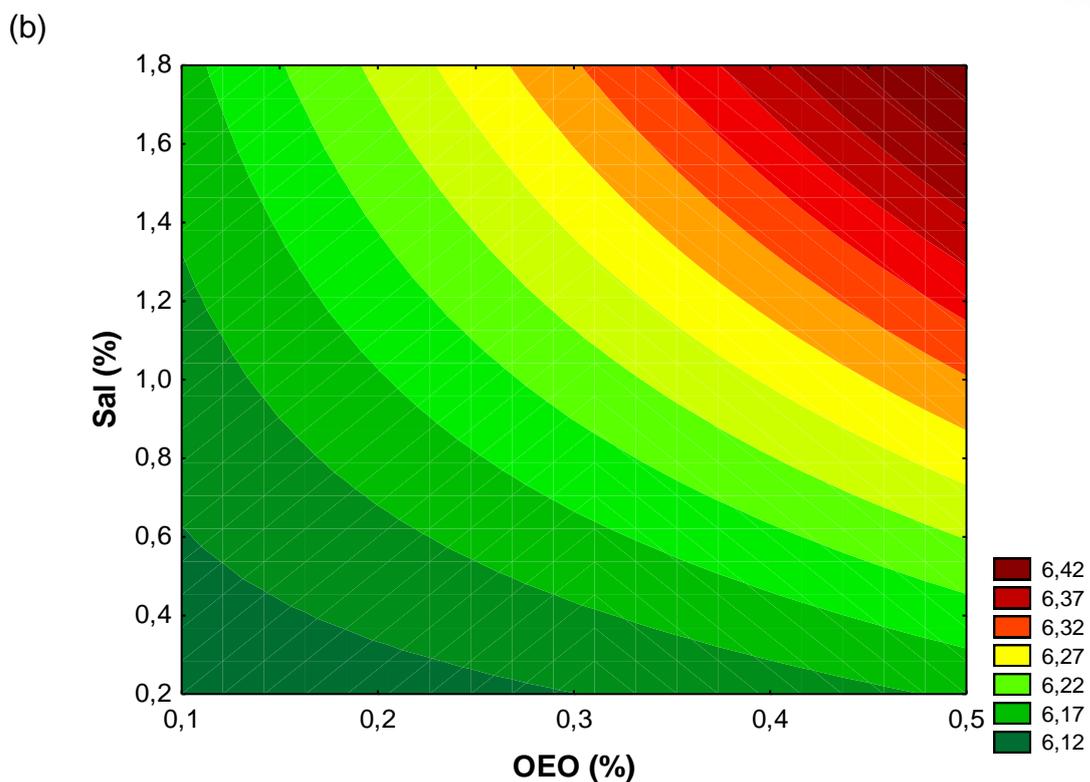
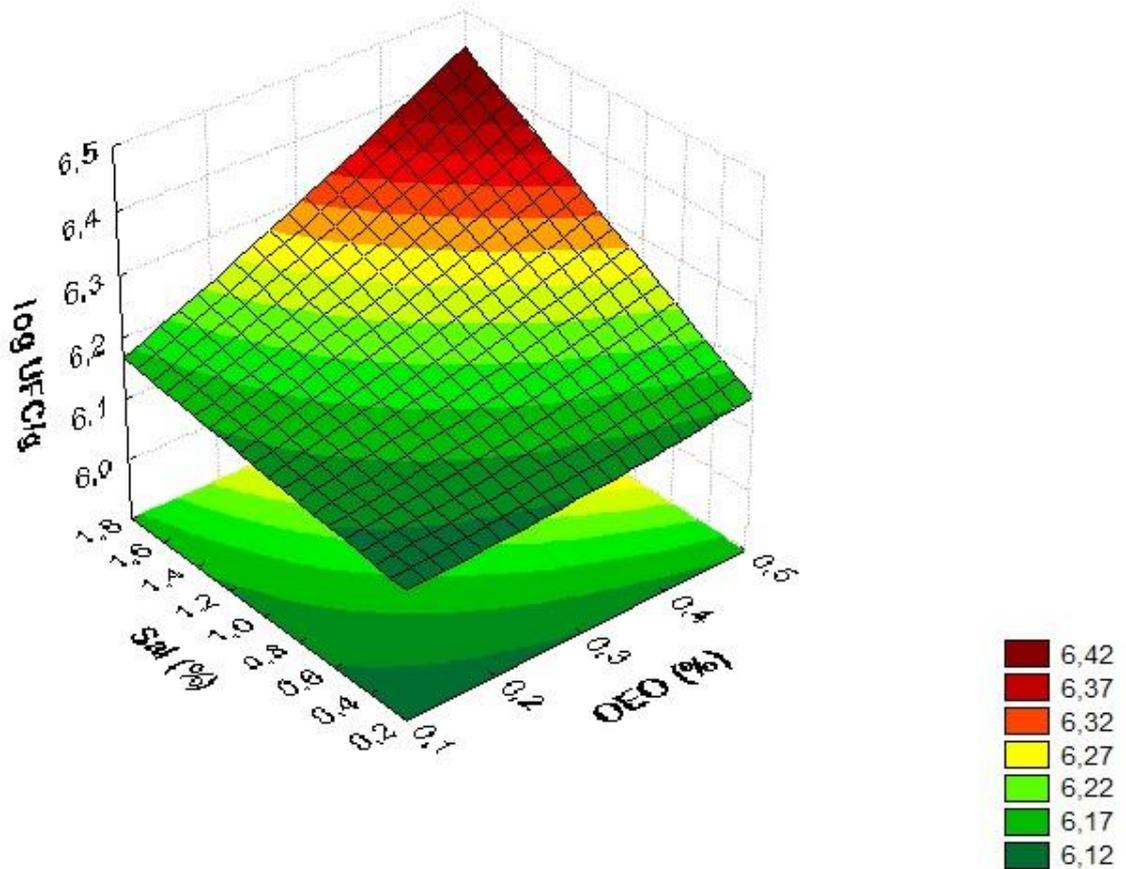
O modelo codificado apresentado na equação (1) foi empregado para gerar a superfície de resposta e o diagrama de contorno para a contagem de *E. coli* em condimento preparado de orégano (Figura 4). No modelo matemático (1), OEO e Sal

