



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONDIMENTARES COM POTENCIAL DE USO COMO CONSERVANTE EM CARNE E HAMBÚRGUER BOVINO E TESTES DE ACEITAÇÃO

LIDIANE NUNES BARBOSA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para Obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microrganismos.

Prof. Dr. Ary Fernandes Junior

BOTUCATU – SP

2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
PLANTAS CONDIMENTARES COM POTENCIAL DE USO COMO
CONSERVANTE EM CARNE E HAMBÚRGUER BOVINO E TESTES DE
ACEITAÇÃO

LIDIANE NUNES BARBOSA

PROF. DR. ARY FERNANDES JUNIOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para Obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microrganismos.

Prof. Dr. Ary Fernandes Junior

BOTUCATU – SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Barbosa, Lidiane Nunes.

Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação / Lidiane Nunes Barbosa. – Botucatu : [s.n.], 2010

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010.

Orientador: Ary Fernandes Junior

Assunto CAPES: 21201028

1. Carne moída - Avaliação 2. Microbiologia de alimentos 3. Condi-
mentos CDD 664.5

Palavras-chave: Ação antimicrobiana; Carne moída; Hambúrguer; Óleos essenciais

*“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco;
à medida que vamos adquirindo conhecimentos,
instala-se a dúvida”*

Johan Goethe

AGRADECIMENTOS

À Deus por permitir que mais esta etapa fosse cumprida não me desamparando em nenhum momento desta caminhada.

Aos meus pais Marina e Luiz Carlos que apesar de todas as dificuldades nunca mediram esforços para me ajudar e sempre foram grandes incentivadores. Obrigada por todo o amor, carinho e dedicação e também por sempre almejaram para mim o melhor futuro possível muitas vezes colocando seus próprios sonhos em segundo plano.

Aos meus irmãos Márcia e Lincon por todo o apoio ao longo destes anos. O carinho de vocês com certeza me fortaleceu e me permitiu chegar até aqui.

Às minhas queridas amigas Adriany e Sinara que mesmo antes de tudo parecer possível já acreditavam em mim e isso me fez mais forte. Obrigada pela amizade inabalável em todos estes anos.

À Renata minha grande amiga, irmã, conselheira, incentivadora pela amizade e pelo apoio nestes sete anos em Botucatu sendo a companheira de todas as horas.

Às companheiras da República SóFadinhas por todos os momentos felizes que vivemos.

Aos amigos Giorgio, Kairo, república Manicômio, Érika, Renato, Marcela, Diogo, Capello, Stein, Giseli e Priscila pelo companheirismo e momentos de descontração.

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

À Companhia Brasileira de Esterilização pela irradiação das amostras utilizadas neste trabalho sem a qual tudo teria sido mais difícil.

Ao departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Ciências Agronômicas por emprestarem sua estrutura para a realização das análises centesimais, e especialmente ao técnico João por toda a ajuda no decorrer do processo.

Agradeço também ao departamento de Educação por disponibilizar o laboratório de Nutrição e Dietética para que eu pudesse realizar a análise sensorial. À prof^a Norka Beatriz por todo apoio dado nesta etapa do meu trabalho.

Ao prof^o Dr. Luciano Barbosa do departamento de Bioestatística pelas análises estatísticas.

Ao prof^o Dr. Júlio Toshimi Doyama do departamento de Química e Bioquímica pelas análises cromatográficas dos óleos essenciais.

À todos os funcionários do departamento de Microbiologia e Imunologia que desde 2003, quando me receberam de braços abertos, sempre foram amigos e prestativos.

À Prof^a Dr^a Vera Lúcia Mores Rall por todas as idéias, sugestões, e contribuições dadas ao longo de toda iniciação científica e mestrado sem as quais este trabalho não teria sido possível. Também por ter aceitado o convite para participar das bancas de qualificação e mestrado. Agradecimento especial por ter me recomendado ao Prof^o Dr. Ary Fernandes Junior quando não pode me receber como estagiária.

Ao prof. Dr. Rubens Monti por ter aceitado o convite para fazer parte desta banca dando sua preciosa contribuição a este projeto.

As queridas amigas Bruna, Cristiane, Gabriela, Isabella e Nathália por toda ajuda, dedicação e amizade que felizmente não se restringiram ao laboratório.

E finalmente ao Profº Dr. Ary Fernandes Junior que muito mais que um orientador foi a pessoa que com muita dedicação sempre procurou extrair o melhor de seus alunos. Agradeço por toda a paciência, confiança, amizade e atenção. Um verdadeiro exemplo de educador. Muito obrigada por tudo e que Deus continue te abençoando.

“Ser educador é exercer a mais refinada profissão. Um profissional na arte de melhorar o ser humano, um missionário no desenvolvimento da consciência. Ser educador é verdadeiramente estar comprometido com as pessoas, não somente com o conhecimento, mas acima de tudo com o bom uso desses conhecimentos”.

Rosângela C. Silva

SUMÁRIO

	Página
Resumo	01
Abstract	03
Introdução	05
1- Patógenos de origem alimentar: <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	05
2- Carne moída: um alimento passível de contaminação microbiana.....	11
3- Métodos para conservação de alimentos.....	14
4- Óleos essenciais.....	17
5- Mecanismos da ação antimicrobiana de óleos essenciais.....	21
6- Análise sensorial de alimentos.....	25
Objetivos	29
Referências	29
Capítulo I	36
Resumo	37
Abstract.....	38
1. Introdução.....	39
2. Materiais e Métodos.....	40
2.1. Obtenção dos óleos essenciais e caracterização química.....	40
2.2. Linhagens bacterianas.....	41
2.3. Modelos cárneos.....	41
2.4. Análise centesimal.....	42
2.5. Determinação da ação antimicrobiana dos óleos essenciais sobre bactérias patogênicas na carne moída <i>in natura</i> e hambúrguer bovino.....	42
2.6. Análise estatística.....	43
3. Resultados.....	43
4. Discussão.....	47
5. Conclusões.....	49
6. Agradecimentos.....	50
7. Referências.....	50
Capítulo II	55
Resumo.....	56
Abstract.....	57

1. Introdução.....	58
2. Materiais e Métodos.....	59
2.1. Plantas e óleos essenciais.....	59
2.2. Composição química.....	60
2.3. Modelos cárneos.....	60
2.4. linhagens bacterianas.....	60
2.5. Testes de sensibilidade no modelo cárneo.....	61
2.6. Análise sensorial.....	61
2.7. Análise estatística.....	62
3. Resultados.....	62
4. Discussão.....	64
Referências.....	66
Capítulo III.....	70
Resumo.....	71
Abstract.....	72
1. Introdução.....	73
2. Materiais e Métodos.....	74
2.1. Obtenção dos óleos essenciais e caracterização química.....	74
2.2. Modelos cárneos.....	75
2.3. Análise centesimal.....	75
2.4. Determinação da ação antimicrobiana dos óleos essenciais sobre a microbiota de carne bovina moída <i>in natura</i>	76
3. Resultados.....	76
4. Discussão.....	80
5. Conclusões.....	81
6. Agradecimentos.....	82
7. Referências.....	82
Apêndices.....	87
I- Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat.....	88
II- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	92
III- Termo de consentimento livre e esclarecido.....	93
IV- Capítulo I em inglês.....	94

RESUMO

Resumo

O estudo de produtos naturais com potencial de aplicação em alimentos tem causado cada vez mais interesse devido à necessidade de produzir alimentos processados ao mínimo, com menos aditivos sintéticos, propriedades organolépticas preservadas e extensa vida de prateleira. Neste contexto, óleos essenciais de plantas condimentares já utilizados como flavorizantes e com elevado potencial antimicrobiano ganham uma nova perspectiva de uso. A dissertação apresentada encontra-se dividida em introdução geral e 3 manuscritos, sendo que cada um teve como objetivos: **Artigo I)** verificar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OE) de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Ocimum basilicum* (manjeriço) e *Origanum majorana* (manjerona) em amostras de carne moída e hambúrguer bovino contaminadas artificialmente com *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis* em ensaios com 3 horas de contato e depois utilizando uma concentração abaixo da considerada eficiente em ensaios com 0, 6, 24 e 48 horas; **Artigo II)** verificar o grau de aceitação de hambúrguer acrescidos destes mesmos óleos através de análise sensorial utilizando a escala hedônica de nove pontos e **Artigo III)** verificar a atividade antimicrobiana destes OE sobre a microbiota normal de carne moída obtida no varejo. Nos ensaios com 3 horas de contato, o OE de manjerona foi o que apresentou melhor eficiência antimicrobiana enquanto o de manjeriço foi o menos eficiente. Nas amostras de hambúrguer o NaCl aparentemente agiu de forma sinérgica requerendo menores concentrações de OE. Nos ensaios de variação temporal o OE de orégano foi capaz de reduzir as contagens a não detectável em três dos quatro modelos de variação temporal estudados. Em relação à análise sensorial quanto aos hambúrgueres analisados crus não houve rejeição. Para as amostras grelhadas, duas adições de óleos se destacaram: manjerona a 0,03%, tendo a melhor média de aceitação (7,33) e tomilho (0,05%) com a pior (4,25). Assim, verificou-se que as concentrações aceitas nos testes sensoriais não correspondem as consideradas eficientes nos testes de sensibilidade. Nos ensaios sobre a microbiota da carne verificou-se que os OE foram ineficazes sobre os microrganismos mesófilos até a concentração máxima testada de 2,2%, enquanto para os psicrotróficos, os OE mais eficientes foram o de orégano e tomilho. Quanto a análise química dos OE, e respectivos compostos majoritários, a literatura menciona significativa influência sobre a membrana bacteriana alterando sua permeabilidade e estrutura. Assim, a utilização dos óleos essenciais em alimentos ainda necessita de estudos, visando determinar interações com os constituintes dos alimentos, e estabelecer modelos para otimização do efeito antimicrobiano bem como os níveis tolerados para o seu consumo.

Palavras chave: ação antimicrobiana, óleos essenciais, carne moída, hambúrguer.

ABSTRACT

Abstract

The studies of natural products with potential applications in food has caused increasing concern since the need to produce processed foods to a minimum, with fewer synthetic additives, organoleptic properties preserved and extended shelf life. In this context essential oils from plants used as condiments for flavoring and high antimicrobial potential gain a new perspective of use. A dissertation presented is divided into 3 general introduction and manuscripts, each one aimed respectively: **Article I**) to verify the antimicrobial activity of essential oils (EOs) of *Origanum vulgare* (oregano), *Thymus vulgaris* (thyme), *Ocimum basilicum* (basil) and *Origanum majorana* (marjoram) in samples of minced meat and hamburger beef artificially contaminated with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* in trials with 3 hours of contact and then using a concentration below found effective in trials with 0, 6, 24 and 48 hours, **Article II**) to check the acceptability of these same burger plus oil by sensory analysis using a hedonic scale of nine points and **Article III**) to verify the antimicrobial activity of EO on the normal flora of ground beef produced at retail. In tests with 3 hours of contact, EO marjoram showed the best antimicrobial efficiency while basil was the least efficient. Samples of hamburger NaCl apparently acted additively requiring lower concentrations of EO. In tests of the temporal variation of oregano EO was able to reset the scores in three of the four models of temporal variation study. For sensory analysis with regard to raw hamburger analyzed no rejection. For grilled samples, two additions of oil stood out: the marjoram to 0.03% with best average acceptance (7.33) and thyme (0.05%) with the worst average (4.25). Thus, it was found that the concentrations accepted in sensory tests do not match those considered effective in sensitivity tests. In tests on the microbiology of meat was found that the EO have been ineffective on the microorganisms to the highest concentration tested of 2.2%, while for the psychrotrophic, the EO were more efficient in the oregano and thyme. As for chemical analysis of the EO, and their major compounds, the literature suggests significant influence on the bacterial membrane permeability and altering its structure. Thus, the use of essential oils in food still needs to be studied in order to determine interactions with the constituents of food, and establish models for optimization of antimicrobial effect as well as permissible levels for drinking.

Key words: antibacterial activity, essential oils, minced meat, burger.

—INTRODUÇÃO

Introdução

1- Patógenos de origem alimentar: *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes*

As doenças de origem alimentar, ou transmitidas por alimentos, são de vital interesse para saúde pública. *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* são responsáveis por um grande número de surtos, casos e óbitos (Oussalah, et al., 2007).

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são definidas como qualquer doença infecciosa ou de natureza tóxica causada pelo consumo de alimentos ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, prions, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados. A maioria, no entanto, são de origem microbiana. (World Health Organization- WHO, 2004; Ministério da Saúde, 2005).

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

O *Food and Drug Administration* (FDA) classifica as doenças transmitidas por alimentos como a principal preocupação de segurança alimentar, visto que os episódios de toxinfecção alimentar ultrapassam em número qualquer outro tipo de contaminação por alimento (Sizer & Whitney, 2003).

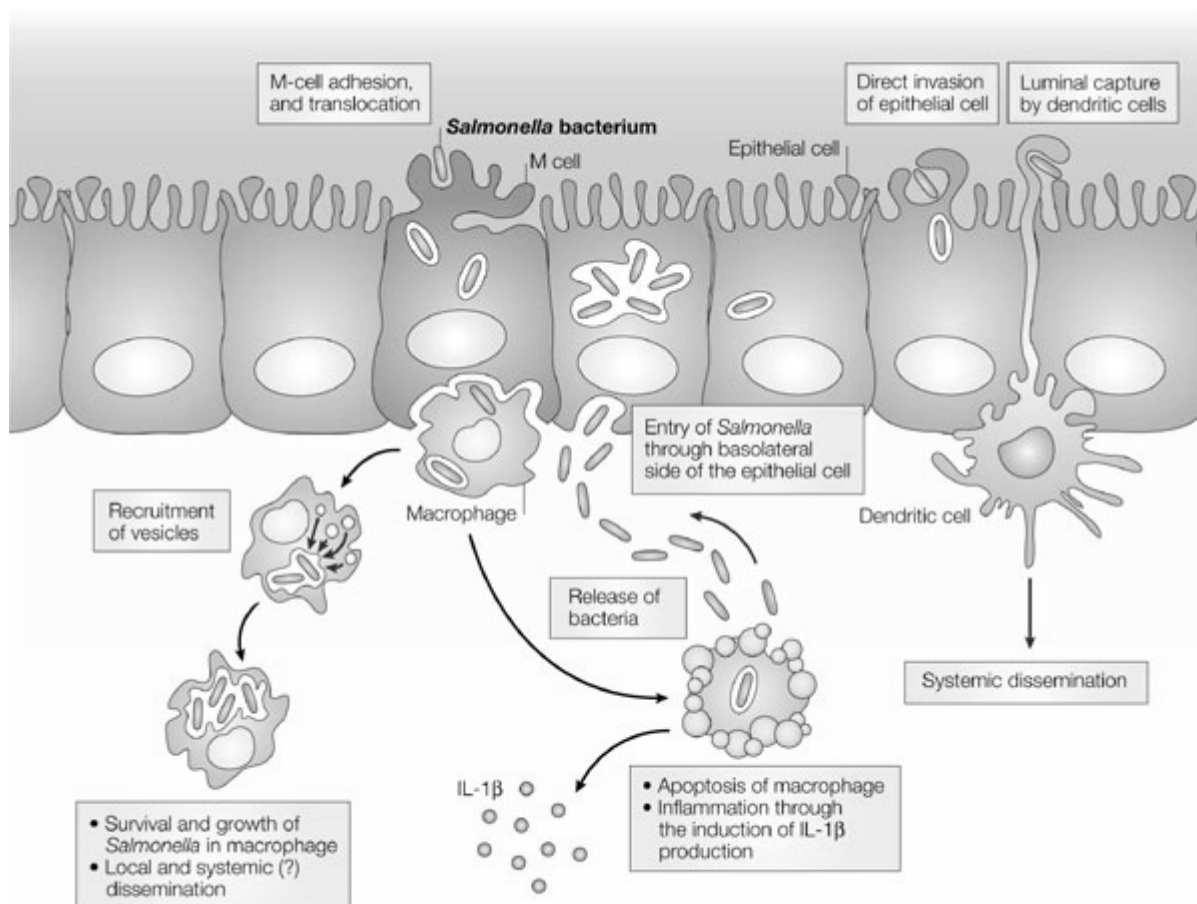
De acordo com *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) 2005, a maioria das infecções de origem alimentar reconhecidas é causada pelas bactérias *Campylobacter*, *Salmonella*, e *E. coli* O157:H7, e por um grupo de vírus conhecido como calicivírus, também conhecido como Norwalk e Norwalk-like virus.

Salmonella pode causar doenças diarreicas em humanos e foram descobertas pelo cientista americano Salmon. (CDC, 2009). As salmonelas são bacilos móveis que tipicamente fermentam a glicose e a manose sem produção de gás, mas não fermentam a lactose nem a sacarose. A maioria produz H₂S, é móvel, com flagelos peritríquios (Brooks, et al., 2008). É uma bactéria comum no intestino de aves, répteis e mamíferos, podendo chegar aos seres humanos através de diferentes alimentos de origem animal. A salmonelose, normalmente inclui febre, diarreia e cólicas abdominais 12 a 72 horas após a infecção. A doença geralmente dura de 4 a 7 dias, e a maioria das pessoas se recupera sem tratamento. Em pessoas com sistema imunológico debilitado, a bactéria pode invadir a corrente sanguínea e causar infecções mais graves. (CDC, 2005; CDC, 2009).

Os sorotipos desse gênero atravessam a camada epitelial intestinal, alcançam a lâmina própria (camada na qual as células epiteliais estão ancoradas), onde proliferam. São

fagocitadas pelos monócitos e macrófagos, resultando em resposta inflamatória, decorrente da hiperatividade do sistema retículo endotelial. Ao contrário do que ocorre na febre tifóide, nas enterocolites, a penetração de *Salmonella* spp. fica limitada à lâmina própria. Nestes casos, raramente se observa septicemia ou infecção sistêmica, ficando a infecção restrita à mucosa intestinal. A resposta inflamatória está relacionada também com a liberação de prostaglandinas, que são estimuladoras de adenilciclase, o que resulta em um aumento de secreção de água e eletrólitos, provocando diarreia aquosa (Shinohara et al., 2008).

Na Figura 1, estão esquematizadas as estratégias que permitem a *Salmonella* spp. atravessar a barreira intestinal, sobreviver e proliferar em tecidos intestinais (Sansonetti, 2004). A *Salmonella* spp. atravessa as células M do epitélio folicular associada principalmente as placas de Peyer do íleo, mas possivelmente também ao cólon. Nesta localização subepitelial, *Salmonella* spp. poderia causar apoptose de macrófagos através de efetores usando um tipo de sistema secretor III que é codificado por SPI1 (ilha de patogenicidade *Salmonella* 1), e desencadeando inflamação. *Salmonella* spp. também pode mudar a expressão de SPI2, que codifica um tipo de sistema secretor III que permite a injeção de proteínas efetoras do vacúolo endocítico para o citoplasma celular, permitindo assim que as bactérias modifiquem o vacúolo que apóia a sobrevivência e multiplicação bacteriana. Isto fornece às bactérias a capacidade de invadir células epiteliais basolaterais, devido à expressão de efetores SPI1 e a disseminar sistematicamente. Alternativamente, *Salmonella* spp. também pode entrar diretamente nas células intestinais pelo pólo apical da célula ou ser capturadas pelas células dendríticas, que emitem pseudópodes entre as células epiteliais. O último processo promove a disseminação sistêmica de *Salmonella* spp.



Nature Reviews | Immunology

Figura 1. Estratégias de sobrevivência de *Salmonella* spp. no intestino. (Fonte: Sansonetti, 2004).

Em estudo realizado no México, o papel de produtos vegetais como veículo de transmissão de salmonelas foi verificado. Noventa e oito amostras de um total de 100 estavam contaminadas com *Salmonella*. *Salmonella* enterica sorovar Typhimurium foi isolada em maior porcentagem (23,9%). Das bactérias isoladas, 27,6% eram cepas não tipáveis. *Salmonella* foram isoladas de 12% das amostras de salsa, 11% de coentro, 9% de brócolis, 9% de couve-flor, 9% de couve-cravinho, 9% de beldroega; salada de negro (*Portulaca oleracea*), 7% de alface, 7% de espinafre, 7% de agrião, 6% de salsa chinesa, 4% de beterraba, 3% de aipo, 3% de alface lisa, 1% de repolho e 1% das amostras de batata, sendo que a presença de *Salmonella* Typhi na salsa foi significativa. Estes resultados indicaram que vegetais crus ou minimamente processados podem ser contaminados com salmonelas, levando à infecção direta do consumidor ou a contaminação cruzada com outros produtos alimentares (Quiroz-Santiago et al., 2009).

Borowsky et al. (2007) verificaram a contaminação por *Salmonella* em carne de porco, sendo isolada em 93,3% das amostras de carne de porco picada coletadas em matadouros apresentando contagens entre <3 e 240 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g determinado pelo método do Número mais Provável. Embora os valores encontrados não sejam altos, a contaminação cruzada com produtos prontos para consumo diretamente através de matérias-primas como a carne de porco ou indiretamente, através de superfícies de cozinha contaminadas pode representar um perigo para a saúde.

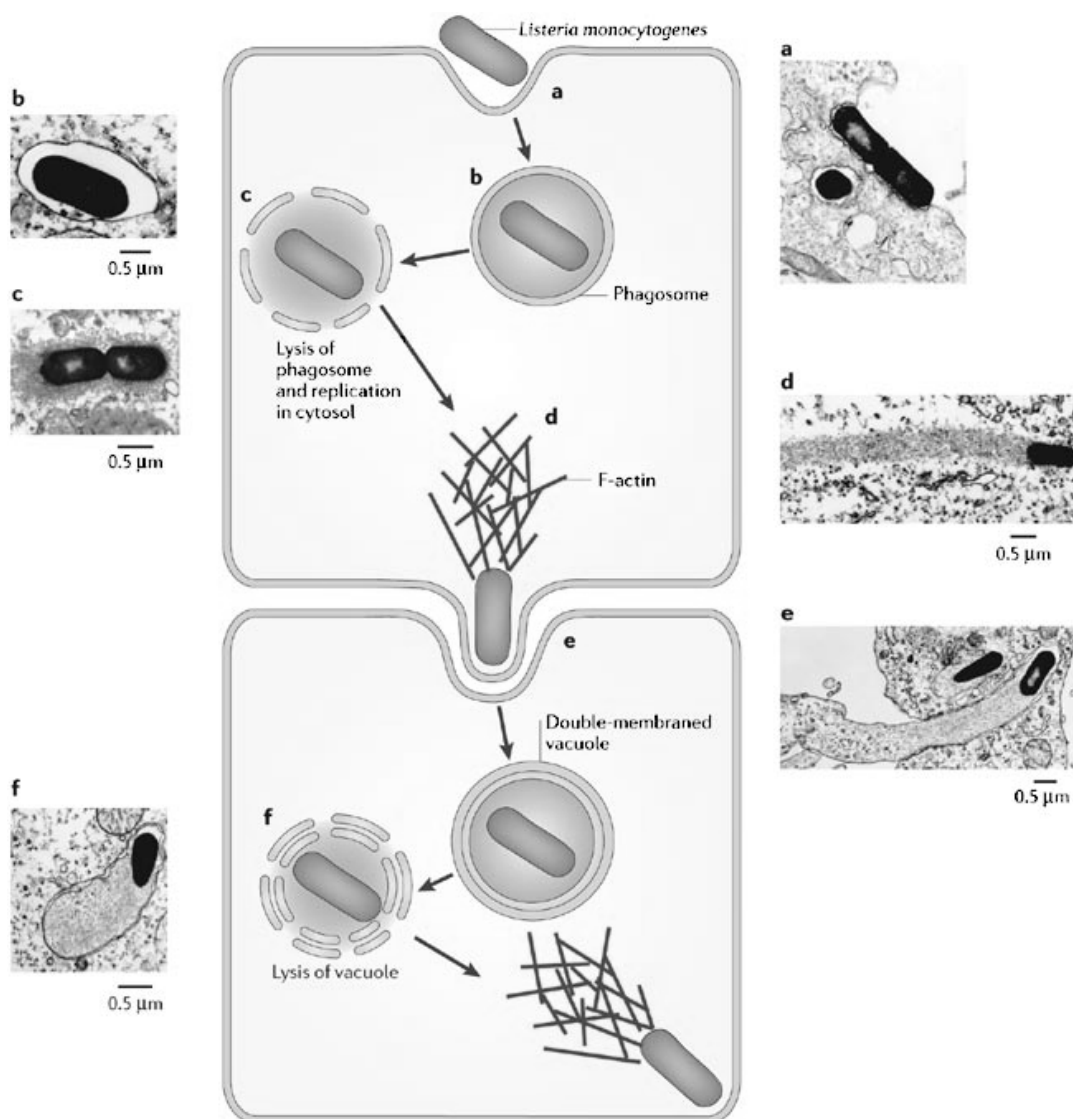
A *Listeria monocytogenes* é um bastonete curto Gram-positivo com 1-2 μm de comprimento, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, catalase-positivo, oxidase-negativo e móvel. A característica que distingue *L. monocytogenes* de outros patógenos de origem alimentar como a *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 é a taxa de mortalidade mais elevada, além da menor dose infectante requerida (Singh et al., 2003; Brooks, et al., 2008).