são, respectivamente, as concentrações de óleo essencial de orégano e de sal utilizadas.

$$\log UFC. g^{-1} = 6,08 - 0,07.OEO + 0,19.(OEO)^2 + 0,36.OEO.Sal \quad (1)$$

Dentro dos parâmetros estudados, foi possível prever o desenvolvimento de *E. coli*, em condimento preparado de orégano, por meio de uma equação do segundo grau (1). Como pode ser evidenciado na Figura 3, as menores contagens de *E. coli* foram obtidas em concentrações de OEO de até 0,3 %, ou quando o sal foi empregado em teores de até 0,6 %. É evidente que, com o acréscimo da quantia de OEO utilizado é possível reduzir a concentração de sal no condimento preparado de orégano, sendo a menor contagem bacteriana obtida quando do uso dos compostos em teores de 0,1 a 0,3 % (OEO) e de 0,2 a 0,6 % (sal). Adicionalmente, é possível, utilizar quantidades de OEO superiores às empregadas no presente estudo, com pouca variação da carga bacteriana, visando minimizar as concentrações de sal a serem empregados no alimento, por questões salutaras.

**Figura 4** – Superfície de resposta (a) e diagrama de contorno (b) para a contagem de *Escherichia coli* (log UFC.g<sup>-1</sup>) em função das concentrações de óleo essencial de orégano (OEO) e de sal em condimento preparado de orégano (a)



Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 10 expressa a avaliação estatística para a variável contagem do micro-organismo *S. aureus* ( $\log$  de UFC.g<sup>-1</sup>), com os efeitos e coeficientes para os fatores avaliados no presente estudo. Os valores são significativos em um intervalo de confiança de 90%. A partir das variáveis significativas, efetuou-se a análise de variância (ANOVA) que encontra-se representada na Tabela 11.

**Tabela 10** – Regressão múltipla para ajuste do modelo de segunda ordem e análise de variância da regressão para os dados de contagem microbiana ( $\log$  UFC.g<sup>-1</sup>) de *Staphylococcus aureus* em condimento preparado de orégano

Termo	Coefficiente	Erro Puro	t-estimativa	Valor P
Média	3,5800	0,2806	12,76	<b>&lt;0,001</b>
OEO (Linear)	0,0839	0,1718	0,49	0,646
OEO (Quadrático)	0,2900	0,2045	1,42	0,215
Sal (Linear)	0,1887	0,1718	1,10	0,322
Sal (Quadrático)	0,2350	0,2045	1,15	0,303
OEO <sub>x</sub> Sal	-0,1750	0,2430	-0,72	0,504
Regressão (ANOVA)	---	---	---	<b>0,539</b>

OEO: concentração de óleo essencial de orégano; Sal: concentração de sal; OEO<sub>x</sub>Sal: concentração de óleo essencial de orégano x concentração de Sal.

**Tabela 11** – Análise de variância para a variável contagem de *Staphylococcus aureus* ( $\log$  UFC.g<sup>-1</sup>) em condimento preparado de orégano

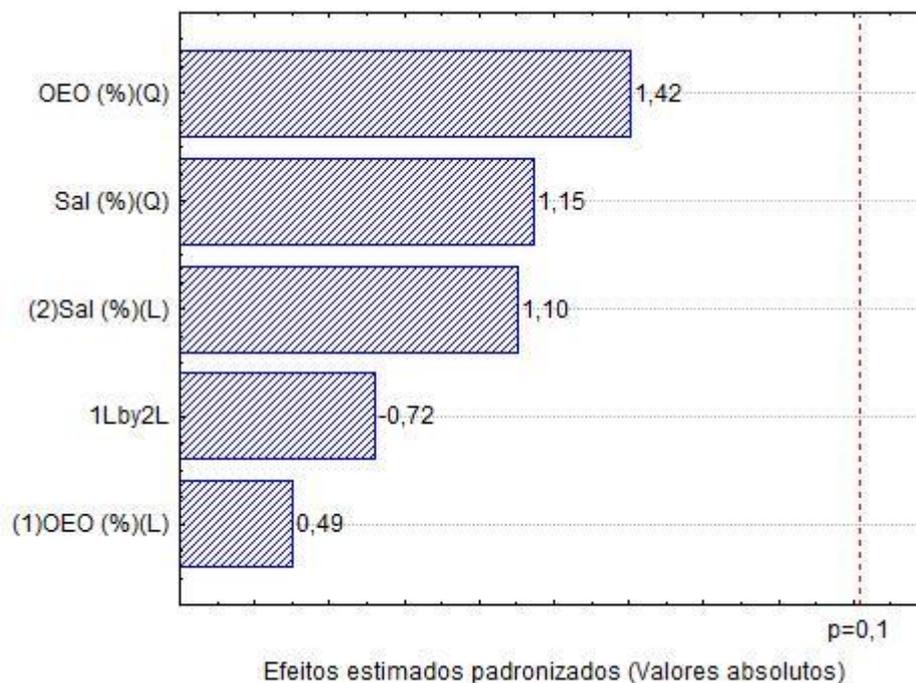
Fonte	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F crítico*
Regressão	1,0739	5	0,2148	0,91	3,45
Resíduos	1,1802	5	0,2361		
Falta de ajuste	1,1218	3	0,3739	18,51	9,16
Erro Puro	0,0584	2	0,0292		
<b>Total</b>	<b>2,2541</b>	<b>10</b>			

\* R<sup>2</sup> = 0,4769. Valores tabelados: F regressão (5, 5, 90).