A listeriose é uma infecção grave causada pela ingestão de alimentos contaminados com a bactéria *L. monocytogenes* e afeta principalmente pessoas de idade avançada, as mulheres grávidas, recém-nascidos e adultos com o sistema imunológico enfraquecido. No entanto, pessoas sem esses fatores de risco raramente são afetadas. Uma pessoa com listeriose tem febre, dores musculares, e às vezes sintomas gastrintestinais, como náuseas e diarreia. Se a infecção atingir o sistema nervoso, podem ocorrer sintomas como dor de cabeça, rigidez do pescoço, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões. Mulheres grávidas infectadas podem ter apenas uma leve síndrome gripal, porém, as infecções durante a gravidez podem levar ao aborto ou natimorto, prematuro ou infecção dos recém-nascidos (CDC, 2009).

L. monocytogenes é um patógeno mesófilo, com tendência psicrotrófica. É amplamente distribuído na natureza e seu controle nos alimentos é difícil devido sua elevada tolerância às condições inibitórias, quando comparado a outros patógenos de origem alimentar (Farber & Peterkin, 1991). Esta bactéria é encontrada no solo e na água, podendo os vegetais serem contaminados pelo solo ou pelo estrume usado como adubo. Animais podem carregar a bactéria sem apresentar a doença e por isto contaminar os alimentos de origem animal como carnes e laticínios. A bactéria foi encontrada em uma variedade de alimentos crus, carnes mal cozidas e legumes, bem como em alimentos industrializados que se contaminaram durante ou após o processamento, como queijos moles e frios (CDC, 2009).

Na Figura 2 observa-se uma representação esquemática e microscopia eletrônica do ciclo de vida da *L. monocytogenes*. **a** | *L. monocytogenes* induz a sua entrada em um fagócitos. **b** | Bactérias são internalizadas em um vacúolo (também conhecido como um fagosomo). **c, d** | A membrana do vacúolo é rompida pela secreção de duas fosfolipases, plcA e plcB, que

formam poros para toxina listeriolisina O. As bactérias são liberadas para o citoplasma, onde se multiplicam e começam a polimerizar actina. **e** | Polimerização da actina permite que as bactérias passem para uma célula vizinha, formando saliências na membrana plasmática. **f** | Com a entrada na célula vizinha, as bactérias estão em um vacúolo de membrana dupla, de onde conseguem ser liberadas para perpetuar o ciclo.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Figura 2. Representação esquemática e microscopia eletrônica do ciclo de vida da *L. monocytogenes*. (Fonte: Hamon, et al., 2006).

Após a bactéria penetrar no corpo através do trato gastrointestinal, uma proteína de superfície da parede celular denominada internalina interage com a caderina que é um

receptor existente nas células epiteliais, ocorrendo a fagocitose. A seguir, a bactéria envolvida num fagolisossomo, com valor baixo de pH, passa a produzir listeriolisina O, enzima que provoca lise da membrana do fagolisossomo de modo que os microrganismos escapem para o citoplasma da célula epitelial, proliferem e induzam a polimerização da actina na célula do hospedeiro, propelindo-os para a membrana celular. Ao serem empurrados contra a membrana da célula hospedeira, causam a formação de protusões alongadas, denominadas filópodes, que são ingeridos por células epiteliais adjacentes, macrófagos e hepatócitos; as listerias são liberadas e o ciclo recomeça (Brooks, et al., 2008).

Em pesquisa realizada por Mengesha et al. (2009) objetivando verificar a ocorrência de *Listeria* em 711 amostras de alimentos prontos para consumo, verificou-se que 189 (26,6%) amostras foram positivas para *Listeria*, sendo 34 (4,8%) *L. monocytogenes*. Carne de porco foi a mais contaminada com *Listeria* (62,5%), seguido de carne picada (47,7%), sorvetes (42,7%), queijos de pasta mole (16,8%), carcaças de frango (16%) e biscoitos (12,1%). Todas as amostras de leite pasteurizado e queijo *cottage* examinadas foram negativos para esta bactéria. Linhagens de *L. monocytogenes* foram isoladas em sorvetes (11,7%), pães (6,5%), e queijos de pasta mole (3,9%) e nos produtos de carne que variam de 3,7% para 5,1%. A presença de *L. monocytogenes* em alguns alimentos pronto para consumo pode representar riscos para a saúde pública para o consumidor, especialmente para os grupos de alto risco.

O salame tem sido considerado um produtos com baixo risco de causar listeriose devido à obstáculos criados durante o processo de fabricação, como baixo pH e Aa, alta concentração de sal e presença de bactérias lácticas (BAL). No entanto, vários estudos tem detectado a sobrevivência de *L. monocytogenes* nesses produtos. Degenhardt & Sant'Anna (2007) testaram três formulações do produto, sendo uma padrão, uma com inoculação da cultura *Lactobacillus plantarum* e outra com adição de 2% de lactato de sódio. Verificaram que os salames contaminados naturalmente apresentaram discreto aumento da população de *L. monocytogenes* no início do processo, seguidos por redução até o final da maturação. Os salames contaminados artificialmente tiveram redução considerável da contagem de *L. monocytogenes* não havendo diferenças significativas entre os tratamentos. Os autores concluíram que mesmo não havendo diferença significativa o uso de culturas bioprotetoras como *Lactobacillus plantarum* são altamente recomendadas em produção comercial de salames tipo italiano. No entanto, o uso lactato de sódio deve ser melhor avaliado, principalmente quando usado com outros substâncias inibidoras.

2- Carne moída: um alimento passível de contaminação microbiana

A carne é um dos produtos mais consumidos no mundo. Quanto ao aspecto nutricional, é uma fonte ideal de aminoácidos essenciais e, em menor extensão, de alguns minerais. Entre os atributos mais positivos da carne está a sua habilidade de suprir o ferro, eaumentar a absorção desse íon de fontes não cárneas consumidas concomitantemente. Seu grande consumo também se deve a grande variedade de técnicas de preparo a que pode ser submetida e ao seu sabor (Verruma-Bernardi, 2001; Lawrie, 2005).

Segundo a Instrução Normativa nº 83 de 21 de novembro de 2003, entende-se por carne moída o produto obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos (aplica-se também ao produto obtido da carcaça de búfalos), seguido de imediato resfriamento ou congelamento, com teor máximo de 15% de gordura (BRASIL, 2003).

Em relação aos tipos de alimentos, dentre outros produtos frequentemente envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares, as carnes merecem destaque, pois possuem elevada atividade de água, pH favorável ao crescimento de microrganismos e elevado percentual de proteínas, minerais e vitaminas, tornando-as excelentes meios de cultura para o desenvolvimento de patógenos e deteriorantes (Cardoso & Araújo, 2003). A carne moída, em particular, apresenta maiores problemas microbiológicos que os cortes, por sofrer maior manipulação e possuir maior relação área/ volume (Conceição et al., 2003).

Sendo a carne moída um alimento muito perecível, o prolongamento de sua vida útil é um objetivo importante para os produtores. A perda de frescor da carne após moagem é resultado, principalmente, da atividade de enzimas endógenas e exógenas, oxidação dos lipídios e pigmentos e putrefação bacteriana. Em geral, a deterioração bacteriana da carne é causada por microrganismos que mostram maior taxa de crescimento durante armazenamento (Fik et al., 2008).

O potencial de crescimento dos microrganismos psicrotróficos deteriorantes durante o período prolongado de armazenamento refrigerado seguido de diminuição das qualidades organolépticas também são aspectos considerados bastante preocupantes. Com períodos de tempo suficientes sob temperatura de refrigeração, várias espécies de bactérias psicrotróficas podem atingir níveis que podem causar deterioração da carne (Djenane et al., 2005).

Na Tabela 1, está apresentada a composição química da carne antes do processo degradativo.

Tabela 1. Composição química de um músculo normal de mamífero adulto após o *rigor mortis*, mas antes das mudanças degradativas *post mortem*.

Componentes	% (peso úmido)	
1. ÁGUA		75,0
2. PROTEÍNA		19,0
(a) Miofibrilar	11,5	
(b) Sarcoplasmáticas	5,5	
(c) Tecido conjuntivo e organelas	2,0	
3. LIPÍDEOS		2,5
4. CARBOIDRATOS		1,2
5. SUBSTÂNCIAS NÃO-PROTEICAS SOLÚVEIS		2,3
(a) Nitrogenosas	1,65	
Creatina	0,55	}
inosina monofosfato	0,30	
nucleotídeos di e tri fosfopiridina	0,10	
Aminoácidos	0,35	
carnosina, anserina	0,35	
(b) Inorgânicas	0,65	
fósforo solúvel total	0,20	}
Potássio	0,35	
Sódio	0,05	
Magnésio	0,02	
Cálcio, Zinco, traços de metais	0,03	
6. VITAMINAS		
Vitaminas solúveis e insolúveis diversas em pequenas quantidades		

Fonte: Lawrie, 2005.

Com a industrialização da carne, surgiu uma alternativa para o aproveitamento dos cortes menos nobres, aumentando o lucro dos abatedouros. A diversificação da oferta inclui um grande número de produtos como almôndegas, hambúrgueres, empanados, linguiças, mortadelas, salames, entre outros. Nos últimos anos, especial atenção tem sido dada a alimentos com menor tempo de preparo para o consumidor, de preço acessível, sabor agradável, de boa qualidade e também com menor teor de gordura (Costa, 2004).

Hambúrguer é um produto cárneo industrializado, obtido de carne moída dos animais de açougue, adicionado ou não de tecido adiposo e ingredientes, moldado e submetido a processo tecnológico adequado”. “Trata-se de produto cru, semi-frito, cozido, frito, congelado ou resfriado” de acordo com sua classificação (BRASIL, 2000). Este alimento se tornou popular pela praticidade que representa, pois possui nutrientes que alimentam e saciam a fome rapidamente, o que combina com o estilo de vida de quem se instala em centros urbanos (Hautrive et al., 2008). Devido a não ter outra proteção eficiente além do frio e, em

consequência da grande superfície exposta, este produto está sujeito aos mesmos problemas da carne moída.

Em estudo realizado por Conceição et al.(2003) avaliações microbiológicas foram realizadas em carne bovina moída, embalada em atmosfera modificada. Os resultados mostraram que as contagens iniciais de psicrotóxicos foram elevadas, variando de 10^6 a 10^7 UFC/g. Nas temperaturas de 4 e 6°C, a carne moída em atmosfera modificada se mostrou inadequada para o consumo por apresentar odor desagradável e coloração escura, com contagem de psicrotóxicos de 10^8 UFC/g embora, dentro do prazo de validade estabelecido. Os autores ressaltaram que o processo de moagem é um ponto crítico no controle da qualidade microbiológica da carne.

Em estudo para avaliação das condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne e mãos de manipuladores em cinco estabelecimentos comerciais, visando diagnosticar interferência na qualidade microbiológica da carne moída, verificou-se através das análises microbiológicas que a higienização das máquinas de moer e mãos dos manipuladores eram realizadas de forma inadequada (desacordo com padrões da *American Public Health Association*). Salientaram os autores que isto seria o responsável pelo significativo aumento da contagem de microrganismos deteriorantes e patogênicos na maioria das amostras das carnes após a moagem e manipulação, tornando-as muitas vezes impróprias ao consumo humano (Oliveira et al., 2008).

Barros et al. (2007) realizaram pesquisa com o objetivo de identificar os principais pontos de contaminação microbiológica na linha de processamento de carne, e analisaram 443 amostras de equipamentos, instalações e produtos coletados em 11 estabelecimentos, sendo 1 abatedouro e 10 açougues, todos localizados no Estado do Paraná, Brasil. Os principais pontos de contaminação identificados em ordem decrescente nos açougues foram caixas de aço inoxidável, amaciadores de carnes, moedores, facas, misturadores, embutideiras, caixas plásticas, pisos e ralos. No abatedouro, os principais pontos foram embutideiras, superfícies da plataforma de abate, pisos e ralos. Os produtos cárneos que apresentaram maiores níveis de contaminação foram linguças frescas e carne moída. O nível de contaminação média por mesófilos aeróbios em amostras de carne de estabelecimentos de comércio e equipamentos do matadouro foi de 4,68 log UFC/cm². O nível de contaminação média de coliformes totais foi de 2,55 log UFC/cm² e para *E. coli* foi de 1,80 log UFC/cm². A média logarítmica de bolores foi de 3,20 log UFC/cm² e leveduras 3,21 log UFC/cm².

3- Métodos para conservação de alimentos

As observações do homem em relação aos alimentos disponíveis e o ambiente em que viviam, muito provavelmente, possibilitaram o desenvolvimento das primeiras técnicas de conservação como, por exemplo, a desidratação, a salga ou mesmo o resfriamento. Atualmente, percebe-se grande evolução destas técnicas, embora técnicas antigas ainda sejam empregadas isoladamente ou em associações com outras mais recentes. Desta maneira, tais procedimentos possibilitam a construção de barreiras efetivas para controle de microrganismos e também no aumento da vida útil de inúmeros produtos alimentares.

A conservação do alimento pode ser conseguida através do uso de métodos drásticos como a esterilização, que mata os microrganismos capazes de se desenvolverem em alimentos, ou aqueles que eliminam grande parte da água contida no alimento, bloqueando o desenvolvimento de microrganismos. Entretanto, estes procedimentos acarretam uma série de interações e reações entre substâncias constituintes dos alimentos que podem dar ao produto final gosto e aroma alterados. Por outro lado, quando se empregam métodos mais suaves de conservação, estes muitas vezes não bastam para ampliar o tempo de prateleira dos produtos, necessitando de duas ou mais operações ou processos. Por isso, busca-se o emprego de métodos mais suaves, associados ou não para a conservação, visando abrir possibilidades de colocar no mercado produtos cada vez mais frescos e processados ao mínimo (Baruffaldi & Oliveira, 1998).

Visando atender os consumidores com interesse cada vez maior por produtos frescos, nutritivos, com alta qualidade organoléptica e tempo de prateleira aceitável, novos tratamentos ganham destaque como as tecnologias não térmicas, diferentes sistemas de embalagens, biopreservação e produtos antimicrobianos naturais como sistema lactoperoxidase, bacteriocinas, lisozima, quitosana e os derivados vegetais (Devlieghere et al., 2004).

Em relação aos vegetais, sabe-se que todos são possuidores de vias metabólicas secundárias que dão origem a compostos incluindo alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos, óleos, dentre outros, que por sua vez são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies vegetais (Souza et al., 2003).

Os derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido p-coumárico, ferúlico, caféico e clorogênico), encontrados em frutas, verduras, legumes, chá e outras fontes de origem vegetal são reconhecidos por apresentar atividade antibacteriana e antifúngica. Já nas plantas crucíferas (repolho, couve, brócolis, nabo, entre outros), encontram-se os glucosinolatos, os

quais produzem isotiocianatos após sofrerem algum tipo de injúria mecânica, tendo alguns atividade antifúngica e antibacteriana. Outras plantas são conhecidas por possuir óleos essenciais com atividade antimicrobiana, como por exemplo o eugenol do cravo-da-índia, a alicina em alho, o aldeído cinâmico e o eugenol da canela, o isotiocianato de alilo em mostarda, o eugenol e o timol em sálvia e o carvacrol (isotimol) e o timol em orégano (Jay, 2005).

As especiarias são os produtos constituídos de partes (raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes, talos) de espécies vegetais, tradicionalmente utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas (ANVISA, 2005).

No que diz respeito à atividade antimicrobiana em alimentos, estes podem servir como substrato para o crescimento microbiano e produção de toxinas e, de acordo com a forma tradicional de uso, as especiarias e ervas adicionadas aos alimentos são geralmente em quantidades insuficientes para evitar a deterioração por microrganismos (Ceylan & Fung, 2004). Entretanto, os componentes ativos em baixas concentrações podem interagir sinergicamente com outros fatores (NaCl, ácidos e conservantes) aumentando o efeito conservante. Sabe-se, que a diminuição da atividade antimicrobiana de especiarias e ervas nos alimentos pode ser devido a compartimentação dos componentes ativos para a fase lipídica (Ceylan & Fung, 2004).

Os compostos de natureza vegetal, em especial as especiarias e seus produtos derivados (óleos essenciais e extratos), apresentam um potencial relevante como agentes de inibição do crescimento de microrganismos, mostrando que elementos que se apresentavam apenas como vetores de aromas e gostos característicos, atualmente apresentam uma nova perspectiva de emprego (Souza et al., 2003).

Estudos realizados com óleos essenciais revelaram que as quantidades a serem empregadas variam muito conforme o sabor e, além disso, a eficiência relativa muda conforme a composição do produto, bem como a metodologia empregada nos ensaios também geram dificuldades de comparação entre os resultados obtidos. Em geral bactérias Gram-positivas são mais sensíveis que as Gram-negativas, enquanto as bactérias lácticas são as mais resistentes entre as Gram-positivas. Fungos parecem ser mais sensíveis que as bactérias Gram-negativas (Jay, 2005).

A seguir, na Tabela 2, é apresentada a eficácia de alguns agentes antimicrobianos de derivados de plantas em alimentos.

Tabela 2. Eficácia dos agentes antimicrobianos naturais de plantas, quando utilizados em alimentos; (a) bactericida, (b) bacteriostático, (c) pouco ou nenhum efeito.

Agente antimicrobiano	Concentração	Alimento	Organismo	Efeito
Manjeriço	1% (w/v)	Molho espaguete	<i>Shigella</i> spp.	b,c
Óleo de manjeriço	1%	Suco de tomate	<i>Lb. Curvatus</i> <i>S. cerevisiae</i>	a a
Carvacrol	3%	Cubos de peixe	<i>S. Typhimurium</i>	a
Óleo de canela	1% (v/v)	Queijo gordo	<i>L. monocytogenes</i>	a
Óleo de cravo	500 µg mL ⁻¹	Cozido de porco	<i>A. hydrophila</i>	b
Eugenol	2%	Carne cozida	<i>A. hydrophila</i>	a,b
Alho	4%	Linguiça	Microbiota natural	b, c
Orégano	0,05% (v/v)	Peixe	Microbiota natural	b
Orégano	1%	Carne	<i>L. monocytogenes</i>	c
Orégano	≤0,1%	Maionese	<i>E. coli</i> O157:H7	c
Óleo de orégano	0,8% (v/w)	Filé de carne	<i>S. Typhimurium</i>	a
Sálvia	≤2,5% (w/w)	Comida de bebê	<i>S. Typhimurium</i> <i>S. aureus</i> <i>B. cereus</i>	b b b
Tomilho	0,05% (v/v)	Peixe	Microbiota natural	b
Tomilho	1% (w/v)	Espaguete com salsicha	<i>Shigella</i> ssp.	b,c
Baunilha	3 mg mL ⁻¹	Purê de morango	Microbiota natural Leveduras	b b
Wasabi	60 mg mL ⁻¹	Suspensão de atum gordo	<i>V. parahaemolyticus</i>	a

Fonte: Holey & Patel, 2005.

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

4- Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos complexos naturais, voláteis, caracterizados por um forte odor e constituído por metabólitos secundários de plantas aromáticas. Eles são normalmente obtidos por meio de vapor ou hidro-destilação, sendo o primeiro desenvolvido na Idade Média pelos árabes. Conhecido pela sua atividade anti-séptica, ou seja, bactericida, fungicida e virucida e propriedades medicamentosas e flavorizantes, eles são usados em embalsamentos, conservação dos alimentos como antibióticos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatório, antiespasmódico e anestésico local. Até os dias atuais, essas características não se alteraram muito, exceto que agora são mais conhecidos alguns de seus mecanismos de ação, particularmente para o efeito antimicrobiano (Bakkali et al., 2008).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros. Eles também servem para atrair alguns insetos que favorecem a dispersão de pólen e sementes, ou mesmo para repelir outros insetos indesejáveis. Os óleos essenciais são extraídos de diversas plantas aromáticas geralmente localizadas em países de clima temperado para quente como Mediterrâneo e nos países tropicais, onde eles representam uma parte importante da farmacopéia tradicional. Os óleos são líquidos, voláteis, límpido e raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, com uma densidade geralmente mais baixa do que a da água. Eles podem ser sintetizados por toda a planta, como por exemplo em brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou cascas, e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, as células da epiderme ou tricomas glandulares (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008).

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

Existem vários métodos para extração de óleos essenciais, como o uso de dióxido de carbono líquido ou microondas, e, principalmente, destilação com alta ou baixa pressão empregando água fervente ou na forma de vapor (Bakkali et al., 2008).

A técnica de destilação para a produção de óleos essenciais foi usada pela primeira vez no Oriente (Egito, Índia e na Pérsia) há mais de 2000 anos e foi melhorada no século nove pelos árabes. A primeira língua escrita conta que a destilação de óleo essencial foi atribuída a

Villanova (1235-1311), um médico catalão (Guenther, 1948; Bauer et al., 2001 apud Burt, 2004).

Como os compostos ativos presentes nos óleos essenciais são originados nos metabólitos das plantas, a sua composição química pode variar conforme a parte da planta, o grau de desenvolvimento, o horário do dia e o ambiente onde tais plantas se encontram. Quase todos os óleos têm constituintes voláteis, o que possibilita alterações na composição química dos óleos mesmo após a sua produção, mas há exceções como a essência de flores que possui lipídios (Maia, 2008).

Geralmente os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais. Os componentes abrangem dois grupos de origem biossintética distinta (Betts, 2001; Pichersky et al., 2006). O principal grupo é composto de terpenos e terpenóides e outro de constituintes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular (Figuras 3a e 3b).