Não foi possível descrever a redução da contagem de *S. aureus* por um modelo matemático que correlacionasse os fatores empregados nesse experimento, para o condimento preparado de orégano (R<sup>2</sup> = 47,69%). Os dados da regressão múltipla permitem evidenciar que o modelo não encontra-se ajustado (P = 0,539) e que a falta de ajuste é significativa (P = 0,073). Além disso, não houve influência significativa dos fatores estudados e tampouco da interação entre eles sobre a contagem de *S. aureus*, dados os valores P para cada termo (P > 0,10). Este fato pode ser reiterado por meio da Figura 5, diagrama de pareto, em que a adição de

OEO e de sal ao condimento preparado de orégano não foi capaz de inibir o desenvolvimento de *S. aureus*.

**Figura 5** – Diagrama de pareto dos efeitos para a contagem de *Staphylococcus aureus* (log UFC.g<sup>-1</sup>) em condimento preparado de orégano



1Lby2L = interação linear entre as variáveis óleo essencial de orégano (OEO) e Sal. Q = efeito quadrático; L = efeito linear.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Embora seja possível prever a contagem de *E. coli* por meio de um modelo matemático e o mesmo não tenha ocorrido para *S. aureus*, em condimento preparado de orégano, o controle do desenvolvimento de *S. aureus* foi superior ao da *E. coli* (Figura 2). Para a bactéria Gram-positiva a contagem logarítmica variou entre 3,17 e 4,60, enquanto que para a Gram-negativa a carga oscilou entre 5,86 e 6,68 ciclos logarítmicos, salientando a efetividade do OEO e do sal contra bactérias Gram-positivas, como já relatado por Burt (2004).

Nakayama et al. (2012), em estudo sobre o efeito combinado do extrato de chá verde e NaCl sobre *S. aureus* e *E. coli* O157:H7, relataram que a combinação dos fatores propiciou um efeito bactericida sobre *S. aureus*, mas não sobre *E. coli*. Desse modo, os resultados obtidos no presente estudo corroboram os dos autores supracitados, no que se refere à maior inibição da espécie *S. aureus* em comparação com a *E. coli*.

Frangos et al. (2010) relataram que a adição de NaCl em filés de truta armazenados sob refrigeração promoveu o aumento da vida de prateleira do produto em 9 dias, ao passo que o efeito combinado da adição de NaCl e OEO (0,2 % volume.peso<sup>-1</sup>), com uso de embalagem à vácuo, propiciaram a extensão da vida de prateleira dos filés em 11 a 12 dias, quando comparados ao tratamento controle (sem emprego de vácuo). Os autores mencionam, ainda, que o efeito combinado do OEO (0,4 % volume.peso<sup>-1</sup>) e NaCl foi capaz de inibir o desenvolvimento de *Enterobacteriaceae* no decorrer do período de armazenamento. O NaCl atuou reduzindo a atividade de água (*Aw*) do alimento e, conseqüentemente, propiciou a prevenção do desenvolvimento de diversas cepas microbianas patogênicas.

Deve-se levar em consideração que a eficácia de muitos antimicrobianos naturalmente presente nos alimentos ou intencionalmente adicionados a eles pode ser reduzida pelos fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados aos alimentos (BURT, 2004). Desse modo, o elevado teor lipídico presente nas amostras de condimento preparado de orégano, discutido no item 3.3 deste trabalho, é um fator de extrema relevância sobre a inibição bacteriana avaliada, visto que já existem evidências de que altos níveis de gordura e/ou proteína em alimentos protejam as bactérias da ação de óleos essenciais (GLASS; JOHNSON, 2004; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Outros pesquisadores sugerem, ainda, que lipídeos e as proteínas sejam capazes de absorver os extratos de especiarias, reduzindo o efeito antimicrobiano desses compostos (SHEKARFOROUSH; FIROUZI; KAFSHDOZAN, 2014).

Uma análise inerente aos óleos essenciais utilizados individualmente ou em combinação com outras substâncias permite empregá-los para alcançar a sinergia de efeitos letais sobre os micro-organismos, empregando baixas concentrações desses compostos e resultando em características sensoriais adversas nos alimentos. Sabe-se que os mais bem sucedidos tratamentos empregados na indústria alimentícia são aqueles que, em combinação, conseguem proporcionar excelentes obstáculos ao desenvolvimento microbiano. O conhecimento sobre os mecanismos de ação de barreira auxilia na otimização das condições de tratamento mais efetivas (AIT-OUZZOU et al., 2013).

É imprescindível, porém, atentar para a quantia de óleo essencial a ser aplicada nos alimentos em estudo, visto que este é um fator determinante na aceitação sensorial dos produtos, influenciando no sabor e no aroma (CHOULIARA

et al., 2007). Isso foi comprovado no capítulo segundo desta pesquisa, em que a formulação do condimento preparado de orégano contendo 1,22 % de sal e 0,3 % de óleo essencial de orégano (amostra contendo quantidades intermediárias de sal e óleo essencial de orégano) destacou-se em relação ao sabor e a avaliação global, quando comparada às amostras com elevados teores de OEO e de sal.

#### 4 Conclusões

Para ambas as espécies bacterianas, o efeito antimicrobiano *in vitro* foi similar para um mesmo tratamento, diferindo de modo significativo entre a amostra contendo somente o OEO na maior concentração utilizada (0,4 %) e os tratamentos F1 e F2. Não foi possível obter um modelo matemático significativo e preditivo para a contagem de *S. aureus*, e tampouco verificar o efeito do óleo essencial de orégano e do sal sobre a espécie em questão, quando no estudo *in situ*. Porém, para a *E. coli* foi verificado os efeitos linear e quadrático do OEO e da interação entre o OEO e o sal sobre a contagem bacteriana, o que permitiu descrever matematicamente a contagem da cepa em função das duas variáveis em um nível de significância de 10 %. As menores contagens de *E. coli* foram obtidas em concentrações de OEO de até 0,3 %, ou quando o sal foi empregado em teores de até 0,6 %. Ademais, o OEO e o sal exerceram efeitos inversos sobre o desenvolvimento de *E. coli*, o que permite explorar o uso do OEO em teores superiores aos empregados no presente estudo, visando a redução dos níveis de sal no alimento e permitindo pequenas variações no desenvolvimento de *E. coli*.

## REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, A.; BORNEO, R.; LEO, A. E. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. **Food Bioscience**, v. 1, p. 2-9, 2013.
- AIT-OUAZZOU, A. et al. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, pp. 320-329, 2013.
- ALVES, E. G. A. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ANGIONI, A. et al. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4364-4370, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Dairy products. In: \_\_\_\_\_. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington, 1997.
- BAJPAI, V. K.; BAEK, K.-H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734, 2012.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- 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. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1139-1143, 2009.
- BASER, K. H. C. Biological and pharmaceutical activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oil. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 3106-3120, 2008.
- BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J. E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 232-239, 2012.
- BENDAHOU, M. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hidro distillation. **Food Chemistry**, v. 106, p. 132-139, 2008.
- BLIGH, E. C.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BONFANTI, C. et al. Emerging cultivation of oregano in Sicily: Sensory evaluation of plants and chemical composition of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 160-165, 2012.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; JUNTER, J. S. Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building. Nova York: Editora Wiley, 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC ANVISA nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 20 dez. 2000. Seção 1.

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

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

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

CATTELAN, M. G. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias em alimentos**. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, 2012.

CATTELAN, M. G. et al. Antibacterial activity of oregano essential oil against foodborne pathogens. **Nutrition & Food Science**, v. 43 n. 2, p. 169-174, 2013.

CATTELAN, M. G. et al. Oregano essential oil: effect on sensory acceptability. **Nutrition & Food Science**, v. 45 n. 4, p. 574-582, 2015.