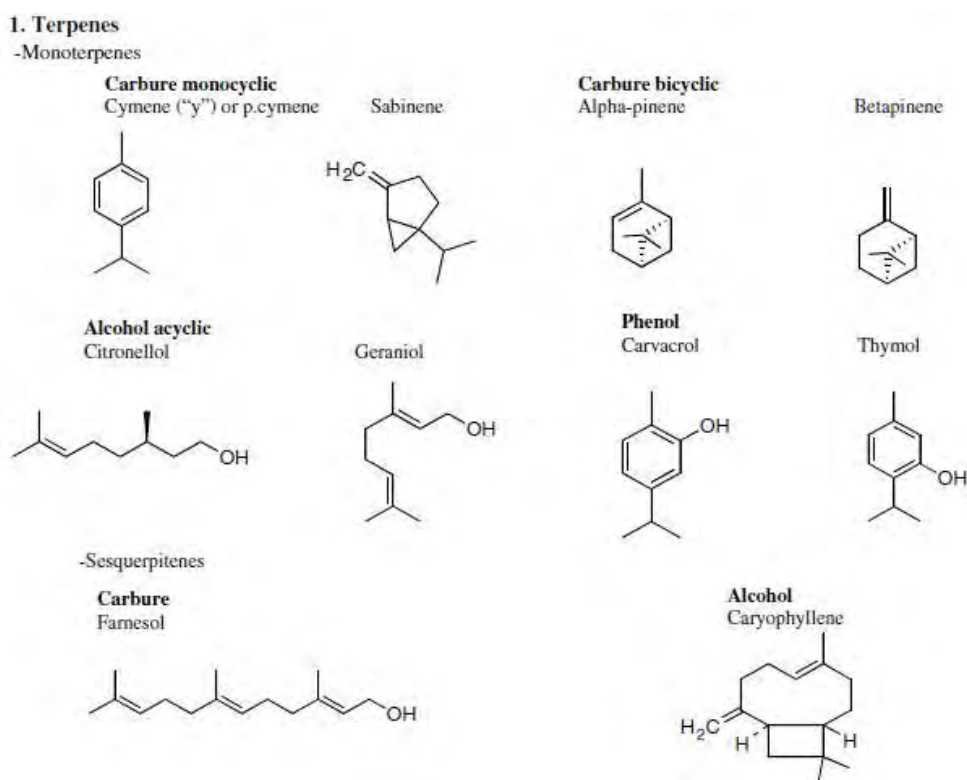


Figura 3a. Estruturas químicas selecionadas de componentes de óleos essenciais.

Fonte: Bakkali et al., 2008.

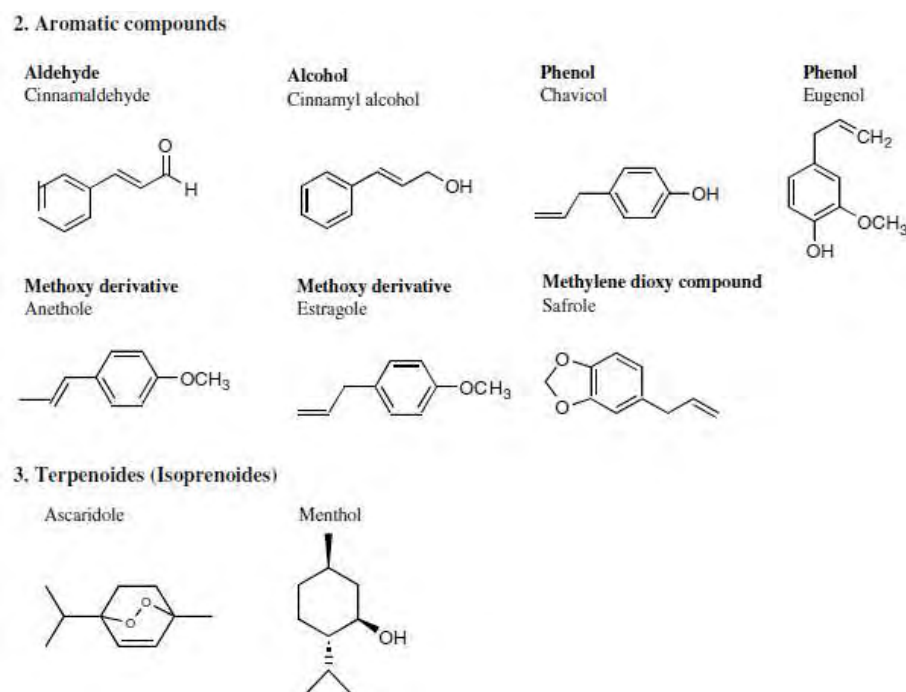


Figura 3b. Estruturas químicas selecionadas de componentes de óleos essenciais.

Fonte: Bakkali et al., 2008.

Algumas plantas apresentam um apelo considerável quanto utilização como condimentos, o que pode justificar a utilização dos seus óleos essenciais como aditivo em alimentos.

Ocimum basilicum L. (Lamiaceae) conhecido popularmente como manjeriço, basílico, erva real, alfavaca, etc., tem seu nome derivado do grego *osme*, odorífico, fragrante. É um subarbusto aromático, anual, ereto, muito ramificado, de 30 a 50 cm de altura, nativo da Ásia tropical e introduzido no Brasil pela colônia italiana. Apresenta folhas simples membranáceas, com margens onduladas e nervuras salientes, de 4-7 cm de comprimento e flores brancas, reunidas em racemos terminais curtos. O *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) (orégano) tem nome de origem grega *oros y ganos*, que significa alegria da montanha. É uma planta herbácea, perene, ereta, aromática, de hastes algumas vezes arroxeadas, de 30-50 cm de altura, nativa de regiões montanhosas e pedregosas do Sul da Europa e cultivadas no Brasil. Apresenta folhas simples, esparso-pubescentes, de 1-2 cm de comprimento e as flores são esbranquiçadas, rosas ou violáceas, dispostas em glomérulos e reunidos em inflorescências paniculadas terminais. Os seus óleos essenciais são ricos em polifenóis que protegem as células e inibem o envelhecimento. De origem Mediterrânea, a manjerona possui atividade aperitiva, digestiva, antigases, diurética, anti-séptica, calmante, expectorante. O orégano é muito semelhante a *Origanum majorana* L. (Lamiaceae) (manjerona verdadeira, manjerona

doce), também cultivada no Brasil, com aroma mais delicado e aplicações similares na medicina. E finalmente *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) (tomilho, timo) seu nome *thymus* vem do grego e significa força ou coragem. É um subarbusto perene, ereto, ramificado, entouceirado, muito aromático, de 20-30 cm de altura, com base dos ramos lenhosa e rasteira, nativo da região Mediterrânea e cultivado no sul e sudeste do Brasil. Possui folhas pequenas, opostas, de forma variada e quase sésseis, levemente pubescentes e de coloração mais clara na face inferior e flores pequenas de cor esbranquiçada, reunidas em inflorescências espigadas axilares (Lorenzi & Matos, 2002; Nepomuceno, 2007).

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas foi determinada por Sartoratto et al. (2004) de acordo com a seguinte escala: atividade forte para valor de Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre 0,05-0,50 mg/mL, atividade moderada para CIM entre 0,6-1,50 mg/mL e atividade fraca acima de 1,50 mg/mL. O *T. vulgaris* e *O. vulgare* apresentaram atividade forte contra *Enterococcus faecium* ATCC10541. Os óleos de *O. basiculum*, *T. vulgaris* e *O. vulgare* apresentaram atividade moderada contra *Salmonella Choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

Busatta et al. (2008) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. majorana* sobre bactérias em linguiça fresca. Os resultados mostraram que adição do óleo essencial de manjerona exerceu efeito bacteriostático nas concentrações abaixo do CIM (0,069-2,3 mg/mL) e efeitos bactericidas, quando utilizadas em concentrações elevadas do óleo, o que provocou alterações no sabor da linguiça. Segundo os autores, uma possível redução da concentração de tempero durante a formulação do produto contribuiria para alcançar um produto bem equilibrado, satisfazendo aspectos antimicrobianos e requisitos de aceitabilidade dos consumidores.

Os óleos essenciais de orégano e manjerição também foram estudados em relação a sua atividade antimicrobiana frente a diferentes linhagens de *E. coli*. Obteve-se os valores de CIM e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 1,8 e 2,0 mL/100 mL para orégano e de 1,9 e 2,0 mL/100 mL para manjerição (Moreira et al., 2005).

A susceptibilidade de bactérias de origem alimentar também foi testada por Pasqua et al. (2005). Os resultados mostraram que os óleos de tomilho e orégano foram mais eficientes contra bactérias Gram-negativas, em particular, *Salmonella* na concentração de 0,04% de óleo, enquanto *E. coli* O157:H7 foi eliminada na concentração de 0,15% de tomilho e 0,08% de orégano. Em relação ao óleo de manjerição, a atividade antimicrobiana foi considerada fraca sobre os microrganismos testados.

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais de orégano, tomilho, manjerição, manjerona, capim cidreira, gengibre e cravo, também foi investigada contra linhagens Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis), por Barbosa et al. (2009). Os valores CIM90% foram testados contra bactérias inoculadas experimentalmente em carne moída irradiada e contra microbiota natural (mesófilos e bactérias psicotróficas) encontrada no alimento. CIM90% variaram de 0,05% v/v (óleo de capim cidreira) a 0,46% v/v (óleo de manjerona) para bactérias Gram-positivas e de 0,10% v/v (óleo de cravo) para 0,56% v/v (óleo de gengibre) para linhagens Gram-negativas. No entanto, a CIM90% avaliada sobre a carne moída, com patógenos ou microbiota natural, não mostrou a mesma eficácia 1,3 e 1,0 log UFC/g foram os maiores valores de redução contra os microrganismos testados.

Embora sejam encontrados resultados diferentes em alguns estudos, a susceptibilidade dos microrganismos Gram-positivos parece ser maior do que a dos Gram-negativos em relação aos óleos essenciais, como relatado nas revisões de Burt (2004) e Holey & Patel (2005).

5- Mecanismos da ação antimicrobiana de óleos essenciais

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

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

A seguir, são citados os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos vegetais de acordo com as classes já estudadas (Tabela 3).

Tabela 3. Principais classes de compostos com atividade antimicrobiana obtidas de plantas.

Classe	Subclasse	Exemplos	Mecanismo de ação
Fenólicos	Fenóis simples	Catecol Epicatequina	Impedir entrada de substrato Desintegração da membrana
	Fenólicos ácidos	Ácido cinâmico	?
	Quinonas	Hipericina	Ligação com adesinas, inativa enzimas, complexo com parede celular
	Flavonóide	Crisina	Ligação com adesinas
	Flavonas	Abissinona	Complexo com parede celular Inativa enzimas e inibe HIV transcriptase reversa
	Taninos	Ellagitanina	Privação de substrato, perturbação da membrana, ligação com adesinas, ligação com proteínas, complexos com íon metal
	Cumarina	Warfarina	Interação com DNA eucarioto (atividade antiviral)
Terpenóides, óleos essenciais		Capsaicina	Desintegração da membrana
Alcalóides		Berberina Piperina	Interage com parede celular e/ou DNA
Lecitina e Polipeptídeos		Aglutina manose específica	Forma pontes dissulfeto e interfere com a replicação viral
Poliacetilenos			?

Fonte: Adaptado de Cowan 1999.

Na sequência serão relacionados alguns compostos e seu mecanismo de ação sobre microrganismos.

Carvacrol e timol: Timol possui estrutura similar ao carvacrol, diferindo pela localidade do grupo hidroxila sobre o anel fenólico. As duas substâncias parecem tornar a membrana permeável (Lambert et al., 2001). Ambas as estruturas desintegram a membrana externa, presente na parede de bactérias Gram negativas, liberando os lipopolissacarídeos (LPS) e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP (Helander et al., 1998).

Eugenol: Concentrações de eugenol inibiram a produção de amilase e protease por *B. cereus*, degradação da parede celular e lise celular também foram encontradas (Thoroski et al., 1989).

p-Cimeno: Precursor do carvacrol, é hidrofóbico e provoca maior inchaço da membrana citoplasmática do que o carvacrol (Ultee et al., 2002).

Carvone: Quando testado em concentrações maiores do que a sua CIM, o carvone dissipa o pH gradiente e o potencial da membrana celular. O crescimento de *E.coli*, *Streptococcus thermophilus* e *L. lactis* diminuiu de acordo com as concentrações de carvone, sugerindo que ele atue perturbando o estado metabólico geral da célula (Oosterhaven et al., 1995).

Cinamaldeído: O cinamaldeído é conhecido por ter ação inibitória sobre *E.coli* e *Salmonella Typhimurium* em concentrações parecidas com as do carvacrol e timol, mas não

desintegra a membrana externa e nem enfraquece o ATP intracelular (Helander et al., 1998). O grupo carbonila tem afinidade com proteínas prevenindo a ação de aminoácidos descarboxilases em *Enterobacter aerogenes* (Wendakoon e Sakaguchi, 1995).

Terpinen-4-ol: Acredita-se que este composto leve a inibição da respiração oxidativa, indução da deformação da membrana (dilatação) tendo como consequências mudanças na permeabilidade da membrana (Cox et al., 2000).

O nível de conservantes naturais necessários para eficácia suficiente em produtos alimentares, em comparação aos utilizados em estudos *in vitro* pode ser consideravelmente maior, o que pode provocar impactos nas propriedades organolépticas dos alimentos, como visto na Tabela 4.

Componentes dos alimentos como proteínas, gorduras, são conhecidos por se ligar e/ou solubilizar compostos fenólicos, reduzindo sua atividade antimicrobiana. Este fato, mostra que a atividade antimicrobiana de plantas condimentares pode ser menor em sistemas alimentares do que em meios de cultura (Shelef et al., 1984).

Por isso, a necessidade de estudos que demonstrem o impacto dos produtos naturais utilizados como conservantes tanto em relação a qualidade quanto em relação a aceitação dos mesmos pelos consumidores.

Tabela 4. Efeito de agentes antimicrobianos naturais na qualidade e conservação de alimentos^a.

Alimento	Agente antimicrobiano	Dinâmica microbiana	Atributos de qualidade
Iogurte de fruta	Baunilha (2000 ppm)	Leveduras, bactérias (redução crescimento)	Tempo de prateleira (↑)
Suco de tomate	Óleo de cravo (0,1%) Extrato de menta (1%) Nisina (0,004%)	Contagem total em placa (3,9LR) Contagem total (8,34LR), Contagem total em placa (↓)	Tempo de prateleira (↑) Vitamina C (∼)
Salada de fruta pronta para comer	Citral (25-250 ppm) Citron (300-900 ppm) Citron (600 ppm)	Leveduras e bactéria ácido láctica BAL (redução crescimento) <i>Salmonella</i> Enteritidis E4 (2LR), <i>Escherichia coli</i> 555 (<4,5 LR), <i>Listeria monocytogenes</i> ScottA (4LR)	Tempo de prateleira (↑) Características sensoriais (∼)
Framboesas	Jasmonato de metilo Isotiocianato de alilo EO <i>Melaleuca alternifolia</i>		AC (↑) AC (↓) AC (↑)
Melancia fresca	Nisina (25µg/mL)	<i>L. monocytogenes</i> (0.8 LR)	Qualidade (↑)
Cenoura minimamente processada	Óleo orégano (250 ppm)	<i>E. coli</i> (5,57LR), Microbiota deteriorante, Contagem viável total CVT (>1LR), BAL (>1LR) <i>Pseudomonas</i> (<1 LR) <i>Aeromonas</i> spp (2 LR)	Características sensoriais (∼)
Vegetais minimamente processados	Óleo tomilho (1%)		Características sensoriais (↓), Tempo de prateleira (↑)
Frango	Nisina Óleo essencial (EO) mostarda	<i>E. coli</i> (<1 LR) <i>Brochothrix thermosphacta</i> (∼) <i>Lactobacillus alimentarius</i> (∼) <i>Brochothrix thermosphacta</i> (∼) <i>Lactobacillus alimentarius</i> (redução crescimento) CVT (2,5LR)	Composição centesimal (∼) Tempo de prateleira (↑)
Peixe	EOs (0.5% carvacrol + 0.5% thymol)		Tempo de prateleira (↑) Oxidação lipídica (↓) Características sensoriais (∼)
Carne vermelha	Catequinas de chá (300 mg/kg)		Tempo de prateleira (↑), Oxidação lipídica (↓)
Carne cozida	Extrato de semente de uva (1%)	<i>Escherichia coli</i> (1.7 LR) <i>S. Typhimurium</i> (2.0 LR) <i>L. monocytogenes</i> (0.8 LR) <i>Aeromonas hydrophila</i> (0.4 LR)	Cor (∼) Oxidação lipídica (↓)

^aAU: unidades arbitrárias foram definidas como a recíproca da maior dupla diluição que não permitiu o crescimento do microrganismo indicador. AC: conteúdo de antocianinas. ↑ e ↓ indica aumentar e diminuir, respectivamente, enquanto ∼ não mostra nenhuma diferença significativa. LR: redução microbiana logarítmica (Log).

Fonte: Tiwari et al.2009

6- Análise sensorial de alimentos

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) definiu a análise sensorial como disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e dos materiais da forma que são percebidas pelos sentidos da visão, do olfato, do gosto, do tato e da audição (ABNT, 1993).

A avaliação sensorial intervém nas diferentes etapas do ciclo de desenvolvimento de produtos; como na seleção e caracterização de matérias primas, na seleção do processo de elaboração, no estabelecimento das especificações das variáveis das diferentes etapas do processo, na melhoria de uma formulação, na seleção dos sistemas de envase e no estudo da vida útil do produto final. As percepções sensoriais dos alimentos são interações complexas que envolvem estes cinco sentidos (Geise, 1995; Penna, 1999).

De acordo com o Instituto Adolfo Lutz, IAL (2008), a forma de definir atributos sensoriais é descrever os componentes relativos às propriedades dos produtos, como os seguintes:

Aparência – Refere-se às propriedades visíveis como o aspecto, cor, transparência, brilho, opacidade, forma, tamanho, consistência, espessura, grau de efervescência ou carbonatação e as características de superfície. A cor, propriedade capaz de provocar estimulação da retina por raios luminosos de comprimentos de onda variáveis, tem sua percepção limitada à fonte de luz, devendo ser avaliada com iluminação adequada como, por exemplo, a luz do dia, natural ou artificial.

Odor e aroma – O odor é perceptível pelo órgão olfativo quando certas substâncias voláteis são aspiradas e o aroma, via retronasal durante a degustação. O julgador deve aproximar a amostra da narina e dar cheiradas curtas, evitando longas inalações que cansem o olfato pela adaptação. O cansaço olfativo pode ser amenizado se for cheirada a pele do próprio pulso ou por outro aroma que neutralize o anterior. Nesta avaliação, pode-se fazer comparações com padrões de referência conhecidos, que serão identificados e descritos pelos seus odores ou aromas peculiares.

Textura oral e manual – Refere-se às propriedades reológicas e estruturais (geométricas e de superfície) dos produtos. Geralmente é percebida por três ou quatro sentidos: os receptores mecânicos, táteis e, eventualmente, os visuais e auditivos. Relaciona-se com a sensibilidade térmica e cinestésica. A avaliação da textura é mais complexa nos alimentos sólidos, como nos ensaios de corte, compressão, relaxação, penetração, cisalhamento, dobramento, etc. O julgador deve utilizar a pele da mão, da face e/ou da boca

(cavidade bucal e dentes). Quando avaliado pela boca pode ser definido como sensação bucal, utilizando-se também termos como: adstringente, metálico, quente, frio, etc. Algumas sensações são também nasais, como: pungente, refrescante, etc. Uma listagem de termos próprios pode ser utilizada para melhor definição das propriedades de textura.

Sabor e gosto – É considerada como uma experiência mista, mas unitária de sensações olfativas, gustativas e táteis percebidas durante a degustação. O sabor é percebido, principalmente, através dos sentidos do gosto e olfato, também influenciado pelos efeitos táteis, térmicos, dolorosos e/ou cinestésicos. O julgador deve tomar uma certa quantidade da amostra, sem excessos, e proceder à deglutição, tomando o cuidado em evitar a fadiga sensorial.

Os métodos podem ser divididos em analíticos (discriminativos e descritivos) e afetivos. Os métodos discriminativos são aqueles que estabelecem diferenciação qualitativa e/ou quantitativa entre amostras. Nos testes discriminativos, os provadores de uma equipe atuam como instrumentos para detectar pequenas diferenças. Os provadores podem ser do tipo que avalia a diferença global entre amostras ou do tipo direcional, em que o julgador indica se existe diferença em determinado atributo. Os provadores são familiarizados com a análise sensorial e o seu número pode variar de 20 a 30, dependendo do teste. Os testes discriminativos são classificados em testes de diferença entre duas ou mais amostras, enquanto que no teste de similaridade, o objetivo é determinar se não há diferença perceptível entre duas amostras (Nassu, 2007). Os testes discriminativos ou de diferença mais empregados em análise sensorial são o triangular, duo-trio, ordenação, comparação pareada e comparação múltipla ou diferença do controle.

Os métodos descritivos descrevem qualitativa e quantitativamente as amostras e utilizam escalas de intervalo ou de proporção. Os métodos descritivos envolvem a detecção e a descrição dos aspectos sensoriais qualitativos e quantitativos de um produto por painel (grupo de pessoas que avaliam produtos) treinado, com número de provadores que varia entre cinco e dez (Nassu, 2007). As técnicas descritivas mais utilizadas são o do perfil de sabor, perfil de textura, a análise descritiva quantitativa (ADQ) e a de tempo intensidade.

No método afetivo o julgador expressa seu estado emocional ou reação afetiva ao escolher um produto pelo outro. É a forma usual de se medir a opinião de um grande número de consumidores com respeito as suas preferências, gostos e opiniões. As escalas mais empregadas são: de intensidade, a hedônica, do ideal e de atitude ou de intenção. Os julgadores não precisam ser treinados bastando ser consumidores frequentes do produto em avaliação. Basicamente, os testes afetivos acessam diretamente a opinião (preferência e/ou

aceitabilidade) do consumidor potencial de um produto, a respeito de características específicas desse produto, ou idéias que o consumidor tenha do produto a ser avaliado, por isso, são também chamados de testes de consumidor. Devem participar dos testes no mínimo 30 provadores (Nassu, 2007; IAL, 2008).

A Tabela 5 apresenta os principais testes de análise sensorial e quando devem ser usados.

Tabela 5. Aplicações de testes sensoriais na avaliação de carnes.

Tipo de aplicação	Testes sensoriais aplicáveis
Desenvolvimento de novos produtos	Testes discriminativos, testes descritivos e testes afetivos
Comparação entre um produto já existente e outro em desenvolvimento	Testes de similaridade
Melhoria de produto	Testes de diferença, testes afetivos
Mudança em processo de fabricação, redução de custo e/ou seleção de novos fornecedores	Testes de similaridade, testes afetivos
Controle de qualidade	Testes de diferença (em relação a um padrão), testes descritivos
Estabilidade ou vida de prateleira	Testes de diferença, testes descritivos, testes afetivos
Aceitação ou opinião do consumidor	Testes afetivos
Preferência de consumidor	Testes afetivos
Correlação de análise sensorial e testes físicos químicos	Testes descritivos

Fonte: Adaptado de Meilgaard et al. (1997).

Para facilitar a visualização do processo de análise sensorial pode-se seguir fluxograma apresentado na Figura 4, de acordo com o objetivo pretendido.