CHOULIARA, E. et al. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. **Food Microbiology**, v. 24, p. 607-617, 2007.

DUPONT, S. et al. *In vitro* antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 11, p. 929-932, 2006.

FRANGOS, L. et al. Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. **Food Microbiology**, v. 27, p. 115-121, 2010.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal activity of natural plants. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 263-277, 2004.

GLASS, K.A., JOHNSON, E.A. Antagonistic effect of fat on the antitubulin activity of food preservatives and fatty acids. **Food Microbiology**, v. 21, p. 675-682, 2004.

GOVAKIS, 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**, v. 137, p. 175-180, 2010.

GUARDA, A. et al. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 144-150, 2011.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 142-150, 2009.

HABERBECK, L. U. et al. *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat. **Food Science and Technology – LWT**, v. 46, p. 267-273, 2012.

HOFFMANN, F. L. et al. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. **Boletim CEPPA**, v. 17, n. 1, p. 11-20, 1999.

ISAACS, S. et al. An international outbreak of Salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a rare phage type of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 191-198, 2005.

IVANOVIC, J. et al. *In vitro* control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. **Food Control**, v. 25, p. 110-116, 2012.

JOUKI, M. et al. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 9-19, 2014.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P. and K. ITO (ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, 4<sup>th</sup> ed.** American Public Health Association, Washington, D. C., Chapter 8, p.69-82, 2001.

LANCETTE, G. A; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F. P. and K. ITO (ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, 4<sup>th</sup> ed.** American Public Health Association, Washington, D. C., Chapter 39, p.387-403, 2001.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. et al. *In vitro* toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 81, p. 9-27, 2015.

MASOTTI, V. et al. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7115-7121, 2003.

MATASYOH, J. C. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarhonnanthus camphoratus*. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1183-1187, 2007.

NAIDU, A.S. **Phyto-phenols Natural Food Antimicrobial Systems**. Boca Raton: CRC Press, p. 265-295. 2000.

NAKAYAMA, M. Mechanism of the combined anti-bacterial effect of green tea extract and NaCl against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. **Food Control**, v. 25, p. 225-232, 2012.

NAZER, A. I. et al. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect?. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 391-398, 2005.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. s3-s15, 2010.

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

PESAVENTO, G. et al. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v. 54, p. 188-199, 2015.

PREUSS, H. et al. Effects of essential oils and monolaurin on *Staphylococcus aureus*: *in vitro* and *in vivo* studies. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 15, pp. 279-285, 2005.

RANDRIANARIVELO, R. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. **Food Chemistry**, v. 114, p. 680-684, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

RUBILAR, J. F. et al. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 466-474, 2013.

SAĞDIÇ, O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. **Food Science and Technology – LWT**, v. 36, p. 467-473, 2003.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 7-15, 2011.

SHEKARFOROUSH, S. S.; FIROUZI, R.; KAFSHDOZAN, K. Antimicrobial activities of oregano and nutmeg essential oils combined with emulsifier/stabilizer compound in ready-to-cook barbecued chicken. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 15, n. 2, p. 159-163, 2014.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp. Importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

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

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

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 587-595, 2013.

TEPE, B. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, v. 90, p. 333-340, 2005.

VAN OMSON, G. et al. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrência/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

WEERAKKODY, N. S. et al. *In vitro* antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. **Food Control**, v. 21, p. 1408-1414, 2010.

# ***Conclusões finais***

---

## 1 Conclusões finais

As variações nas concentrações de óleo essencial de orégano e sal não produziram efeitos significativos na aceitação dos condimentos preparados de orégano. Porém, pela análise de cluster, foi possível verificar que a formulação com quantidades intermediárias de sal e OEO foi bem aceita pelos julgadores em relação aos atributos sensoriais sabor e avaliação global. As formulações de condimento com baixos teores de sal, independentemente da quantidade OEO, apresentaram maior intenção de compra. Por conseguinte, é possível reduzir a concentração de sal empregada nos condimentos, por questões salutareas.