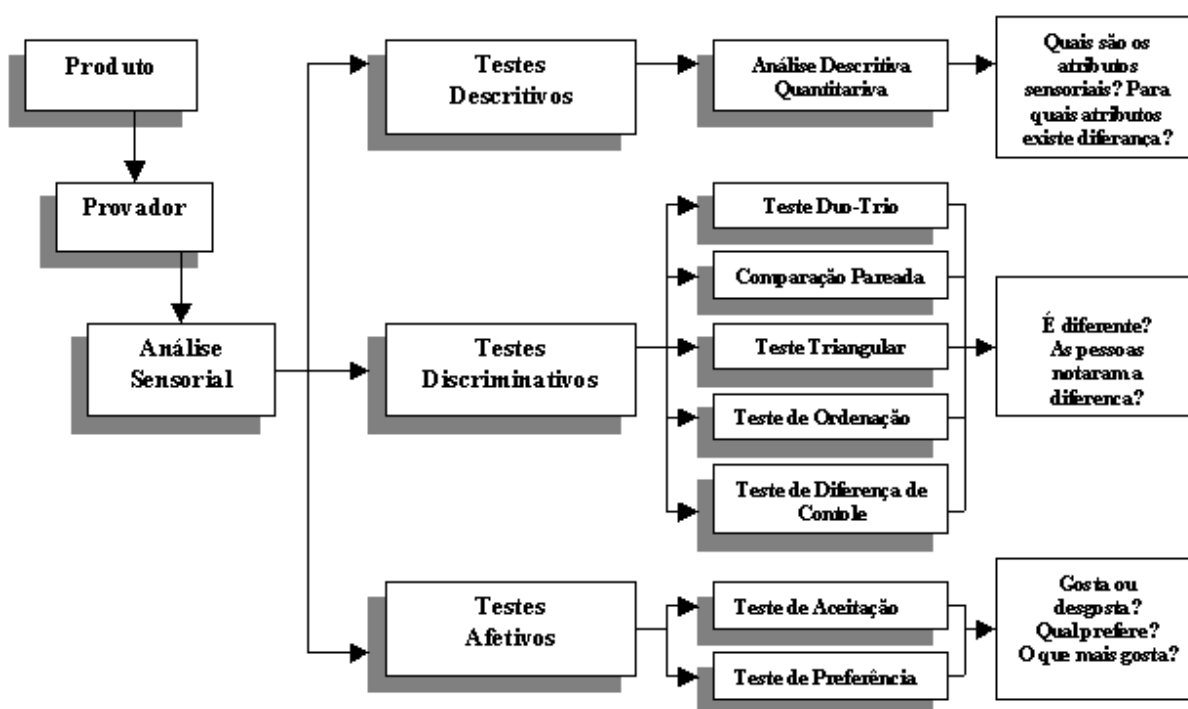


Figura 4. Fluxograma do processo de análise sensorial (Fonte: SGS do Brasil Ltda.)

Para os testes de aceitação por escala hedônica, o indivíduo expressa o grau de gostar ou de desgostar de um determinado produto, de forma globalizada ou em relação a um atributo específico. As escalas mais utilizadas são as de 7 e 9 pontos, que contêm os termos definidos situados, por exemplo, entre “gostei extremamente” e “desgostei extremamente” contendo um ponto intermediário com o termo “nem gostei; nem desgostei”. É importante que as escalas possuam número balanceado de categorias para gosto e desgosto. As amostras codificadas com algarismos de três dígitos e aleatorizadas são apresentadas ao julgador para avaliar o quanto gosta ou desgosta de cada uma delas através da escala previamente definida (Figura 5). Sua preferência é obtida por inferência. Os dados coletados podem ser avaliados estatisticamente pela análise de variância, ANOVA, e comparação das médias de pares de amostras, pelo teste de Tukey. O delineamento experimental a ser utilizado deve ser previamente escolhido, podendo-se optar pelo de blocos completos balanceados ou casualizados ou blocos incompletos casualizados, conforme a situação (IAL, 2008).

Amostra:	Julgador:	Data:
Você está recebendo quatro amostras codificadas. Avalie globalmente cada uma segundo o grau de gostar ou desgostar, utilizando a escala abaixo. (9) gostei extremamente (8) gostei moderadamente (7) gostei regularmente (6) gostei ligeiramente (5) não gostei, nem desgostei (4) desgostei ligeiramente (3) desgostei regularmente (2) desgostei moderadamente (1) desgostei extremamente _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ () () () () () () () Comentários:		

Figura 5. Modelo de escala hedônica (estruturada verbal, numérica, bipolar, nove pontos).

Fonte: ABNT, NBR 14141, 1998.

Tratando-se de análise sensorial de carnes, devem ser observados os seguintes fatores: o tempo *post mortem* para remoção da amostra da carcaça, o tempo e a velocidade de resfriamento e/ou de congelamento; padronização do tamanho e a espessura das porções para cocção; os métodos de cocção (assado, grelhado, cozido) a serem utilizados devem ser

padronizados, a menos que o método de cocção e o tempo de cozimento integrem o delineamento experimental e manutenção da temperatura do produto servido aos provadores (Nassu, 2007).

Objetivos:

O trabalho teve dois objetivos principais:

- Verificar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de orégano, tomilho, manjerição e manjerona em amostras de carne bovina moída *in natura* e em preparações de hambúrguer, contaminadas com linhagens de bactérias patogênicas partindo dos valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) obtidos previamente em estudos *in vitro*;
- Verificar a aceitação do hambúrguer cru e grelhado preparado com adição dos respectivos óleos essenciais.

O estudo contou ainda com dois desdobramentos com a finalidade de complementar o trabalho: atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre a microbiota normal de carne bovina moída (mesófilos e psicrotróficos) e variação temporal na atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.

Referências

ABNT. NBR 12806: Análise sensorial de alimentos e bebidas. *Associação Brasileira de Normas Técnicas*. Terminologia. Rio de Janeiro, 1993.

ABNT. NBR 12994: Métodos de análise sensorial dos alimentos e bebidas. *Associação Brasileira de Normas Técnicas*. Rio de Janeiro, 1993.

ABNT. NBR 14141: Escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas. *Associação Brasileira de Normas Técnicas*. Rio de Janeiro, 1998.

ANVISA. Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. Resolução RDC nº 276. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Brasil, 2005.

ANVISA. Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. Resolução - RDC nº 2. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Brasil, 2007.

Barbosa, L. N., Rall, V. L. M., Fernandes, A. A. H., Ushimaru, P. I., Probst, I. S., Fernandes Junior, Ary. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, p.725-728, 2009.

Baruffaldi, R., & Oliveira, M. N. Fundamentos de tecnologia de alimentos, 3. São Paulo:Atheneu, 1998.

Betts, T. J. Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *Journal of Chromatography*, 936, p.33–46, 2001.

Bertini, L. M., Pereira, A. F., Oliveira, C. L. L., Menezes, E. A., Morais, S. M., Cunha, F. A., & Cavalcanti, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma*, 17, p.80-83, 2005.

BRASIL. Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000. Dispõe sobre os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de hambúrguer. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília-DF, jul. 2000.

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

Brooks, G. F., Butel, J. S., Morse, S. A. Microbiologia Médica. 22^a ed., Lange –Rio de Janeiro, 2008.

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

Busatta, C., Vidal, R. S., Popiolski, A. S., Mossi, A. J., Dariva, C., Rodrigues, M. R. A. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, 25, p.207-211, 2008.

Cardoso, L. & Araújo, W. M. C. Parâmetros de qualidade em carnes comercializadas no Distrito Federal no período de 1997 – 2001. *Higiene Alimentar*, 17, p.12-18, 2003.

CDC. Foodborne illness -General Information. *Centers for Disease Control and Prevention*, 2005.

CDC. Listeriosis-General Information. *Centers for Disease Control and Prevention*, 2009.

CDC. Salmonellosis-General Information. *Centers for Disease Control and Prevention*, 2009.

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

Conceição, M. P. J., Faria, J. A. F. & Gândara, A. L. Influência da temperatura de comercialização sobre a microbiota de carne bovina moída, em atmosfera modificada. *Higiene Alimentar*, 17, p.67-72, 2003.

Costa, L. O. Processamento e diminuição do reprocesso do hambúrguer bovino (HBV). Monografia apresentada a Universidade Católica de Goiás, 2004.

Cowan, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, p. 564-582, 1999.

Cox, S. D., Mann, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmingtn, J. R., Wyllic, S. G., The mode of antimicrobial action of the essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Applied Microbiology*, 88, p.170–175, 2000.

Degenhardt, R. & Sant'Anna, E. S. Sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em salame tipo italiano de baixa acidez, produzido sob condições brasileiras de fabricação. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, p.309-314, 2007.

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

Di Pasqua, R., De Feo, V., Villani, F., Mauriello, G. In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbanaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Annals of Microbiology*, 55, p. 139-143, 2005

Djenane D., Martínez, L.; Blanco, D.; Yanguela, J. ; Beltrán J. A.; Roncalés, P. Effect of lactic acid bacteria on extension of shelf life and growth of *Listeria monocytogenes* in beef steaks stored in CO₂ rich atmosphere. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, p.405-412, 2005.

Farber, T.M.; Peterkin, P.I. *Listeria monocytogenes*: a food-borne pathogen. *Microbiology Review*, 55, p.476-511, 1991.

Fik, M., Surówka, K., Firek, B. Properties of refrigerated ground beef treated with potassium lactate and sodium diacetate *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, p.91–99, 2008.

Geise, J. Developments in beverage additives. *Food Technology*, 49, p. 64-72, 1995.

Hamon, M., Bierne, H., Cossart, P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology* 4, p.423-434, 2006.

Hautrive, T. P., Oliveira, V. R., Silva, A. R. D., Terra, N. N., Campagnol, P. C. B. Análise físico-química e sensorial de hambúrguer elaborado com carne de avestruz. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, p.95-101, 2008.

Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Von Wright, A. Characterization of the action of selected essential oil

components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, p.3590–3595, 1998.

Holley, R. A., & Patel, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oil and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 27, p. 273-292, 2005.

IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª edição, 1ª Edição Digital São Paulo: *Instituto Adolfo Lutz*, 2008.

Jay, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6ª ed.- Porto Alegre: Artmed, 2005.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, p.453–462, 2001.

Lawrie, R. A Ciência da carne. Lawrie R. A; trad. Jane Maria. 6. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2005.

Lorenzi, H. & Matos, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. *Instituto Plantarum*, Nova Odessa - SP, 2002.

Maia, J.G.S., Os óleos essenciais. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: Seu aproveitamento industrial para produção de aromas e sabores. *Edufes*, Vitória, ES, 2008.

Meilgaard, M, Civille, G. V., Carr, B. T. Sensory evaluation techniques. *Boca Raton*: CRC Press, 2, 1987.

Mengesha, D., Zewde, B. M., Toquin, M. T., Kleer, J., Hildebrandt, G., Gebreyes, W. A. Occurrence and distribution of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in ready-to-eat and raw meat products. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 122, p.20-24, 2009.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2004. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*, Ano 5, nº 06, 28/12/2005.

Nassu, R. T. Análise sensorial de carne: conceitos e recomendações. *Embrapa*. Comunicado técnico 79, 2007.

Nepomuceno, R. Viagem ao fabuloso mundo das especiarias- historias e lendas, origens e caminhos, favores e sabores. José Olympo Ltda. 5ªed. Rio de Janeiro, 2007.

Oosterhaven, K., Poolman, B., Smid, E.J. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops and Products*, 4, p. 23–31, 1995.

Oliveira, M. M. M., Brugnera, D. F., Mendonça, A. T., Piccoli, R. H. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. *Ciênc. Agrotec.*, 32, p. 1893-1898, 2008.

Penna, E. W. Métodos sensoriales y sus aplicaciones. *Avanços em análise sensorial*. São Paulo: Varela, 1999.

Pichersky, E., Noel, J.P., Dudareva, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311, p.808–811, 2006.

Quiroz-Santiago, C., Rodas-Suárez, O. R., Carlos, R. V., Fernández, F. J., Quiñones-Ramírez, E. I., Vázquez-Salinas, C. Prevalence of Salmonella in vegetables from Mexico. *Journal of Food Protection*, 72, p.1279-1282, 2009.

Sansonetti P. J. War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology* 4, 953-964 , 2004.

Sartoratto, A., Machado, A.L.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T. & Rehder, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, p.275-280, 2004.

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

Shinohara, N. K. S., Barros, V. B., Jimenez, S. M. C., Machado E. C. L., Dutra, R. A. F., Lima Filho, J. L. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 13, nº5, p.1675-1683, 2008.

Singh, A., Singh, R. K., Bhunia, A. K., Singh, N. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *LWT- Food Science and Technology*, 36, p. 787-794, 2003.

Sizer, F. S. & Whitney, E. N. Nutrição: conceitos e controvérsias. Manole, 8ª ed., 2003.

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

Tiwari, B., Valdramidis, V. P., O' Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., Cullen, P. J. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009.

Thoroski, J., Blank, G., Biliaderis, C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 52, n.6, p.399– 403, 1989.

Ultee, A., Bennink, M.H.J., Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, n.4, p.1561–1568, 2002.

Verruma-Bernardi, M.R. Avaliação da perda térmica em diferentes tipos de carne bovina para elaboração de bifes. *Higiene Alimentar*, São Paulo, 15, p.93, jan./fev.2001.

Wendakoon, C.N., Sakaguchi, M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*, 58, p.280– 283, 1995.

WHO. General information related to foodborne disease. *World Health Organization*, 2009.

WHO. Food and Health in Europe: a new basis for action. Regional Publications European Studies. *World Health Organization*, 96, 2004.

CAPÍTULO I

*Escrito segundo normas da revista *Foodborne Pathogens and Disease*.

Capítulo I – Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares em carne e hambúrguer bovino

Lidiane Nunes Barbosa¹, Bruna Fernanda Murbach Telles Machado¹, Isabela Silva Probst¹, Vera Lucia Mores Rall¹, Ary Fernandes Junior^{1*}

¹Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Brasil. Tel (14) 38116058 fax (14) 38153744 *ary@ibb.unesp.br

Resumo

Os óleos essenciais (OE) de plantas condimentares representam alternativas promissoras para utilização em alimentos visando eliminar bactérias que normalmente os contaminam. O objetivo do trabalho foi verificar a ação antimicrobiana de OE de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), manjerição (*Ocimum basilicum*) e manjerona (*Origanum majorana*) em carne e hambúrguer bovino contaminados artificialmente com *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis. Foram utilizadas amostras dos alimentos, previamente irradiados para esterilização, na dose média de 12kGY, e contaminadas posteriormente com listeria e salmonela separadamente, seguido de adição dos OE em concentrações crescentes. Após 3 horas de contato (óleos x bactérias) foram feitas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) e plaqueamento em profundidade (Plate Count Agar) e contagem bacteriana após incubação a 37°C/24horas. O mesmo tipo de ensaio foi realizado utilizando concentração fixa dos óleos e contagens nos tempos 6, 24 e 48 horas. Sobre carne moída o OE de manjerona em 0,8 %v/v reduziu a contagem de listeria à não detectável, enquanto que para o hambúrguer, os OE de manjerona e tomilho eliminaram totalmente esta bactéria em concentração também de 0,8 %v/v. Para salmonela, os óleos de orégano e manjerona apresentaram a mesma eficácia na carne (1,6%v/v) e no hambúrguer (1,2%v/v), o OE de manjerição o pior desempenho. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi distinta em função do alimento, linhagem e tempo de contato, com destaque para o óleo de manjerona nos testes com 3 horas de contato e orégano capaz de reduzir as contagens a <10 UFC/g em três dos quatro modelos de variação temporal estudados. Isto estabeleceu o potencial de uso dos OE em modelos cárneos, visando a sua preservação.

Palavras-chave: óleos essenciais, atividade antimicrobiana, carne moída, hambúrguer, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis.

Antimicrobial activity of aromatic plant essential oils in bovine meat and burger

Lidiane Nunes Barbosa¹, Bruna Fernanda Murbach Telles Machado¹, Isabela Silva Probst¹,
Vera Lucia Mores Rall¹, Ary Fernandes Junior¹

¹Departament of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, **Universidade Estadual Paulista**, Brazil. Tel (14) 38116058 fax (14) 38153744 * ary@ibb.unesp.br

Abstract

Aromatic plant essential oils (EO) represent promising alternatives to eliminate bacteria that usually contaminate food. The aim of this study was to determine the antimicrobial activity of oregano (*Origanum vulgare*), thyme (*Thymus vulgaris*), basil (*Ocimum basilicum*) and marjoram (*Origanum majorana*) EO in bovine minced meat and burger artificially contaminated with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis. Samples of those foods were previously irradiated at a mean dose of 12 kGy for sterilization; then, they were infected with salmonella and listeria separately and received increasing EO concentrations. After 3-hour contact (oils x bacteria), serial dilutions (10^{-1} to 10^{-5}) and deep plating in Plate Count Agar were performed, followed by incubation at 37°C/24h and bacterial count. The same tests were carried out with a fixed EO concentration and bacterial counts at 6, 24 and 48 hours. In minced meat, marjoram EO at 0.8% v/v eliminated listeria, whereas in burger this bacterium was completely eliminated by marjoram and thyme EO also at 0.8% v/v. Considering salmonella, oregano and marjoram EO had equal inhibitory potential in meat (1.6% v/v) and burger (1.2% v/v), whereas basil EO had the lowest antimicrobial capacity. The EO antimicrobial activity differed with the studied food, the bacterial strain and the contact time; marjoram oil was noticeable in 3h-contact tests and oregano was capable of reducing bacterial counts at <10 CFU/g, in three of the four time variation models studied. These data established the potential use of EO in meat models, aiming at their preservation.

Key words: essential oils, antimicrobial activity, minced meat, burger, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis.

1. Introdução

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

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

Por outro lado os consumidores vem preferindo produtos naturais e/ou minimamente processados em vez de alimentos com aditivos sintéticos (Dadalioglu and Evrendilek, 2004). Por isso, visando reduzir os riscos à saúde e prejuízos econômicos gerados pelos microrganismos que contaminam alimentos, o uso de compostos antibacterianos naturais tem se mostrado uma alternativa promissora (Smid & Gorris, 1999; Oussalah *et al.*, 2007). Dentre esses produtos naturais destacam-se os óleos essenciais, quitosana, nisina e a lisozima como compostos ativos com potencial de uso na preservação de alimentos (Devlieghere *et al.*, 2004).

Óleos essenciais são metabólitos secundários de diversas espécies vegetais, voláteis, de consistência semelhante a óleo, obtidos de material de plantas como folhas, flores, botões, sementes, ramos, casca, ervas, madeira, frutas e raízes. São substâncias que além de utilização medicinal, entram na composição de perfumes, aromatizantes e outros produtos (Burt, 2004). A atividade antibacteriana depende do tipo, composição e concentração da espécie ou o óleo essencial, o tipo de microrganismo em questão, a composição do substrato, o processamento e a condição de estocagem (Bertini *et al.*, 2005).

Considerando o elevado número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é mais provável que a sua atividade antibacteriana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas que existam vários alvos na célula (Burt, 2004). No entanto, há consenso de que a grande maioria dos compostos aromáticos e fenólicos exerce seus efeitos antimicrobianos na membrana citoplasmática, alterando a sua estrutura e funções (Holey and Patel, 2005). Desta forma, elementos vegetais que se apresentavam

apenas como vetores de aromas e gostos característicos, agora apresentam uma nova perspectiva de uso (Souza *et al.*, 2003).

Inúmeros trabalhos relataram a atividade antimicrobiana de plantas como a manjerona, orégano, tomilho e manjeriço (Deans and Svoboda, 1990; Daferera *et al.*, 2000; Burt and Reinders, 2003; Nevas *et al.*, 2004; Vági *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2005; Di Pasqua *et al.*, 2005; Oussalah *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2009).

Atualmente, vem se tornando frequente o consumo de produtos cárneos de fácil preparo ou prontos para o consumo tais como almôndegas, hambúrgueres, empanados, linguiças, mortadelas, salames, entre outros. Entretanto as carnes merecem destaque porque estão frequentemente envolvidas em surtos de toxinfecções alimentares, por possuírem elevada atividade de água, pH favorável ao crescimento de microrganismos e elevado percentual de proteínas, minerais e vitaminas, tornando-as excelentes meios de cultura para desenvolvimento de patógenos e deteriorantes (Cardoso and Araújo, 2003). A carne moída apresenta maiores problemas microbiológicos que os cortes por ser mais manipulada e apresentar maior relação área/ volume. Assim sendo, é um alimento muito perecível, cujo desenvolvimento de métodos para prolongar a sua vida de prateleira é importante para seus produtores (Conceição *et al.*, 2003; Fik *et al.*, 2008).

Desta forma, o objetivo do estudo foi verificar o potencial de uso de óleos essenciais de quatro plantas condimentares (*Origanum vulgare*-orégano, *Thymus vulgaris*-tomilho, *Ocimum basilicum*-manjeriço e *Origanum majorana*-manjerona), como aditivo alimentar natural em função da sua atividade antimicrobiana em amostras de carne moída e hambúrguer bovino contaminadas artificialmente com *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção dos óleos essenciais e caracterização química

Os óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Ocimum basilicum* (manjeriço) e *Origanum majorana* (manjerona) foram preparados de acordo com a metodologia clássica de arraste direto pelo vapor d'água, utilizando um equipamento tipo Clevenger, da marca Marconi modelo M480 (Bernardo-Gil *et al.*, 2002, Souza *et al.*, 2004). Após obtenção dos OE foram determinados os valores de rendimento dos óleos e densidade (Fonseca and Librand, 2008).

A análise química foi feita através de um espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo gasoso (GC-MS), da marca Shimadzu, modelo QP5050A, utilizando-se uma coluna capilar, CBP-5, de 50m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25mm e 0,25µm

de espessura do filme. A temperatura do injetor e da interface foi de 250⁰C. O detector operou em modo EI a 70eV e utilizando-se He como gás de arraste. As condições cromatográficas foram: **orégano**- temperatura inicial de 60 ⁰C, aquecimento até 160 ⁰C, com taxa de 3⁰C.min⁻¹, aquecimento até 180 ⁰C a uma taxa de 10⁰C.min⁻¹ e manutenção desta temperatura por 5min., aquecimento a 15⁰C.min⁻¹ até 200⁰C e manutenção desta por 3min., e aquecimento a taxa de 20 ⁰C.min⁻¹ até 220⁰C e mantendo-a por 10min.; **tomilho, manjerição e manjerona** - temperatura inicial de 60 ⁰C, aquecimento até 160 ⁰C, com taxa de 3⁰C.min⁻¹, aquecimento até 220 ⁰C a uma taxa de 15⁰C.min⁻¹ e manutenção desta temperatura por 10min. A identificação dos componentes do óleo essencial foi feita com base na biblioteca NIST, análise dos espectros de massas e também nos dados da literatura (Adams, 1989).

2.2. Linhagens bacterianas

Foram utilizadas linhagens bacterianas de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis, previamente isoladas de alimentos submetidos à análise microbiológica no Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNESP - Botucatu-SP. As amostras foram identificadas conforme Hitchins (2003) e Andrews *et al.* (2001) e mantidas em agar estoque até uso nos ensaios.

2.3. Modelos cárneos

Os procedimentos de preparo e manipulação dos modelos cárneos foram realizados no Laboratório de Nutrição e Dietética, da UNESP, Botucatu-SP. Foi obtido um lote de carne bovina moída *in natura*, do tipo coxão mole (*semimembranosus*), no comércio local de Botucatu/SP e feita contagem padrão para mesófilos aeróbios com diluição inicial de 25g em 225 mL de água tamponada estéril (10⁻¹ a 10⁻⁵), plaqueamento em profundidade em meio de cultura Plate Count Agar (PCA - Difco) seguido de incubação a 35⁰C/24-48 horas e contagem de colônias (UFC) (Morton, 2001). Uma receita básica de hambúrguer bovino foi preparada com uma porção da mesma amostra (carne moída (80%), sal (1,2%) e cebola picada (18,8%), sendo na sequência preparadas porções de 10 gramas (carne e hambúrguer) embaladas individualmente e congeladas. Em seguida as amostras (carne e hambúrgueres) foram encaminhadas na forma congelada e mantidas em caixa térmica de contendo gelo para a Companhia Brasileira de Esterilização (CBE) em Jarinu/SP onde foram submetidas ao processo de irradiação por raio gama, em irradiador da marca Harwell Dosimeters (UK) em dose média de 10 kGy.

2.4. Análise centesimal

Para efeito de controle da atividade dos referidos OE no alimento, realizou-se também a análise centesimal das amostras antes e após processo de irradiação visando de constatar a ocorrência de possíveis alterações nos produtos cárneos. A análise compreendeu determinações de umidade, proteínas, lipídios e cinzas (IAL, 2008). As análises foram realizadas em triplicata no Laboratório de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial da FCA/UNESP/Botucatu.

2.5. Determinação da ação antimicrobiana dos óleos essenciais sobre bactérias patogênicas na carne moída *in natura* e hambúrguer bovino

As amostras utilizadas nos ensaios eram descongeladas em temperatura de geladeira na véspera dos experimentos seguido da realização dos ensaios de contaminação artificial com uma concentração bacteriana ao redor de 10^4 - 10^5 UFC/g de alimento, utilizando culturas de listeria e salmonela cultivadas em Brain Heart Infusion (BHI-Difco) por 35°C/24 horas e padronizadas na escala de 0,5 MacFarland. Foram incluídos ensaios controles para adição de bactérias nos alimentos sem adição dos OE e ensaios controles da esterilidade das amostras dos alimentos.

A adição de cada bactéria foi feita diretamente no alimento contido no saco plástico, sendo que após homogeneização da bactéria nos alimentos, foi feita adição dos volumes dos respectivos de óleos essenciais correspondente aos valores entre 0,1 até 2,2 %v/v, com variações em função dos OE e bactérias testadas. Os valores iniciais foram considerados de acordo com estudos realizados por Barbosa *et al.* (2009) utilizando as mesmas espécies bacterianas e OE. Após adição e mistura dos óleos nas amostras estas eram mantidas em temperatura de geladeira por período 3 horas (Barbosa *et al.*, 2009). Em outra etapa do estudo, utilizando o mesmo protocolo adotado previamente, foram realizados ensaios utilizando uma concentração logo abaixo da obtida e que foi capaz de reduzir a contagem bacteriana a <10 UFC/g, porém com as contagens bacterianas realizadas nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas de armazenamento dos alimentos visando verificar a influência do tempo de contato entre OE e bactérias diretamente nos alimentos. Para as contagens bacterianas foram utilizadas diluições seriadas de cada amostra de alimento, partindo-se de uma diluição inicial de 10g em 90 mL de água tamponada estéril (diluição entre 10^{-1} a 10^{-5}) e plaqueamento em profundidade em meio de cultura Plate Count Agar (Difco) seguido de incubação a 35°C/24-48 horas e contagem de colônias nas placas contendo entre 25 e 250 colônias, com o auxílio de um contador de colônia

modelo Phoenix. Para o resultado final, o número de colônias foi multiplicado pelo fator inverso da diluição da respectiva placa de contagem e o resultado foi expresso em UFC/g. Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.6. Análise estatística

Para a análise centesimal foi utilizado o teste t de Student. Nas médias dos valores de concentrações, óleos e óleos *versus* concentrações foi utilizada a Análise de Variância de Dois Fatores. Nas comparações entre os tratamentos (óleos e controle), concentrações e suas interações, foi utilizado o teste de Tukey. Se $p > 0,05$; não existe diferença significativa entre os grupos. Foi utilizado o software estatístico SAS versão 9.0, licenciado por UNESP, 2009.

3. Resultados

O lote de carne moída do qual foram retiradas as amostras apresentou contagem padrão inicial de 6×10^4 UFC/g. Este procedimento teve por objetivo comparar contagem antes e após procedimento de irradiação das amostras de alimentos, com a finalidade de eliminação total da microbiota residente no lote de carne, o que foi constatado através dos controles realizados ao longo de todo o experimento. Desta forma, concluíam-se que as contagens bacterianas obtidas eram referentes as bactérias inoculadas artificialmente e recuperadas posteriormente e não contaminantes eventuais.

Os aspectos gerais sobre as plantas utilizadas nos ensaios biológicos de sensibilidade para as linhagens bacterianas em estudo estão apresentados na Tabela 1.

Verificou-se um rendimento baixo dos OE a partir do material vegetal utilizado na sua produção além da confirmação da presença do timol nos membros desta família de plantas (Lamiaceae).

A análise centesimal (Tabela 2) objetivou verificar possíveis alterações nos componentes da carne e do hambúrguer em relação ao não irradiado. Foram realizadas determinações de umidade, proteína, lipídios e cinzas, para se ter uma idéia geral do produto. Foi possível constatar que a irradiação não alterou de forma significativa as amostras ($p > 0,05$ em todas as determinações). A literatura mostra que a porcentagem de água atinge 75% enquanto que a de proteínas esta na faixa de 20%, cinzas ao redor de 1% e lipídios (gordura intercelular) próximo de 3% (IAL, 1985). Desta forma, verificamos que o procedimento de irradiação não alterou de forma significativa as amostras de carne e hambúrguer bovino e que

estas estavam dentro dos limites esperados. Porém, acrescentamos que o objetivo do estudo não era estudar os aspectos relacionados ao processo de irradiação deste alimento, mas que este parâmetro deve ser sempre considerado em estudos futuros.

Tabela 1- Aspectos gerais sobre as plantas condimentares utilizadas nos ensaios biológicos de sensibilidade para as linhagens em estudo em carne moída e hambúrguer.

Espécies	Nome popular	Parte utilizada	Densidade (mg/mL)	Rendimento (%)	Compostos majoritários
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Folhas, caule	917	0,11	γ -terpineno (29,36%), ρ -cinemo (14,96%), cariofileno (7,81%) timol (54,19%),
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	Folhas, caule	900	0,10	γ -terpineno (11,72%), ρ -cinemo (7,39%) linalol (38,07%),
<i>Ocimum basilicum</i>	Manjeriçã	Folhas, caule	867	0,07	eugenol (10,06%), canfora (2,00%) terpineol (15,60%),
<i>Origanum majorana</i>	Manjerona	Folhas, caule	870	0,07	timol (9,66%), γ -terpineno (9,20%)

Tabela 2- Percentuais obtidos na análise centesimal de amostras de carne e hambúrguer antes e depois da irradiação.

Amostras	Umidade(%)	Proteína(%)	Gordura(%)	Cinzas(%)
Carne moída	73,1 a*	22,3 a*	2,2 a*	1,1 a*
Carne moída irradiada	73,6 a*	23,3 a*	1,9 a*	1,1 a*
Hambúrguer	75,6 a**	19,2 a**	2,5 a**	2,0 a**
Hambúrguer irradiado	75,3 a**	18,0 a**	2,3 a**	2,4 a**

*Letras iguais nas colunas para os parâmetros carne moída e carne moída irradiada não diferem entre si ($p>0,05$)

**Letras iguais nas colunas para os parâmetros hambúrguer e hambúrguer irradiado não diferem entre si ($p>0,05$)

Baseado nos resultados obtidos por Barbosa *et al.* (2009), optou-se por utilizar as concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 e 2,2 %v/v objetivando a padronização das análises e permitir a comparação da eficácia entre os óleos estudados, sendo o valor de 0,1%v/v um valor obtido próximo daquele obtido *in vitro*.

Na Figura 1 estão apresentados os valores médios de Log/UFC por grama de alimento frente a *Listeria monocytogenes* (azul) e *Salmonella Enteritidis* (vermelho) em função das concentrações de óleo essencial de orégano, tomilho, manjeriçã e manjerona. Verificou-se que até a concentração máxima de 2,2 %v/v todos os OE possibilitaram redução completa, ou

seja, não houve contagem bacteriana definida em log de UFC/g. Também percebeu-se que a linhagem de *L. monocytogenes* foi mais sensível, em alguns casos, a ação dos OE em carne e no hambúrguer que a *Salmonella*.

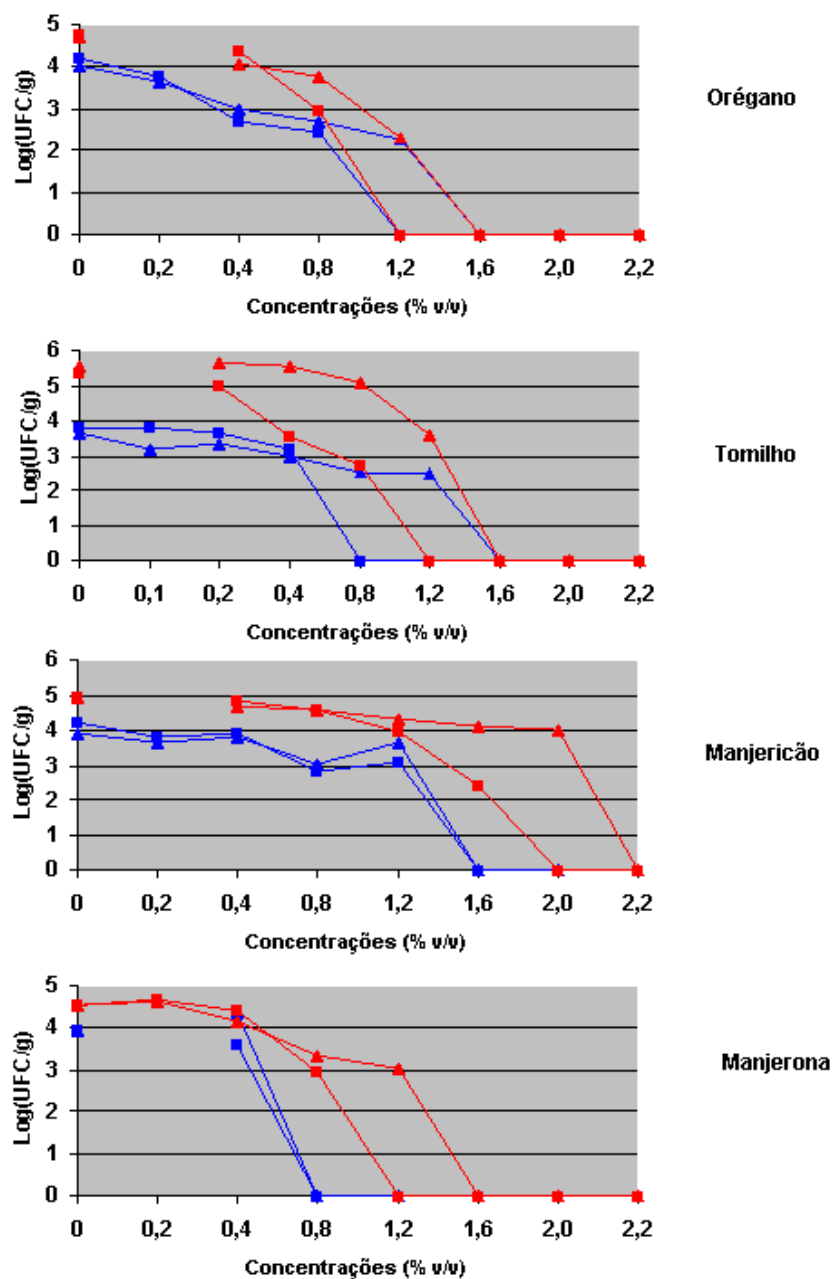


Figura 1. Números de Log de UFC/g de *L. monocytogenes* (azul) e *S. Enteritidis* (vermelho) recuperados de carne moída (triângulos) e hambúrguer (quadrados) em função de diferentes concentrações de óleo essencial.

Na Tabela 3 são apresentados os valores de CIM (%v/v) obtidos nos ensaios de sensibilidade para carne e hambúrguer bovinos.

Tabela 3-Valores de CIM obtidos para *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* nos ensaios de sensibilidade para carne e hambúrguer adicionados de OE.

Linagem	Alimento	Orégano	Tomilho	Manjeriçã	Manjerona
<i>L. monocytogenes</i>	Carne	1,6 b	1,6 b	1,6 c	0,8 a
	Hambúrguer	1,2 b	0,8 a	1,6 c	0,8 a
<i>S. Enteritidis</i>	Carne	1,6 a	1,6 b	2,2 c	1,6 a
	Hambúrguer	1,2 b	1,2 a	2,0 c	1,2 ab

*Valores seguidos de mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Na verificação da influência do tempo de contato entre os óleos essenciais e bactérias, utilizou-se as concentrações imediatamente inferiores aquelas capazes de reduzir as contagens microbianas a <10 UFC/g nos tempos de 0, 6, 24 e 48 horas, sendo as amostras mantidas em temperatura de geladeira durante todo o experimento. Os valores de Log de UFC/mL para contagens das bactérias em relação aos óleos estão apresentados nas Figuras 2 e 3. De maneira geral, verificou-se a maior sensibilidade de listeria e melhor eficácia do óleo de orégano em função do tempo de contato entre bactérias e os respectivos OE.

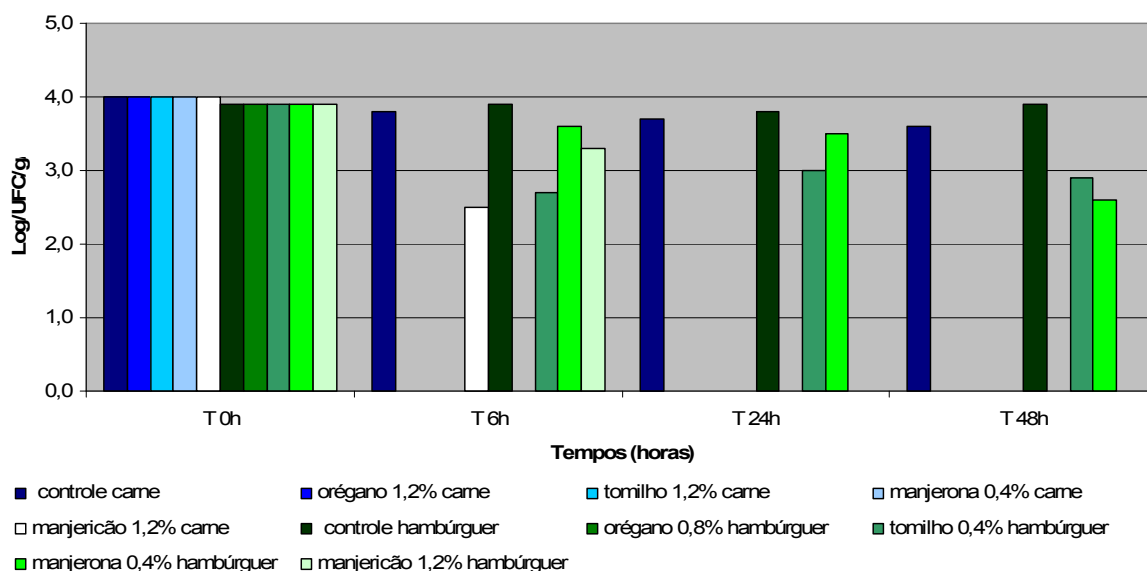


Figura 2- Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a *Listeria monocytogenes*, em carne e hambúrguer, nos tempos 0, 6, 24 e 48h.

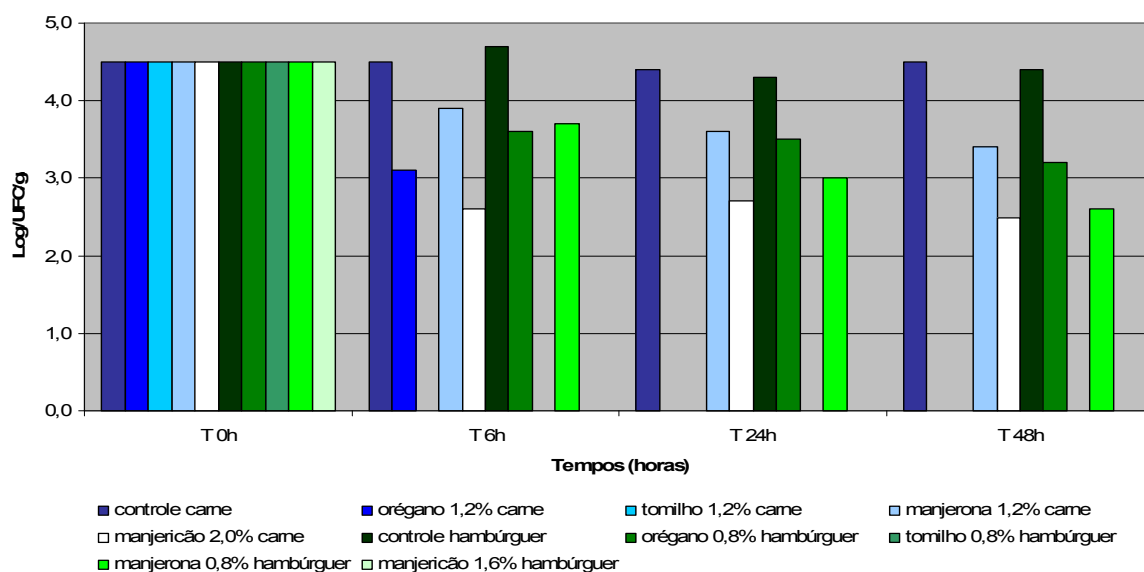


Figura 3- Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a *Salmonella* Enteritidis, em carne e hambúrguer, nos tempos 0, 6, 24 e 48h.

4. Discussão

Verificou-se que a concentração inicial utilizada dos óleos não foi eficiente sobre as linhagens de listeria e salmonela, confirmando assim os resultados de estudos que relatam que diretamente no alimento, os OE apresentam um perfil de ação inibidora diferente dos verificados *in vitro*, cuja explicação é a complexidade do sistema alimentar e as interações possíveis entre OE e os constituintes dos alimentos. Segundo Burt (2004), dentre os componentes presentes nos produtos cárneos, o elevado teor de gordura representa um redutor considerável da ação de OE. Em estudo realizado em queijos observou-se que a composição do alimento pode ser determinante na eficiência dos óleos essenciais de plantas, frente a *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis (Smith-Palmer *et al.*, 2001). Desta forma, justifica-se o fato de optarmos por uma preparação de hambúrguer bovino simples, visando reduzir ao máximo a quantidade de nutrientes que pudessem de alguma forma interagir com o óleo essencial comprometendo sua ação. Mesmo assim, estudos devem ser realizados com finalidade de testar a ação antimicrobiana de OE em modelos alimentares para determinar interações possíveis destes com aditivos e/ou ingredientes nos alimentos.

Skandamis and Nychas (2000) relataram que o OE de orégano pode contribuir com a segurança intrínseca de salada de berinjela, agindo sinergicamente com baixo pH e temperatura devido ao fato de que o óleo essencial torna-se mais hidrofóbico em baixo pH e, portanto, pode interagir de forma mais eficiente na fase lipídica da membrana bacteriana.

Segundo Mejlholm and Dalgaard (2002) a aplicação de OE como antimicrobianos em alimentos pode ser bem sucedida se usado em conjunto com níveis elevados de sal, reduzida atividade de água e pH e se sua adição respeitar os níveis palatáveis.

Em relação listeria na carne moída, verificou-se que o óleo de manjerona foi o mais eficiente reduzindo a contagem bacteriana inicial a <10 UFC/g na concentração de 0,8%. Os outros três óleos possibilitaram a redução na contagem em concentração de 1,6%, porém apenas orégano e tomilho apresentaram a mesma eficácia considerando-se a contaminação inicial das amostras. Desta forma, e com atividade antimicrobiana decrescente dos OE, temos que manjerona > orégano = tomilho > manjerição. Nas amostras de hambúrguer, manjerona e tomilho foram os óleos mais eficientes reduzindo a contagem de listeria a não detectável em 0,8%, enquanto que o óleo de manjerição só mostrou eficiência com o dobro desta concentração (manjerona = tomilho > orégano > manjerição).

Nos ensaios com salmonela, o óleo essencial de manjerição apresentou a menor eficiência inibitória na carne (2,2%) e em hambúrguer (2,0%). Assim, na carne moída os resultados foram manjerona=orégano>tomilho>manjerição enquanto para o hambúrguer os manjerona=orégano>manjerição e manjerona=tomilho>manjerição, sendo orégano≠tomilho.

De maneira geral, as bactérias mostraram maior sensibilidade aos OE na preparação de hambúrguer. Conforme já mencionado, o sal de cozinha (NaCl) em concentração suficiente, funciona como agente antimicrobiano, retardando a subsequente deterioração como consequência do aumento da pressão osmótica do meio, que se reflete na diminuição da atividade de água e dificultando a sua utilização pelas bactérias. Por isso, a presença deste ingrediente na formulação do hambúrguer pode ter funcionado como uma barreira adicional ao crescimento dos microrganismos estudados, quando comparada a carne moída *in natura*, o que se torna muito interessante uma vez que as carnes preparadas para consumo são sempre adicionadas de algum tipo de tempero e, dentre eles, algum teor de sal para realçar seu sabor.

A concentração de óleos essenciais consideradas eficientes reduziram em pelo menos 3,7 Log as contagens iniciais nos ensaios submetidos a contaminação artificial dos produtos cárneos, sendo esta redução na contagem obtida de forma bem pontual, com algumas quedas progressivas no número de unidades formadoras de colônias, quando o período de ação de óleo essencial foi de 3 horas. Por isso, considerou-se necessária a realização dos ensaios visando elucidar se um tempo maior de contato poderia reduzir a quantidade de OE necessária nos alimentos estudados, partindo-se novamente de uma contaminação artificial ao redor de 4 log/UFC/g para ambas bactérias (listeria e salmonela).

Quanto à associação listeria e carne, o óleo de manjerição, na concentração 1,2%v/v, reduziu a contagem a <10 UFC/g no tempo de 24 horas, enquanto OE de orégano, tomilho (1,2%v/v) e manjerona (0,4%v/v) reduziram as contagens a <10 UFC/g em período de 6 horas. Para listeria e hambúrguer, os OE de orégano e manjerição mantiveram a mesma eficiência enquanto tomilho e manjerona não foram capazes de reduzir as contagens a <10 UFC/g ao final de 48 horas de experimentação. Quanto a salmonela e carne, os óleos de orégano e tomilho foram capazes de reduzir as contagens a <10 UFC/g nos tempos 24 e 6 horas respectivamente, enquanto manjerona e manjerição proporcionaram discretas reduções ao final de 48 horas de experimentação. Para salmonela e hambúrguer, tomilho e manjerição foram os mais eficientes, com redução total na contagem ao final de 6 horas de contato, enquanto orégano e manjerona promoveram apenas discreta redução durante o período de contato de 48 horas.

A atividade antimicrobiana não depende apenas da composição química, mas também de sua configuração estrutural, grupos funcionais e possíveis interações sinérgicas entre seus componentes (Dorman and Deans, 2000). A composição química também é estudada para melhorar a compreensão sobre os alvos celulares das moléculas encontradas nas plantas (Souza *et al.*, 2005).

Verificou-se que no período de 3 horas, o óleo de manjerona exibiu expressiva eficiência contra os microrganismos testados, seguido de tomilho e orégano, sendo que este último apresentou os melhores resultados nos testes com variação de tempo. Acredita-se que o terpineol, maior componente encontrado no óleo de manjerona leve a inibição da respiração oxidativa, indução da deformação da membrana (dilatação) tendo como consequências mudanças na permeabilidade da membrana (Cox *et al.*, 2000), enquanto que o timol (tomilho) desintegra a membrana externa, presente na parede de bactérias Gram negativas, liberando os lipopolissacarídeos (LPS) e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP (Helander *et al.*, 1998). O p-cinemo (orégano/tomilho) é hidrofóbico e provoca importantes perturbações na membrana citoplasmática (Ultee *et al.*, 2002).