Para ambas as espécies bacterianas, o efeito antimicrobiano *in vitro* foi similar para um mesmo tratamento, diferindo ( $P \leq 0,05$ ) entre a amostra contendo somente o OEO na maior concentração utilizada (0,4 %) e os tratamentos que empregavam a menor concentração do óleo (0,2 %) em combinação com o sal.

Não foi possível obter um modelo matemático significativo e preditivo para a contagem de *S. aureus*, e tampouco verificar o efeito do OEO e do sal sobre a espécie em questão, quando no estudo *in situ*. Porém, foi evidente o maior controle do desenvolvimento de *S. aureus* em relação à *E. coli*, no sistema *in situ*.

Para *E. coli* foi verificado o efeito do OEO e da interação entre o OEO e o sal sobre a contagem bacteriana, no condimento preparado de orégano, o que permitiu prever matematicamente a contagem da cepa em função das variáveis analisadas em um nível de significância de 10 %. As menores contagens de *E. coli* foram obtidas em concentrações de OEO de até 0,3 %, ou quando o sal foi empregado em teores de até 0,6 %. Ademais, o OEO e o sal exerceram efeitos inversos sobre o desenvolvimento de *E. coli*, o que permite explorar o uso do OEO em quantias superiores às empregadas no presente estudo, visando a redução dos níveis de sal no alimento e permitindo pequenas variações no desenvolvimento de *E. coli*.

## 2 Sugestões para pesquisas futuras

Estudo antimicrobiano *in situ* dos possíveis efeitos interativos do óleo essencial de orégano com os demais componentes presentes no sistema alimentício teste, dentre os quais se destacam as proteínas e os carboidratos.

Emprego de outros alimentos cujas concentrações de óleo essencial a serem empregadas não interfiram de modo adverso na aceitação sensorial do produto, visando elevar o teor do óleo essencial para a obtenção de maior efeito antibacteriano.

Avaliação do efeito da adição do óleo essencial encapsulado em alimentos, de modo a promover o controle do desenvolvimento microbiano.

Análise da atividade antibacteriana de combinações de óleos essenciais de diferentes especiarias visando a redução da carga microbiana em sistemas *in situ*.

# ***Anexos***

---

## ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/Campus de São José do Rio Preto/IBILCE/UNESP

### PROJETO DE PESQUISA

Título: Análise sensorial de alimentos

Área Temática:

Pesquisador: Ana Carolina Conti e Silva

Versão: 1

Instituição: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do Rio Preto

CAAE: 03719212.0.0000.5466

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 42100

Data da 13/06/2012

#### Apresentação do Projeto:

Apesar de presente projeto integrar a análise sensorial de alimentos desenvolvida durante uma disciplina no programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, a docente/pesquisadora responsável visa a publicação dos dados obtidos em eventos científico, e por esse motivo, solicitou a avaliação do CEP. Esse projeto será subdividido em 5 subprojetos, cada um com diferentes alunos participando.

#### Objetivo da Pesquisa:

Esse projeto será subdividido em 5 subprojetos, cada um com seus objetivos explicitados abaixo:  
 Subprojeto 1: Avaliar a influência do marketing na preferência do consumidor por diferentes marcas comerciais de barras de chocolate.  
 Subprojeto 2: Verificar a aceitação dos consumidores por condimentos preparados tipo patê de orégano.  
 Subprojeto 3: Avaliar a preferência dos provadores em relação a diferentes marcas de café tradicional e orgânico existentes no mercado local.  
 Subprojeto 4: Avaliar a aceitação sensorial de mousse de maracujá isento de lactose.  
 Subprojeto 5: Verificar a diferença e a aceitação sensorial de macarrão com farinha mista de sementes em relação a um macarrão integral comercial.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos para os provadores são mínimos, sendo que, anteriormente à aplicação dos testes sensoriais, os provadores responderão se não possuem alergias e/ou intolerâncias alimentares, além de outras possíveis patologias associadas aos alimentos testados. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será colhido pelos alunos participantes de cada subprojeto. No caso de eventual problema de saúde (efeito adverso) decorrente da participação nos testes sensoriais, o voluntário será encaminhado à Seção Técnica de Saúde (UNAMOS), IBILCE.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem delineado e os produtos a serem experimentados são de consumo comum e de marcas comerciais, além de serem manipulados utilizando-se as Boas Práticas de Manipulação/Fabricação.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está de acordo com a Resolução 196/96 - CONEP.