5. Conclusões

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi distinta em função do alimento, linhagem e tempo de contato. De forma geral, embora todos os óleos tenham demonstrado atividade antimicrobiana nos ensaios com 3 horas de contato, o OE de manjerona foi o que apresentou melhor eficiência antimicrobiana enquanto o de manjerição foi o menos eficiente. Já nos ensaios de variação temporal, o OE de orégano foi capaz de reduzir as contagens a <10

UFC/g em três dos quatro modelos de variação temporal estudados. Como recomendação sugere-se que a utilização destes produtos antimicrobianos de plantas em alimentos deve ser pautada nos níveis tolerados pelos consumidores e que este procedimento não deve ser utilizado como único meio de conservação de alimentos de qualquer natureza. Vale salientar que estudos futuros são necessários, em particular sobre aceitação dos óleos essenciais como aditivo nos alimentos testados.

6. Agradecimentos

Prof. Dr. Luciano Barbosa (Depto de Bioestatística/IBB/UNESP/Botucatu) pelas análises estatísticas; ao Prof. Dr. Julio Toshimi Doyama (Depto de Química e Bioquímica/IBB/UNESP/Botucatu) pelas análises cromatográficas dos óleos essenciais e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado.

7. Referências

- Adams, RP. Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, San Diego, CA: Academic Press, 1989.
- Andrews, WH; Flowers, RS; Silliker, J, and Bailey, JS. *Salmonella* In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th edition. Downes, FP; Ito, K. (eds.). Washington: Apha, 2001, pp.357-380.
- Barbosa, LN, Rall, VLM., Fernandes, AAH, Ushimaru, PI, Probst, IS, and Fernandes Junior, A. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. Foodborne Pathog.Dis. 2009; **6**:725-728.
- Bernardo –Gil, MG, Ribeiro, MA, and Esquivel, MM. Produção de extratos para a indústria alimentar: Uso de fluidos supercríticos. Bol. Biotecnol. 2002; **73**:14-21.
- Bertini, LM, Pereira, AF, Oliveira, CLL, Menezes, EA, Morais, SM, Cunha, FA, and Cavalcanti, E SB. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. Infarma 2005; **17**:80-83.

Burt, SA, and Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. Lett. Appl. Microbiol. 2003; **36**:62–167.

Burt, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. Int. J. Food Microbiol. 2004; **94**: 233-253.

Cardoso, L and Araújo, WMC. Parâmetros de qualidade em carnes comercializadas no Distrito Federal no período de 1997 – 2001. Hig. Aliment. 2003; **17**:12-18.

Conceição, MPJ, Faria, JAF, and Gândara, AL. Influência da temperatura de comercialização sobre a microbiota de carne bovina moída, em atmosfera modificada. Hig. Aliment. 2003; **17**: 67-72.

Cox, SD, Mann, JL, Bell, HC, Gustafson, JE, Warmingtn, JR, and Wyllic, SG. The mode of antimicrobial action of the essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 2000; **88**:170–175.

Dadalioglu, I, and Evrendilek, GA. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. J. Agric. Food Chem.2004; **52**:8255-8260.

Daferera, DJ, Ziogas, BN, and Polissiou, MG. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J. Agric. Food Chem.2000; **48**:2576-2581.

Deans, SG, and Svoboda, KP. The antimicrobial proprieties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. Flavour Fragrance J. 1990; **5**:187–190.

Devlieghere, F, Vermeulen, A, and Debevere, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. Food Microbiol. 2004; **21**:703–714.

Di Pasqua, R, De Feo, V, Villani, F, and Mauriello, G. In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbanaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Ann. Microbiol.* 2005; **55**:139-143.

Dorman, HJD. and Deans, SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 2000; **88**:308-316.

Fik, M., Surówka, K., and Firek, B. Properties of refrigerated ground beef treated with potassium lactate and sodium diacetate. *J. Sci. Food Agric.* 2008; **88**:91–99.

Fonseca, P, Librand, APL. Avaliação das características físico químicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Braz. J. Pharm. Sci.* 2008; **44**:271-277.

Gutierrez, J, Barry-Ryan, C, and Bourke, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Inter. J. Food Microbiol.* 2008; **124**: 91-97.

Helander, IM, Alakomi, H.-L, Latva-Kala, K, Mattila-Sandholm, T, Pol, I, Smid, EJ, Gorris, LGM., and Von Wright, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 1998; **46**:3590–3595.

Hitchins, AD. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In: *Bacteriological Analytical Manual*, 2003, 8th edition. Chapter 10.

Holley, RA, and Patel, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oil and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 2005; **27**:273-292.

IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4th edition, 1 st edition digital São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

Moreira, MR, Ponce, AG, Valle, CE, and Roura, SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Food Sci. Technol./Lebensm.-Wiss. Technol.* 2005; **38**:565-570.

Morton, RD. Aerobic Plate Count. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Downes FP, and Ito, K. (eds). Washington: Apha, 2001, pp. 63-67.

Nevas, M, Korhonen, AR, Lindstrom, M, Turkki, P, and Korkeala, H. Antibacterial efficiency of finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. J. Food Prot. 2004; **67**:199-202.

Oussalah, M, Caillet, S, Saucier, L, and Lacroix, M. Inibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Thyphimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control 2007; **18**:414-420.

Shan, B, Cai, Yi-Zhong, Brooks, JD, and Corke, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. Int. J. Food Microbiol. 2007; **117**:112–119.

Skandamis, PN, and Nychas, GJ. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various o temperatures, pHs, and Oregano essential oil concentrations. Appl. Environ. Microbiol.2000; **66**:1646–1653.

Smid, EJ, and Gorris, LGM. Natural antimicrobials for food preservation .In: Handbook of Food Preservation Rahman, MS (ed.). New York: Marcel Dekker, 1999, pp. 285–308.

Smith-Palmer, A, Stewart, J, and Fyfe, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiol. 2001; **18**:463-470.

Souza, EL, Lima, EO, and Naraim, N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às perspectivas da indústria alimentícia. Hig. Aliment. 2003;**17**:38-42.

Souza, EL, Stamford, TLM, Lima, EO, Trajano, VN, and Barbosa Filho, JM. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. Braz. Arch. Biol. Technol. 2005; **48**:549-558.

Souza, EL, Stamford, TLM, Lima, EO, and Trajano, VN. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. Food Control 2007; **18**:409–413.

Souza, SMC, Pereira, MC, Angélico, CL, and Pimenta, CJ. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. Ciên. Agrotec. 2004; **28**:685-690.

Ultee, A, Bennink, MHJ, and Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 2002; **68**:1561–1568.

Vági, E, Simándi, B, Suhajda, Á, and Héthelyi, É. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. Food Res. Int. 2005; **38**:51–57.

WHO. Food Safety and Foodborne Illness. Fact Sheet n. 237. World Health Organization, Reviewed March 2007.

Wu, VCH, Fung, DYC., and Kang, DH. Evaluation of thin agar layer method for recovery of cold-injured foodborne pathogens. J. Rapid Methods Automat. Micro. 2001; **9**:11–25.

CAPÍTULO II

*Escrito segundo normas da revista *LWT- Food Science and Technology*.

Capítulo II –Atividade antimicrobiana e teste de aceitação de óleos essenciais em hambúrguer bovino

Lidiane Nunes Barbosa¹, Cristiane Mengue Feniman¹, Nathalia Cristina Cirone Silva¹,
Ary Fernandes Junior¹

¹Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Brasil. Tel (14) 38116058 fax (14) 38153744 *ary@ibb.unesp.br

Resumo

Vários estudos ressaltam a propriedade antimicrobiana de óleos essenciais (OE) de plantas contra microrganismos veiculados por alimentos. No entanto, o potencial antimicrobiano dos OE tem sido diferente nos ensaios *in vitro* e em modelos alimentares. Objetivou-se verificar o efeito inibidor dos OE de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum* e *Origanum majorana* sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis inoculadas artificialmente em amostras de hambúrguer. Foram determinados os valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos OE em hambúrguer contaminado e posteriormente, foram realizados estudos de análise sensorial (escala hedônica de nove pontos) para verificar a aceitação dos OE adicionados no alimento. Nos ensaios para listeria os OE de manjerona e tomilho foram os mais eficientes, reduzindo as contagens a <10 UFC/g em 0,8%, enquanto que para salmonela o OE de manjerico foi o menos eficiente obtendo a mesma redução nas contagens bacterianas somente quando em 2,0%. Na análise sensorial, verificou-se que o valor máximo aceito para os OE ficou entre 0,03 a 0,08%, com melhor índice de aceitação a adição de 0,03% para o OE de manjerona (7,33±1,875/Gostei moderadamente). Embora os OE apresentem um potencial antimicrobiano, as concentrações possíveis divergem daquelas necessárias para obter ação inibidora sobre microrganismos patogênicos, não devendo ser usados isoladamente para garantir a qualidade microbiológica em alimentos.

Palavras chave: hambúrguer, óleos essenciais, aceitação.

Antimicrobial activity and acceptance testing of essential oils in meat burger

Lidiane Nunes Barbosa¹, Cristiane Mengue Feniman¹, Nathalia Cristina Cirone Silva¹,
Ary Fernandes Junior^{1*}

¹Departament of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, **Universidade Estadual Paulista**, Brazil. Tel (14) 38116058 fax (14) 38153744 * ary@ibb.unesp.br

Abstract

Several studies emphasize the antimicrobial property of extracts and essential oils (EOs) of plants against microorganisms carried by food. However, the antimicrobial potential of OE has been different in vitro and in food models. Aimed to verify the inhibitory effect of OE of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum* and *Origanum majorana* on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in artificially inoculated samples of hamburger. The values were determined minimum inhibitory concentration (MIC) of contaminated hamburger in OE and later, studies of sensory analysis (hedonic scale of nine points) to verify acceptance of the OE added to food. Tests for listeria in the OE of marjoram and thyme were the most efficient, capable of reducing bacterial count at <10 CFU/g by 0.8%, while for salmonella OE basil was the least efficient bacterial reducing counts at <10 CFU/g when only 2.0%. In the sensory analysis it was found that the maximum value accepted for the OE was from 0.03 to 0.08%, with better acceptance rate the addition of 0.03% for the OE marjoram (7.33 ± 1.875 / Gostei moderately). Although the OE offering potential antimicrobial concentrations possible differ from those needed for an inhibitory action on pathogenic microorganisms and should not be used in isolation to ensure the microbiological quality of food.

Keywords: burger, essential oils, acceptance.

1. Introdução

A incidência global das doenças de origem alimentar é de difícil estimativa, mas tem sido relatado que apenas em 2005, 1,8 milhões de pessoas morreram de doenças diarreicas. Normalmente este quadro é resultado de contaminações com agentes extrínsecos, químicos ou biológicos e, às vezes, a partir da toxicidade intrínseca associada com os próprios alimentos. Porém, a maioria é de origem microbiana que essencialmente utiliza-se de dois mecanismos, ou seja, ou refere-se a uma infecção ou intoxicação (WHO, 2004; WHO, 2007).

As tecnologias para conservação e extensão da vida de prateleira de alimentos incluem aditivos químicos, processamento térmico, embalagem com atmosfera modificada, embalagem a vácuo ou refrigeração. De forma geral, essas técnicas não eliminam totalmente os microrganismos patogênicos e deteriorantes, sendo que técnicas alternativas como tecnologias não-térmicas e adição de antimicrobianos naturais tem sido desenvolvidas e com aplicação em produtos alimentícios (Gutierrez, Barry-Ryan, & Bourke, 2009).

Recentemente, aditivos químicos têm tido certa restrição por parte de alguns consumidores, o que tem levado a indústria alimentar e pesquisadores desta área a buscar conhecimentos sobre usos dos compostos antimicrobianos naturais (Devlieghere, Vermeulen, & Debevere, 2004). A indústria alimentar tem procurado satisfazer as expectativas dos consumidores com produtos de sabor natural inalterado, valor nutricional e microbiologicamente seguros (Marsellés-Fontanet, Puig, Olmos, Mínguez-Sanz & Martín-Belloso, 2009). Neste contexto, as exigências dos consumidores quanto ao menor uso de aditivos conservantes motivam a criação de novos obstáculos para o desenvolvimento de patógenos nos alimentos (Hugas, 1998).

Os óleos essenciais (OE) são obtidos de plantas, geralmente por destilação, sendo constituídos de misturas variadas compostas principalmente por terpenóides e inúmeros hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular, ácidos, alcoóis, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas, sendo os terpenos, dentre os compostos químicos, o principal responsável pelos usos medicinal, culinário e flavorizante (Dorman, 2000).

A literatura é ampla quanto aos relatos de ação antimicrobiana *in vitro* de OE de plantas (Farag, Daw, Hewedi, & El-Baroty, 1989; Smith-Palmer, Stewart, & Fyfe, 1998; Cosentino, et al., 1999; Juliano, Mattana, & Usai, 2000; Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001; Delaquis, Stanich, Girard, & Mazza, 2002; Moreira, Ponce, Valle, & Roura, 2005; Solomakos, Govaris, Koidis, & Botsoglou, 2008; Barbosa, Rall, Fernandes, Ushimaru, Probst, & Fernandes Junior, 2009).

Quanto ao mecanismo de ação antimicrobiana dos OE, este depende de compostos naturalmente presentes no vegetal e originados durante o metabolismo secundário, e que no caso dos condimentos, como por exemplo, orégano, tomilho e cravo são geralmente hidrofóbicos e podem causar distúrbios ou ruptura da membrana de microrganismos (Helander et al., 1998).

Entretanto, para se obter o mesmo efeito antimicrobiano de OE em alimentos, são necessárias concentrações bem maiores que as verificadas nos ensaios *in vitro*. Segundo alguns relatos, o elevado teor de gordura em produtos cárneos apresenta-se como um marcante redutor da ação dos óleos essenciais (Burt, 2004).

A carne crua pode ser facilmente contaminada por microrganismos, além de possibilitar o crescimento de patógenos, o que a torna importante veículo de graves doenças de origem alimentar (Solomakos et al., 2008). Em contrapartida, o hambúrguer, se tornou popular pela praticidade que representa, atendendo as necessidades de quem vive em centros urbanos (Hautrive, Oliveira, Silva, Terra, & Campagnol, 2008). Devido a não ter outra proteção eficiente além do frio e, em consequência da grande superfície exposta, este produto está sujeito aos mesmos problemas de caráter microbiológico que os da carne moída.

Para o sucesso da aplicação dos óleos essenciais em sistemas alimentares, estudos preliminares em alimentos devem ser realizados para determinar as potenciais interações entre óleos e alimentos e como isto pode impactar na sua eficácia antimicrobiana (Gutierrez, Barry-Ryan, & Bourke, 2008).

Feitas tais considerações, o objetivo do trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de quatro plantas condimentares em hambúrguer bovino artificialmente inoculado com linhagens bacterianas patogênicas. Numa segunda etapa do estudo foi avaliado o grau de aceitação de hambúrguer acrescidos destes mesmos óleos através de análise sensorial utilizando a escala hedônica de nove pontos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Plantas e óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Ocimum basilicum* (manjeriço) e *Origanum majorana* (manjerona), foram preparados de acordo com a metodologia clássica de arraste direto pelo vapor d'água, utilizando um equipamento tipo Clevenger, da marca Marconi modelo M480 sobre amostras das plantas obtidas diretamente no mercado local de Botucatu/SP. As plantas, obtidas e utilizadas na forma fresca, eram introduzidas no compartimento próprio do equipamento e depois de

fechado, o equipamento era ligado e com ebulição e formação do vapor d'água, este atravessava a coluna do material vegetal provocando destruição celular do vegetal e arraste dos compostos voláteis presentes e posteriormente separados após condensação do vapor d'água e recuperação do óleo (Bernardo-Gil, Ribeiro, & Esquivel, 2002, Souza, Pereira, Angélico, & Pimenta, 2004). Após a produção dos óleos, foram realizados cálculos de produtividade (gramas de OE por grama de planta) e determinação de densidade dos OE (Fonseca & Librand, 2008).

2.2. Composição química

A análise química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GCMS), da marca Shimazu, modelo QP5050A (Adams, 1989).

2.3. Modelos cárneos

A formulação para o preparo do hambúrguer consistiu numa mistura de carne moída do tipo coxão mole (*semimembranosus*) (80%), sal (1,2%) e cebola picada (18,8%). A partir da formulação base o lote foi subdividido em porções de 10 gramas, seguido de congelamento, para a realização dos ensaios de inoculação artificial das bactérias e acréscimo das diferentes concentrações de óleos essenciais.

Para os testes de ação antimicrobiana dos óleos essenciais no modelo cárneo, as amostras de hambúrguer congeladas foram previamente irradiadas com uma dose de 10 kGy (Companhia Brasileira de Esterilização – CBE, Jarinu/SP) para eliminação da microbiota natural e dos microrganismos contaminantes durante o preparo do alimento. As amostras foram encaminhadas em caixa térmica contendo gelo, visando não ocorrer mudanças quanto ao estado de congelamento das amostras durante o processo de transporte e de esterilização.

Para análise sensorial, foram utilizados lotes de carne bovina moída, obtidos no comércio local de Botucatu/SP, para preparo do hambúrguer de acordo com a formulação já citada anteriormente no dia em que os testes de análise sensorial eram realizados.

2.4. Linhagens bacterianas

Foram testadas linhagens bacterianas de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis, isoladas de alimentos submetidos à análise microbiológica no Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNESP - Botucatu-SP. Estas linhagens foram identificadas e estocadas em Agar nutriente até a realização dos ensaios.

2.5. Testes de sensibilidade no modelo cárneo

As amostras utilizadas nos ensaios eram descongeladas em temperatura de geladeira na véspera dos experimentos seguido da contaminação artificial ao redor de 10^4 - 10^5 UFC/g de alimento. As linhagens utilizadas foram previamente cultivadas em Brain Heart Infusion (BHI-Difco) por 35°C/ 24 horas e padronizadas em solução salina estéril (0,85%) utilizando a escala de 0,5 MacFarland, que permite padronizar a suspensão bacteriana ao redor de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Foram realizados ainda ensaios controles com adição de bactérias no hambúrguer sem adição dos OE além de controles da esterilidade das amostras de hambúrguer.

A adição de cada bactéria, a partir das suspensões padronizadas, foi feita diretamente no alimento contido no saco plástico, sendo que após homogeneização da bactéria nos alimentos, foi feita adição dos volumes dos respectivos de óleos essenciais correspondente aos valores entre 0,1 até 2,2 %v/v, com variações em função dos OE e bactérias testadas. Após homogeneização dos óleos nas amostras, estas foram mantidas em temperatura de geladeira por período de 3 horas (Barbosa et al., 2009) seguido de diluição em água peptonada estéril (10g/90mL) para diluição seriada (10^{-1} a 10^{-5}) e plaqueamento em profundidade em Plate Count Agar (PCA). Estas placas foram incubadas a 35°C/24-48 horas e contagem de colônias feita nas placas contendo entre 25 e 250 UFC. Para o resultado final, o número de UFC foi multiplicado pelo fator inverso da diluição da respectiva placa de contagem e o resultado foi expresso em UFC/g.

2.6. Análise sensorial

As amostras de hambúrguer bovino cru sem e com a adição de óleos essenciais, foram avaliadas apenas quanto à aparência enquanto que as amostras de hambúrguer bovino grelhado e hambúrguer bovino grelhado com adição de óleos essenciais foram avaliadas quanto a sua aceitação geral, incluindo o sabor. Foi utilizada ficha de avaliação (Poste, Mackie, Butler, & Larmond, 1991), com escala hedônica de 09 pontos, sendo 1= desgostei extremamente, 2=desgostei moderadamente, 3=desgostei regularmente, 4=desgostei ligeiramente, 5=não gostei, nem desgostei, 6=gostei ligeiramente, 7=gostei regularmente, 8=gostei moderadamente e 9=gostei extremamente.

As amostras foram codificadas com três dígitos aleatórios e servidas em blocos incompletos, devido ao grande número de amostras e fadiga sensorial revelada pelo atributo testado. A análise incluiu um total de 60 provadores não-treinados de ambos os sexos, consumidores habituais de carne. Todos os participantes assinavam duas vias do consentimento esclarecido, e parecer do Comitê de Ética em Pesquisa obtido em 04/07/2005.

2.7. Análise estatística

Nas médias dos valores de concentrações, óleos e óleos *versus* concentrações foi utilizada a Análise de Variância de Dois Fatores. Nas comparações entre os tratamentos (óleos e controle), concentrações e suas interações, foi utilizado o teste de Tukey. Se $p > 0,05$; não existe diferença significativa entre os grupos. Na análise sensorial foram calculadas as médias dos provadores e aplicada a análise de variância ($p < 0,05$) e teste de Student. Foi utilizado o software estatístico SAS versão 9.0, licenciado por UNESP, 2009.

3. Resultados

A partir de controles realizados ao longo de todo o experimento, verificou-se que as amostras de hambúrguer utilizadas nos testes de sensibilidade tiveram eliminação total de sua microbiota pela irradiação, o que restringe a recuperação bacteriana a apenas as linhagens artificialmente inoculadas.

Informações sobre a densidade, rendimento e composição química dos óleos essenciais, estão apresentados na Tabela 1. Notou-se o baixo rendimento dos OE que variou de 0,07 a 0,11%, como também confirmou-se a presença de um dos principais compostos químicos, o timol, comum nos membros desta família de plantas.

Tabela 1- Aspectos gerais sobre as plantas condimentares utilizadas nos ensaios biológicos de sensibilidade e análise química de hambúrguer.

Plantas	Densidade (mg/mL)	Rendimento (%)	Compostos majoritários
<i>Orégano</i>	917	0,11	γ -terpineno (29,36%), p -cinemo (14,96), cariofileno (7,81%)
<i>Tomilho</i>	900	0,10	timol (54,19%), γ -terpineno (11,72%), p -cinemo (7,39%)
<i>Manjerição</i>	867	0,07	linalol (38,07%), eugenol (10,06%), canfora (2,00%)
<i>Manjerona</i>	870	0,07	terpineol (15,60%), timol (9,66%), γ -terpineno (9,20%)

Na Tabela 2, os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtidos nos testes de sensibilidade para os OE em função da espécie bacteriana estudada.

Tabela 2-Valores de CIM obtidos para *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* nos ensaios de sensibilidade e hambúrguer adicionados de OE.

Microrganismos	Orégano	Tomilho	Manjeriçao	Manjerona
<i>L. monocytogenes</i>	1,2 b	0,8 a	1,6 c	0,8 a
<i>S. Enteritidis</i>	1,2 b	1,2 a	2,0 c	1,2 ab

*Valores seguidos de mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Em relação a presença de listeria nas amostras de hambúrguer, verificou-se que a manjerona e tomilho foram os OE mais eficientes reduzindo a contagem a <10 UFC/g na concentração de 0,8%, enquanto que o OE de manjeriçao só mostrou eficiência com o dobro desta concentração, sendo que, em ordem decrescente de atividade antimicrobiana, manjerona=tomilho>orégano>manjeriçao. Para os ensaios com salmonela o OE de manjeriçao foi o menos eficiente pois reduziu contagem bacteriana a <10 UFC/g em concentração de 2,0% no alimento, sendo manjerona=orégano>manjeriçao e manjerona=tomilho>manjeriçao, porém com orégano $\neq$ tomilho.

Nas Figuras 1 e 2 estão apresentados os valores médios das notas atribuídas nos testes de aceitação de hambúrguer cru e grelhado respectivamente. Para as amostras cruas não houve diferença de aceitação ($p > 0,05$ em todos os tratamentos).

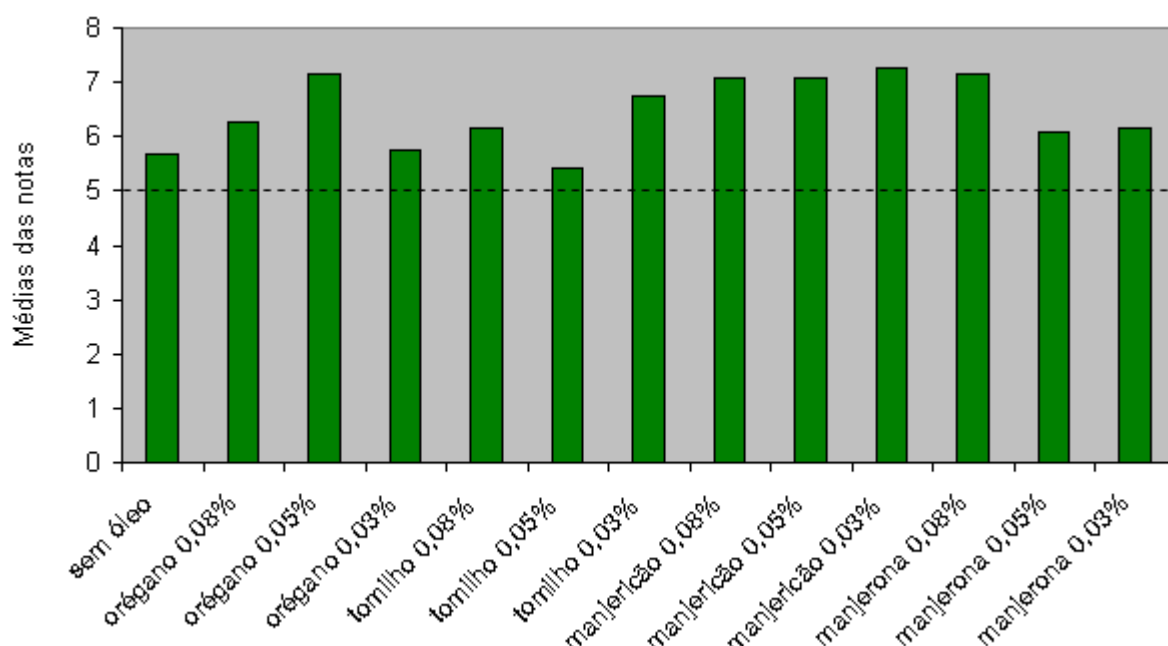


Figura 1 – Valores médios atribuídos nos testes de aceitação global das amostras de hambúrguer cru.

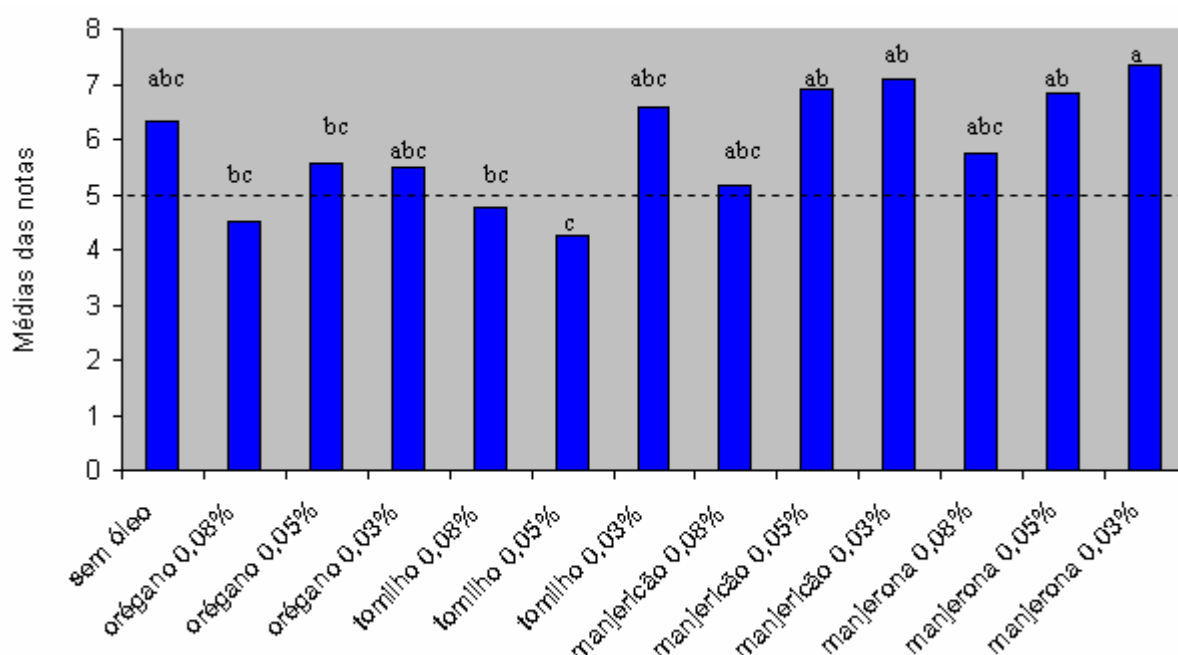


Figura 2 – Valores médios atribuídos nos testes de aceitação global das amostras de hambúrguer grelhado.

4. Discussão

Embora em valores distintos, todos os OE apresentaram atividade antimicrobiana quando acrescentados no hambúrguer. Para a listeria verificou-se uma maior eficiência dos OE de manjerona e tomilho, que possibilitaram redução total na contagem deste microrganismo com a adição de 0,08%, enquanto que para salmonela, a eficiência do OE de manjerona foi equivalente a dos óleos de tomilho e orégano, com ação melhor na concentração de 1,2%.

Conforme descrito por Shelef (1983); Farag et al., (1989); Smith-Palmer (1998); Cimanga et al., (2002); Harpaz, Glatman, Drabkin, & Gelman (2003) são frequentes os relatos de ação antimicrobiana mais efetiva dos óleos essenciais sobre linhagens de bactérias Gram-positivas quando comparados a linhagens de Gram-negativas.

De acordo com a análise química, o OE de manjerona apresentou grande quantidade de terpineol (15,6%), composto capaz de aumentar a permeabilidade celular e se acumular na membrana citoplasmática até níveis tóxicos (Mann, Cox, & Markham, 2000). O timol presente no tomilho e no orégano tem a capacidade de desintegrar a membrana externa de bactérias gram-negativas, liberando lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática para o ATP (Helander et al., 1998). Em estudo realizado por Di

Pasqua, De Feo, Villani, & Mauriello (2005), o OE de manjeriço foi pouco ativo, entretanto, as bactérias Gram-negativas foram mais sensíveis do que as Gram-positivas. Segundo Gutierrez et al. (2008), o linalool, maior composto encontrado no OE de manjeriço (38,07%), quando combinado com o 4-thujanol presente na manjerona pode contribuir para uma considerável atividade antimicrobiana, sendo esta combinação uma alternativa possível para reduzir os impactos organolépticos indesejáveis no alimento.

Nenhuma das concentrações utilizadas nos testes de sensibilidade pôde fazer parte dos testes de aceitação, pois embora os OE tenham mostrado atividade antimicrobiana evidente, sua adição no hambúrguer provocou efeitos sobre o aroma e no sabor do alimento. Então, a partir de resultados de testes preliminares optou-se por valores das concentrações de 0,03; 0,05 e 0,08%. Em estudo realizado por Solomakos et al. (2008), a aceitabilidade de amostras de carne tratadas com OE de tomilho a 0,9% esteve entre 4,5 e 4,8, ou seja, abaixo da nota cinco.

Quanto à análise sensorial, quando as amostras eram servidas cruas, portanto não disponível para degustação dos provadores, não houve diferença de aceitação do hambúrguer, ficando a análise restrita a avaliação de aspectos como odor e aparência geral. Tal análise foi realizada a fim de identificar possíveis alterações na aparência e textura que pudessem contribuir para a rejeição do produto pelos consumidores, o que não foi constatado uma vez que a média das notas ficou ao redor de 6,5.

Quando consideramos os valores atribuídos as amostras grelhadas, duas adições de óleos se destacam: a manjerona a 0,03% com a melhor média de aceitação (7,33) e tomilho a 0,05% obtendo a pior média (4,25) enquanto que o hambúrguer não adicionado de OE obteve média e mediana 6.

De acordo com Skandamis & Nychas (2000), a utilização óleos essenciais pode ser considerada uma barreira adicional no controle de microrganismos em alimentos, uma vez que o seu uso é limitado pelos aspectos sensoriais e pela menor atividade quando comparado aos ensaios microbiológicos *in vitro*. Nossos resultados mostraram o potencial antimicrobiano dos OE e em contrapartida revelaram que os valores de CIM não se equivalem aos níveis tolerados pelos consumidores em hambúrguer. Tomando como exemplo o óleo de manjerona, a maior concentração de OE aceito (0,08%) é cerca de dez e quinze vezes menor do que o valor de CIM obtido para listeria e salmonela, respectivamente. Quando a mesma comparação é feita com a concentração de 0,03%, que mostrou a maior média de aceitação, a proporção é de 26,7 e 40 vezes. Também vale a pena lembrar que os resultados dos testes de sensibilidade foram obtidos em condições experimentais, onde as linhagens patogênicas não estavam

expostas a competição microbiana e que foram consideradas eficientes valores de CIM capazes de eliminar por completo as contagens.

Contudo, observa-se a necessidade de estudos que visem a utilização conjunta de óleos essenciais e outras barreiras que possam atuar sinergicamente, visando garantir a segurança microbiológica de alimentos sem, no entanto afetar seus aspectos organolépticos.

Agradecimento: A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado.

Referências:

Adams, R. P. (1989). Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, Academic Press, Inc., San Diego, California.

Barbosa, L. N., Rall, V. L. M., Fernandes, A. A. H., Ushimaru, P. I., Probst, I. S., & Fernandes Junior, Ary. (2009). Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(6), 725-728.

Bernardo –Gil, M. G., Ribeiro, M.A. & Esquivel, M. M. (2002). Produção de extratos para a industria alimentar: Uso de fluidos supercríticos. *Boletim de Biotecnologia*, 14-21.

Burt, S. (2004). Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 233-253.

Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters, L., & Vlietinck, A.J. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 213-220.

Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 130-135.

Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 101–109.

Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6), 703–714.

Di Pasqua, R., De Feo, V., Villani, F., & Mauriello, G. (2005). In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbanaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Annals of Microbiology*, 55(2), 139-143.

Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.

Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewedi, F. M., & El-Baroty, G. S. A. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*, 52, 665-667.

Fonseca, P., & Librand, A.P.L.(2008). Avaliação das características físico químicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(2), 271-277.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 91-97.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26,142–150.

Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., & Gelman, A. (2003). Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*, 66(3), 410–417.

Hautrive, T. P., Oliveira, V. R., Silva, A. R. D., Terra, N. N., & Campagnol, P. C. B. (2008). Análise físico-química e sensorial de hambúrguer elaborado com carne de avestruz. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 95-101.

Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., & Von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590–3595.

Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation of Meat and Meat Products. *Meat Science*, 49, 139-150.

Juliano, C., Mattana, A., & Usai, M. (2000). Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research*, 12, 516–522.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P., & Nychas, G. J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462.

Mann, C. M., Cox, S. D., & Markham, J. L. (2000). The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30(4), 294-297.

Marsellés-Fontanet, À. R., Puig, A., Olmos, P., Mínguez-Sanz, S., & Martín-Belloso, O. (2009). Optimising the inactivation of grape juice spoilage organisms by pulse electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), 159–165.

Moreira, M. R., Ponce, A. G., Valle, C. E., & Roura, S. I. (2005). Inibithory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT Food Science and Technology*, 38, p.565-570.

Poste, L. M., Mackie, D. A., Butler, G. & Larmond, E. (1991). Laboratory methods for sensory analysis of food. Ottawa: Canada Communication Group.

Shelef, L.A. (1983). Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*, 6, 29-44.

Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. (2000). 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*, 66(4), 1646–1653.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology*, 26(2), 118–122.

Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., & Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology*, 25(1), 120-127.

Souza, S.M.C., Pereira, M.C., Angélico, C.L. & Pimenta, C.J. (2004). Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. *Ciências Agrotécnicas*, 28(3), 685-690.

WHO. (2004). Food and Health in Europe: a new basis for action. Regional Publications European Studies. *World Health Organization*, 96.

WHO. (2007). Food Safety and Foodborne Illness. *World Health Organization*. Fact Sheet n. 237.

—CAPÍTULO III

*Escrito segundo normas da revista *Foodborne Pathogens and Disease*

Capítulo III– Óleos essenciais: Caracterização química e atividade antimicrobiana sobre a microbiota de carne bovina moída - mesófilos e psicrotróficos

Lidiane Nunes Barbosa¹, Gabriela Soares da Silva¹, Julio Toshimi Doyama²,
Ary Fernandes Junior¹

¹Departamento de Microbiologia e Imunologia, ²Departamento de Química e Bioquímica,
Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Brasil.

Tel (14) 38116058 fax (14) 38153744 *ary@ibb.unesp.br

Resumo

A atividade antimicrobiana de produtos vegetais tem se mostrado uma alternativa potencial para uso em alimentos. A carne moída é considerada um alimento muito perecível sendo sua microbiota constituída principalmente de microrganismos mesófilos e psicrotróficos. Objetivamos caracterizar quimicamente (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa -CG-SM) amostras de óleos essenciais (OE) de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Ocimum basilicum* (manjeriço) e *Origanum majorana* (manjerona) e estabelecer o potencial antimicrobiano destes OE sobre a microbiota natural de carne moída após 6 horas da adição de OE, nas concentrações de 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; e 2,2% diretamente no alimento. A metodologia da contagem padrão de mesófilos foi a da diluição seriada e plaqueamento em profundidade em meio Plate Count Agar (PCA) seguido de incubação a 37°C/48 horas. Para psicrotróficos, foi realizado plaqueamento em superfície em PCA e incubação a 5°C/7 dias. Segundo CG-SM, o OE de orégano apresentou como compostos majoritários: γ -terpineno (29,36%), *p*-cinemo (14,96) e cariofileno (7,81%); tomilho: timol (54,19%), γ -terpineno (11,72%) e *p*-cinemo (7,39%); manjeriço: linalol (38,07%), eugenol (10,06%) e canfora (2,00%) e manjerona: terpineol (15,60%), timol (9,66%) e γ -terpineno (9,20%). Quanto aos ensaios microbiológicos verificou-se para mesófilos redução de 1,1 Log (UFC/g) quando adicionado 2,2% de OE de orégano, enquanto para psicrotróficos, o OE de orégano reduziu contagem microbiana a não detectável (redução de 5,4 Log/UFC) em 2,2% e o OE de tomilho reduziu em 2,9 Log/UFC quando adicionado na mesma concentração. Assim, concluiu-se que os óleos essenciais apresentaram potencial antimicrobiano em modelo cárneo, porém as concentrações utilizadas merecem atenção especial com finalidade de ajustá-las para que não venham a atingir valores que influenciem em aspectos relativos a aceitabilidade do alimento.

Palavras chave: óleos essenciais, carne moída, mesófilos, psicrotróficos.

Essential oils: Chemical analysis and antimicrobial activity on the mesophilic and psychrotrophic microbiota of minced meat

Lidiane Nunes Barbosa¹, Gabriela Soares da Silva¹, Julio Toshimi Doyama²,
Ary Fernandes Junior¹

¹Departament of Microbiology and Immunology, ² Departament of Chemistry and Biochemistry, Biosciences Institute, **Universidade Estadual Paulista**, Brazil.

Tel (14) 3811-6058 fax (14) 38153744 * ary@ibb.unesp.br

Abstract

The antimicrobial activity of plant products has shown a potential alternative for use in foods. The minced meat is considered a highly perishable food, which encourages microbial contamination and multiplication, and its flora consists mainly of mesophilic and psychrotrophic. We aim to characterize chemical (gas chromatography-mass spectrometry and GC-MS) samples of essential oils (EOs) of *Origanum vulgare* (oregano), *Thymus vulgaris* (thyme), *Ocimum basilicum* (basil) and *Origanum majorana* (marjoram) and set the the antimicrobial effects of EO on the natural microflora of minced meat after 6 hours of the addition of EO, at concentrations of 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, and 2.2% directly in food. The methodology for mesophilic count was of the serial dilution and plate in the middle Plate Count Agar (PCA) followed by incubation at 37°C/48 hours, and to psychrotrophic, surface plating on PCA and incubated at 5°C/ 7 days. According to GC-MS, EO oregano presented as the main compounds: γ -terpinene (29.36%), ρ -cineme (14.96) and caryophyllene (7.81%); thyme: thymol (54.19%), γ -terpinene (11.72%) and ρ -cineme (7.39%); basil: linalool (38.07%), eugenol (10.06%) and camphor (2.00%) ρ and marjoram: terpineol (15.60%), thymol (9.66%) and γ -terpinene (9.20%). The microbiological testing was found for bacteria reduction of 1.1 log (CFU / g) added 2.2% while EO oregano, while for psychrotrophic, EO oregano reducing at <10 CFU/g microbial contamination (5.4 log reduction / CFU) in 2.2% and EO thyme reduced by 2.9 log / CFU when added at the same concentration. Thus, it appears that the essential oils showed antimicrobial activity in model meat product, but the concentrations used deserve special attention in order to adjust them so they do not reach values that influence in matters relating to acceptability of food.

Keywords: essential oils, micend meat, mesophilic, psychrotrophic.

1. Introdução

A carne é um dos produtos mais consumidos no mundo. Analisada pelo aspecto nutricional é uma fonte ideal de aminoácidos essenciais e, em menor extensão, de alguns minerais. Entre os atributos positivos da carne está a sua habilidade de suprir o ferro, como também aumentar a absorção de ferro de fontes não cárneas consumidas concomitantemente. Seu grande consumo também se deve a grande variedade de técnicas de preparo a que pode ser submetida e ao seu sabor (Verruma-Bernardi, 2001; Lawrie, 2005).

A carne crua pode ser facilmente contaminada por microrganismos, além de possibilitar o crescimento de patógenos, o que a torna importante veículo de graves doenças de origem alimentar (Solomakos *et al.*, 2008). A carne moída, em particular, apresenta maiores problemas microbiológicos que os cortes, por sofrer maior manipulação e possuir maior relação área/ volume (Conceição *et al.*, 2003).

Sendo a carne moída um alimento muito perecível, o prolongando de sua vida útil é um objetivo importante para produtores. A perda de frescor da carne após moagem é resultado, principalmente, da atividade de enzimas endógenas e exógenas, oxidação dos lipídios e pigmentos e putrefação bacteriana. Em geral, a contaminação bacteriana da carne é causada por microrganismos que mostram maior taxa de crescimento durante armazenamento. (Fik *et al.*, 2008).

Altos níveis de contaminação microbiana, usualmente encontrados em alimentos de origem animal e nos ambientes de processamento, podem inibir a multiplicação de microrganismos patogênicos nesses produtos e interferir nos resultados das análises laboratoriais para o isolamento desses patógenos (Barros *et al.*, 2007).

Alguns pesquisadores verificaram a influência da microbiota autóctone sobre a sobrevivência de microrganismos patogênicos como a *Escherichia coli* (Saad and Franco, 1999) e a *Listeria monocytogenes* (Buchanan and Bagi, 1999; Marshall *et al.*, 1992). A dinâmica da interferência depende da presença de microrganismos antagonistas e também de sua capacidade de produzir substâncias inibitórias. Em carne e produtos cárneos, a microbiota autóctone inclui a microbiota natural da carne e os contaminantes determinados pelas condições higiênicas durante o processamento (Jay, 1996; Bagge-Ravn *et al.*, 2003).

De acordo com Nortjé *et al.* (1989), uma boa refrigeração irá preservar a qualidade da carne, mas não servirá de garantia de sua qualidade se a contagem microbiana inicial for elevada.

As especiarias, como todos os vegetais, são possuidoras de vias metabólicas secundárias que dão origem a compostos antimicrobianos específicos a determinadas famílias,

gêneros ou espécies (Souza *et al.*, 2003). No que diz respeito à atividade antimicrobiana em alimentos, não se deve esquecer que as especiarias e ervas podem portar contaminantes microbianos, podem servir como substrato para o crescimento microbiano e produção toxinas, e que os montantes de especiarias e ervas adicionadas aos alimentos são geralmente muito baixos para evitar deterioração por microrganismos (Ceylan and Fung, 2004).

A literatura é ampla quanto aos estudos sobre ação antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares (Dorman and Deans, 2000; Burt and Reinders, 2003; Harpaz *et al.*, 2003; Dadalioglu and Evrendilek, 2004; Moreira *et al.*, 2005; Busatta *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2009) sobre microrganismos de interesse em alimentos tanto *in vitro* quanto em sistemas alimentares.

A expressão da atividade antimicrobiana dos OE destas plantas é bem estabelecida. Há consenso de que maioria esmagadora dos compostos aromáticos e fenólicos exerce seus efeitos antimicrobianos na membrana citoplasmática, alterando a sua estrutura e função (Holey and Patel, 2005).

Algumas espécies de plantas são conhecidas por possuir OE com atividade antimicrobiana. Entre eles pode-se citar terpinen-4-ol, γ -terpineno, a-terpineno de *Origanum majorana* (Daferera *et al.*, 2000; Busatta *et al.*, 2008), 1,8 cineol, α -pineno de *Rosmarinus officinalis* (Daferera *et al.*, 2000); metil eugenol, β -carofileno e eugenol de *Laurus nobilis* (Dadalioglu and Evrendilek, 2004); eucaliptol, β -thujone, α -thujone e borneol de *Salvia officinalis* (Hayouni *et al.*, 2008) e linalool do *Ocimum basilicum*, citral de *Melissa officinalis*, carvacrol de *Origanum vulgare* e thymol de *Thymus vulgaris* (Gutierrez *et al.*, 2008).

Assim objetivamos caracterizar quimicamente os OE através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) e verificar a influencia da adição de OE de plantas utilizadas na culinária sobre a microbiota natural de carne bovina moída vendida comercialmente, após o contato de 6 horas sob temperatura de refrigeração.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção dos óleos essenciais e caracterização química

Os óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Ocimum basilicum* (manjeriço) e *Origanum majorana* (manjerona), foram preparados de acordo com a metodologia clássica de arraste direto pelo vapor d'água, utilizando um equipamento tipo Clevenger, da marca Marconi modelo M480 (Bernardo-Gil *et al.*, 2002,

Souza *et al.*, 2004). Após obtenção dos OE foram determinados os valores de rendimento dos óleos e densidade (Fonseca and Librand, 2008).

A análise química foi feita através de um espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo gasoso (GCMS), da marca Shimadzu, modelo QP5050A, utilizando-se uma coluna capilar, CBP-5, de 50m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25mm e 0,25µm de espessura do filme. A temperatura do injetor e da interface foi de 250⁰C o detector operou em modo EI a 70eV e utilizando-se He como gás de arraste. As condições cromatográficas foram: **orégano**- Temperatura inicial de 60 ⁰C, aquecimento até 160⁰C, com taxa de 3⁰C.min⁻¹, aquecimento até 180⁰C a uma taxa de 10⁰C.min⁻¹ e manutenção desta temperatura por 5min., aquecimento a 15⁰C.min⁻¹ até 200⁰C e manutenção desta por 3min., e aquecimento a taxa de 20⁰C.min⁻¹ até 220⁰C e mantendo-a por 10min.; **tomilho, manjerição e manjerona**- Temperatura inicial de 60 ⁰C, aquecimento até 160⁰C, com taxa de 3⁰C.min⁻¹, aquecimento até 220⁰C a uma taxa de 15⁰C.min⁻¹ e manutenção desta temperatura por 10 min. A identificação dos componentes do óleo essencial foi feita com base na biblioteca NIST, análise dos espectros de massas e também nos dados da literatura (Adams, 1989).