#### Recomendações:

Sem recomendações

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou lista de inadequações.

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Nenhuma consideração.

SAO JOSE DO RIO PRETO, 24 de Junho de 2012

---

Assinado por:

Ana Elizabete Silva

## ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa “Análise sensorial de alimentos” sob responsabilidade da pesquisadora Ana Carolina Conti e Silva. O estudo será realizado através de análises sensoriais de alimentos comerciais ou desenvolvidos para avaliação da aceitabilidade ou percepção da diferença entre os mesmos. A pesquisa oferecerá riscos mínimos à sua saúde, pois os produtos a serem experimentados são de consumo comum e de marcas comerciais, além de serem manipulados utilizando-se as Boas Práticas de Manipulação/Fabricação. Você poderá consultar a pesquisadora responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone da instituição, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo, e estes últimos apenas serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. No caso de eventual problema de saúde (efeito adverso) decorrente de sua participação nos testes sensoriais, você será encaminhado à Seção Técnica de Saúde (UNAMOS), situado à Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth – São José do Rio Preto/SP – Telefones (17) 3221.2415 – 3221.2416 – 3221.2485.

Diante das explicações, se você concorda em participar deste projeto, por favor, informe seus dados abaixo, coloque sua assinatura a seguir e rubrique cada página deste termo.

Nome: \_\_\_\_\_ R.G. \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

São José do Rio Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012

\_\_\_\_\_  
Usuário ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

OBS.: Termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante e a outra ao pesquisador.

Nome: Ana Carolina Conti e Silva.	Cargo/Função: Professor Assistente Doutor
Instituição: Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos/Ibilce/Unesp	
Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jd. Nazareth – São José do Rio Preto/SP – Telefone: (17) 3221 2548	
Projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP São José do Rio Preto – Fone (17) 3221 2545 / 3221 2384	

**ANEXO 3 – Ficha sensorial de caracterização dos provadores**

Nome: _____	Idade: _____
Sexo	
<input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Feminino
Indique sua frequência de consumo de patê.	
<input type="checkbox"/> consumo diariamente (consumo muito)	
<input type="checkbox"/> consumo semanalmente (consumo moderadamente)	
<input type="checkbox"/> consumo quinzenalmente (consumo ocasionalmente)	
<input type="checkbox"/> consumo mensalmente (consumo pouco)	
<input type="checkbox"/> consumo raramente (consumo muito pouco)	
<input type="checkbox"/> não consumo esse tipo de produto	

**ANEXO 4 – Ficha de avaliação sensorial da aceitação das amostras de condimento preparado de orégano**

Nome: \_\_\_\_\_

Você está recebendo uma amostra de patê de orégano. Por favor, prove-a e avalie cada item segundo a escala abaixo.

9 – gostei extremamente  
 8 – gostei muitíssimo  
 7 – gostei moderadamente  
 6 – gostei levemente  
 5 – não gostei nem desgostei  
 4 – desgostei levemente  
 3 – desgostei moderadamente  
 2 – desgostei muitíssimo  
 1 – desgostei extremamente

<b>Amostra</b>	
Aparência	
Aroma	
Textura	
Sabor	
Avaliação global	

Indique o que você mais gostou e/ou desgostou: \_\_\_\_\_

---

Em relação a este produto, você:

( ) Certamente compraria  
 ( ) Provavelmente compraria  
 ( ) Tenho dúvida se compraria  
 ( ) Provavelmente não compraria  
 ( ) Certamente não compraria