2.2. Modelos cárneos

Utilizou-se carne bovina moída *in natura*, do tipo coxão mole (*semimembranosus*), obtida no comercio local de Botucatu-S.P. As amostras eram obtidas no mesmo dia da realização dos ensaios e mantidas sob refrigeração até o momento das análises. Em capela de fluxo laminar, a partir de um lote único, eram retiradas porções de 25g de carne que eram colocadas em placas de Petri estéreis onde recebiam os respectivos volumes de óleos essenciais. A homogeneização, feita de forma a obter uma perfeita distribuição de cada um dos OE na carne, foi realizada com o auxílio de bastão de vidro em L também estéril.

2.3. Análise centesimal

A análise compreendeu determinações de umidade, proteínas, lipídios e cinzas (IAL, 2008). As análises foram realizadas em triplicata no Laboratório de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, da Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP-Botucatu.

2.4. Determinação da ação antimicrobiana dos óleos essenciais sobre a microbiota de carne bovina moída *in natura*

Foi realizada a adição dos respectivos de óleos essenciais em mostras de carne bovina moída, nas concentrações 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; e 2,2%. Após homogeneização estas foram mantidas em temperatura de geladeira. Os ensaios foram realizados para amostras controles, ou seja, sem adição de óleos e para as amostras que receberam os óleos essenciais. Após o período de 6 horas para contato bactérias da microbiota da carne x OE, procedeu-se a diluição seriada das amostras, iniciando 25 gramas em 225 mL de água peptonada estéril, seguido de diluições (10^{-1} a 10^{-5}) e plaqueamento em profundidade em PCA (Plate Count Agar) para contagem padrão de mesófilos facultativos e plaqueamento em superfície em PCA, com auxílio de bastão em L estéril, para contagem de psicrotróficos. O procedimento de incubação foi a 37°C/48 horas para contagem padrão e temperatura de geladeira ($\pm 5^\circ\text{C}/7$ dias). Após o período de incubação foram realizadas as leituras através da contagem de colônias (UFC), de placas contendo entre 25 e 250 UFC, com o auxílio de um contador de colônia digital marca Phoenix. Para os resultados finais, o número de UFC foi multiplicado pelo fator inverso da diluição da respectiva placa de contagem e o resultado foi expresso em UFC/g. (Morton, 2001), posteriormente transformados nos respectivos valores de Log. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3. Resultados

Na Tabela 1 são apresentados dados gerais das plantas utilizadas nos ensaios de sensibilidade. Como é verificado para muitas plantas, mesmo as aromáticas, nota-se que o rendimento (massa de matéria prima/massa de óleo essencial) foi extremamente baixo, com valores entre 0,07 para manjerição e manjerona e 0,10 e 0,11% para tomilho e orégano respectivamente.

Tabela 1- Aspectos gerais das plantas utilizadas nos testes de sensibilidade frente a microbiota da carne moída.

Espécies	Nome popular	Densidade (mg/mL)	Rendimento (%)
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	917	0,11
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	900	0,10
<i>Ocimum basilicum</i>	Manjerição	867	0,07
<i>Origanum majorana</i>	Manjerona	870	0,07

Os valores obtidos na análise centesimal das amostras estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Percentuais obtidos na análise centesimal de amostras de carne.

Determinações	Umidade	Proteína	Gordura	Cinzas
Porcentagem	73,1	22,3	2,2	1,1

Nas Figuras 1, 2, 3 e 4 são apresentados os cromatogramas dos OE de orégano, tomilho, manjeriço e manjerona, respectivamente, com destaque para os compostos identificados.

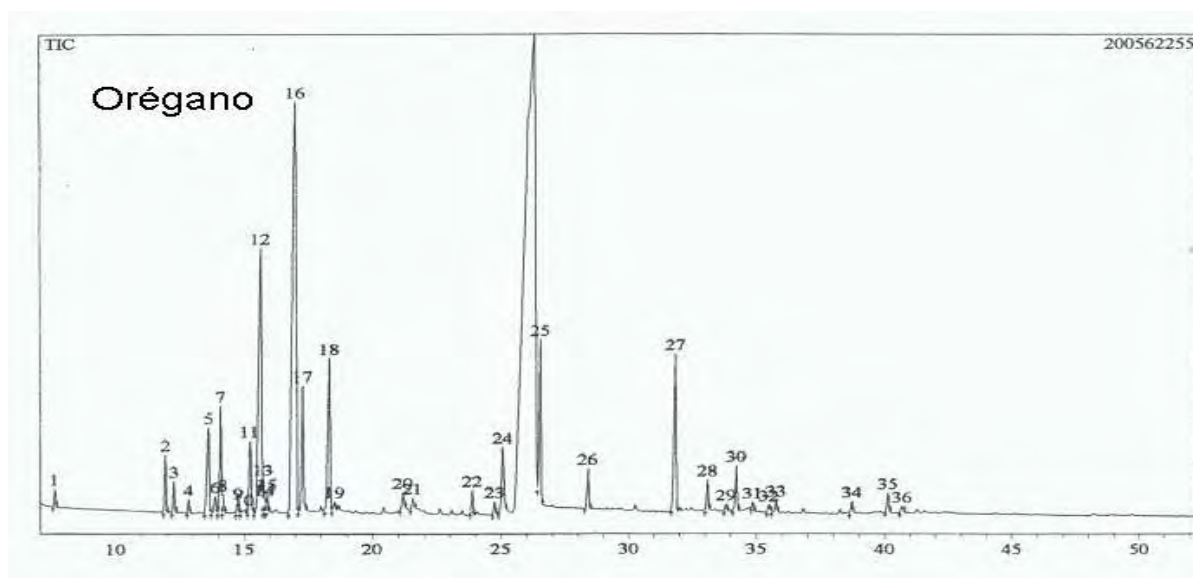


Figura 1- Cromatograma para o OE de Orégano, com destaque para compostos identificados e respectivos percentuais na composição do óleo. **3-** α -pineno (0,84%); **5-** 1-octen-3-ol (3,88%); **7-** mircenol (3,44%); **11-** α -terpineno (2,99%); **12-** p-cinemo (14,96); **13-** limoneno (0,76%); **16-** γ -terpineno (29,36%); **18-** linalol (7,13%); **20-** borneol (0,66%); **25-** timol (5,93%); **27-** cariofileno (7,81%); **29-** germacreno (0,25%); **31-** bisabolol (0,25%).

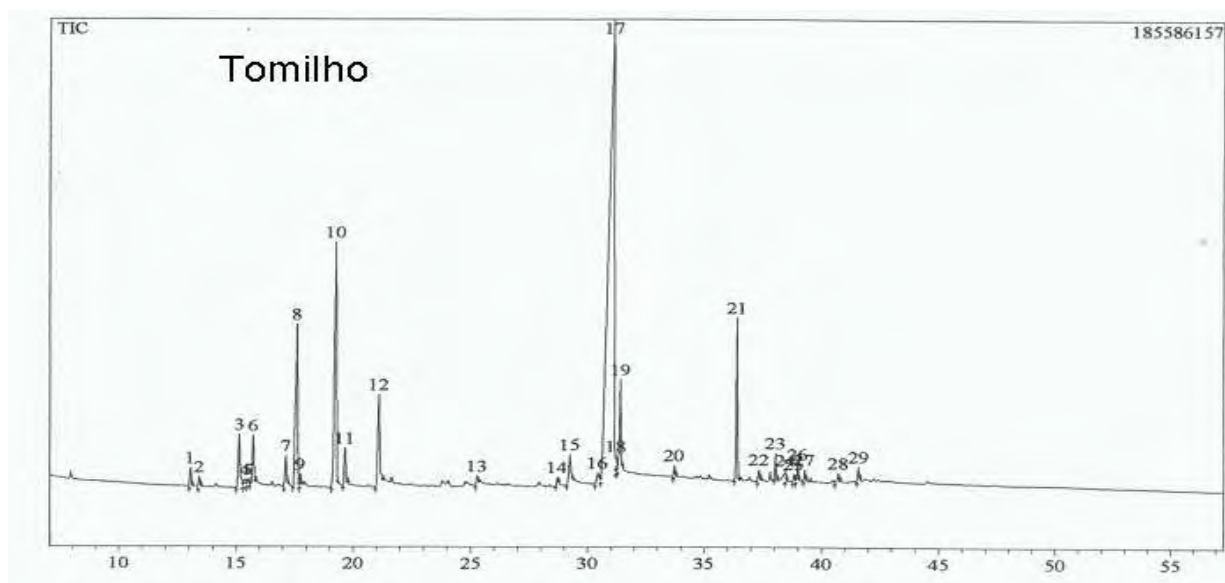


Figura 2- Cromatograma para o OE de Tomilho, com destaque para compostos identificados e respectivos percentuais na composição do óleo: **2-** β -pineno (0,32%); **3-** 1-octen-3-ol (2,13%); **8-** p -cinemo (7,39%); **10-** γ -terpineno (11,72%); **12-** linalol (3,86%); **17-** timol (54,19%); **18-** cinerona (0,46%); **21-** trans-cariofileno (4,94%); **22-** α -cariofileno (0,49%); **23-** germacreno D (0,74%).

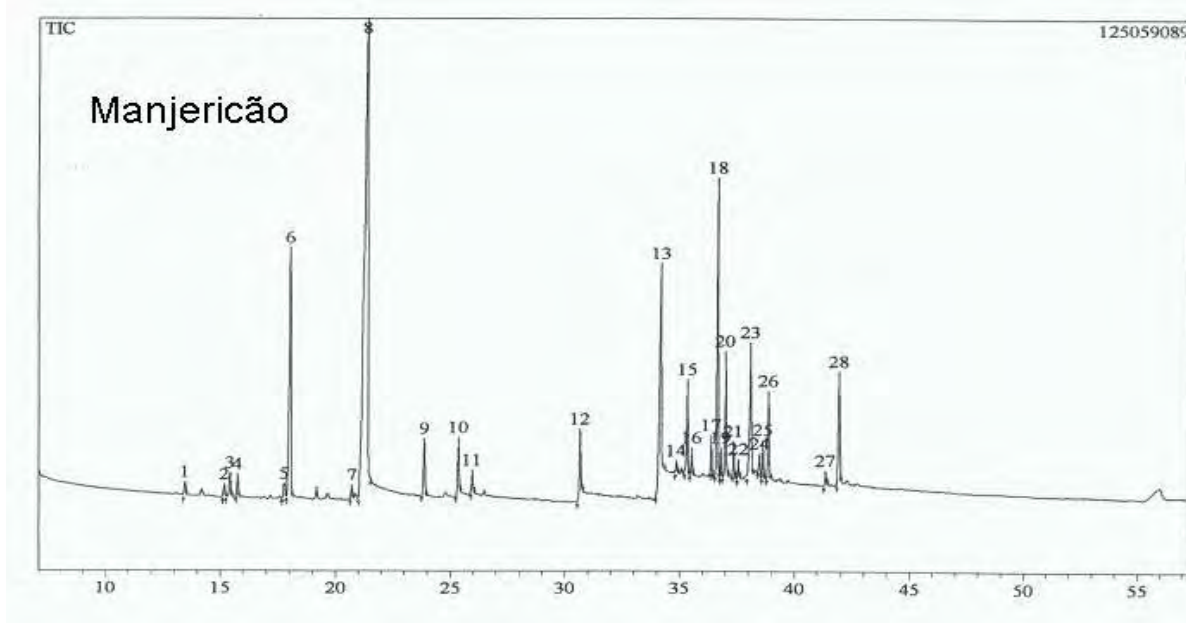


Figura 3- Cromatograma para o OE de Manjerição, com destaque para compostos identificados e respectivos percentuais na composição do óleo: **1-** α -pineno (0,41%); **2-** β -pineno (0,40%); **3-** mirceno (0,75%); **5-** limoneno (0,68%); **8-** linalol (38,07%); **9-** canfora (2,00%); **13-** eugenol (10,06%); **14-** cepaeno (0,36%); **17-** β -cariofileno (0,93%); **24-** germacreno (0,64%).

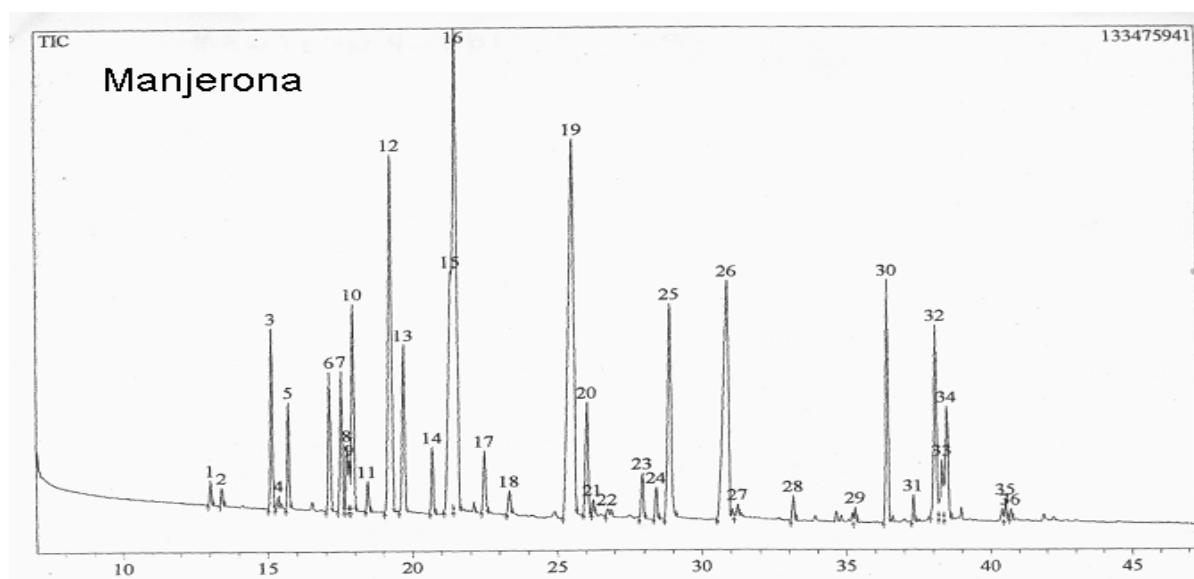


Figura 4- Cromatograma para o OE de Manjerona, com destaque para compostos identificados e respectivos percentuais na composição do óleo: **2-** α -pineno (0,23%); **3-** β -pineno (2,86%); **5-** mirceno (1,47%); **6-** α -terpineno (2,32%); **8-** limoneno (1,07%); **10-** ocimeno (3,67%); **12-** γ -terpineno (9,20%); **15-** linalol (7,39%); **19-** terpineol (15,60%); **26-** timol (9,66%); **30-** β -cariofileno (4,11%); **34-** germacreno (2,56%).

Na Figura 5 os valores médios de Log/UFC/g de microrganismos mesófilos e na Figura 6 os valores médios de Log/UFC/g de microrganismos psicrotróficos, em função das concentrações de OE, ambos em carne moída.

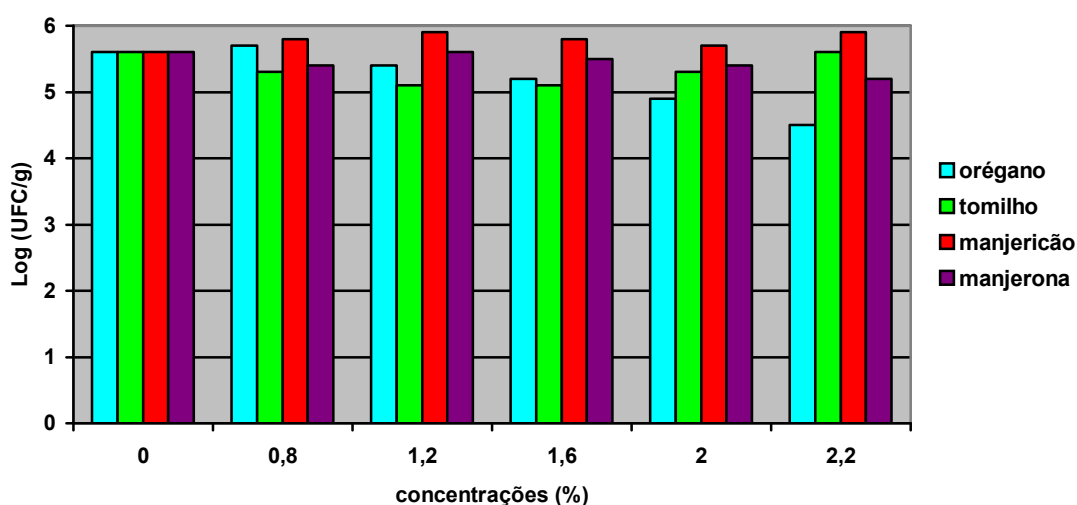


Figura 5- Valores médios de Log/UFC/g de microrganismos mesófilos em carne moída em função das concentrações de óleos essenciais.

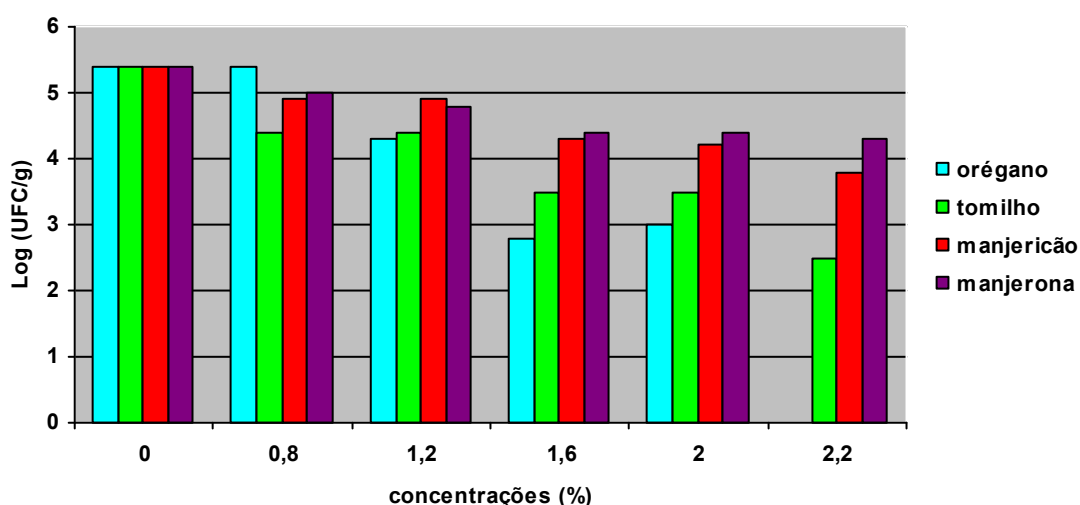


Figura 6- Valores médios de Log/UFC/g de microrganismos psicrotróficos em carne moída em função das concentrações de óleos

4. Discussão

A contaminação inicial das amostras de carne moída obtidas no comércio local foi de 5,6 Log de UFC/g para microrganismos mesófilos e de 5,4 log de UFC/g para os psicrotróficos. Sabe-se que as condições de armazenamento, o tipo e o número inicial de microrganismos influenciam diretamente na qualidade da carne. Segundo Ercolini *et al.* (2009) a principal diferença entre a capacidade de crescimento de bactérias mesófilas e psicrotróficas é o fato de que estas últimas são desfavorecidas no crescimento a 30°C.

A atividade dos OE sobre os microrganismos mesófilos foi inexpressiva uma vez que até a maior concentração testada (2,2%) as contagens microbianas não reduziram ao menos em 1 Log/UFC/g.

Quanto à ação inibidora sobre as bactérias psicrotróficas, verificou-se resultados mais promissores. Em concentração de 1,6%, o OE de orégano foi capaz de reduzir as contagens em 2,6 Log/UFC/g e eliminação completa desta população microbiana em concentração de 2,2% na carne. Para os demais OE não foram obtidas reduções totais nas contagens, sendo que na maior concentração (2,2%) do tomilho este possibilitou redução de 2,9 log, o manjeriçao 1,6 e manjerona 1,1 Log/UFC/g.

Em relação à eficiência dos OE, alguns estudos destacam a semelhança na composição química de orégano e tomilho pela presença de timol, p-cinemo e γ -terpineno entre os seus compostos majoritários (Daferera *et al.*, 2000; Sartoratto *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2008), assim como o encontrado neste estudo. O mecanismo de ação destes compostos parece estar

ligado a alterações da membrana citoplasmática dos microrganismos alterando sua permeabilidade (Cox *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002).

Segundo Holey and Patel (2005) e Hayouni *et al.* (2008), a presença de nutrientes como gordura e proteína podem reduzir a eficiência de OE de condimentos em relação aos ensaios feitos em meios de cultura. A carne moída estudada possuía em sua constituição cerca de 73,1% de umidade, 22,3% de proteína, 2,2% de gordura e 1,1% de cinzas, valores estão que estão dentro dos limites esperados para este tipo de alimento mas que no entanto justificariam a baixa eficiência dos óleos em relação aos estudos de ação antimicrobiana realizados *in vitro*.

De acordo com os resultados obtidos verificou-se um maior potencial antimicrobiano dos OE frente as bactérias psicotróficas do que frente as mesófilas. Apesar dos microrganismos psicotróficos como *Brochothrix thermosphacta* e *Pseudomonas* spp causarem maior preocupação em alimentos refrigerados por período prolongado de armazenamento (Djenane *et al.*, 2005) é do conhecimento que alguns microrganismos causadores de doenças de origem alimentar também são capazes de se desenvolver ou produzir toxinas em temperaturas de refrigeração como, por exemplo, a *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum* tipo E (Franco and Landgraf, 2003). Existe, portanto, a necessidade de outros estudos que visem aperfeiçoar a ação destes compostos verificando também a possibilidade de sinergismo entre eles, assim como aplicá-los associados com outras técnicas de preservação já conhecidas como o diminuição da atividade de água, embalagem com atmosfera modificada, pH, uma vez que a carne moída por ter uma composição rica em nutrientes, pode de alguma forma requerer métodos combinados para haver aumento do tempo de prateleira. Dois exemplos são os estudo realizados por Kostaki *et al.* (2009) onde foi verificado que o óleo essencial de tomilho aumentou a vida de prateleira de robalo de 6 para 17 dias quando associado a embalagem com atmosfera modificada (EAM) e o de Chouliara *et al.* (2007) onde OE de orégano e EAM também apresentaram efeito aditivos na preservação de carne de frango.

5. Conclusões

Os OE foram ineficazes contra os microrganismos mesófilos até a concentração de 2,2%. Em relação aos microrganismos psicotróficos os OE mais eficientes foram o de orégano capaz de eliminar as contagens na maior concentração testada e tomilho que reduziu as contagens em 2,9 Log/UFC/g de carne.

6. Agradecimentos

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado.

7. Referências

- Adams, RP. Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, San Diego, CA: Academic Press, 1989.
- Bagge-Ravn, D; Yin, NG; Hjelm, M; Christiansen, JN; Johansen, C; Gram, L. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *Int. J. Food Microbiol.* 2003; **87**:239-250.
- Barbosa, LN, Rall, VLM., Fernandes, AAH, Ushimaru, PI, Probst, IS, and Fernandes Junior, A. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathog.Dis.* 2009; **6**:725-728.
- Barros; MAF, Nero; LA, Manoel; AVB, D'Ovídio, L; Silva; LC, Franco; BDGM, and Beloti, V. *Listeria* spp. Associates to different levels of autochthonous microbiota in meat, meat products and processing plants. *Braz. J. Microbiol.* 2007; **38**:603-609.
- Bernardo –Gil, MG, Ribeiro, MA, and Esquivel, MM. Produção de extratos para a industria alimentar: Uso de fluidos supercríticos. *Bol. Biotecnol.* 2002; **73**:14-21.
- Buchanan, RL; and Bagi, LK. Microbial competition: effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 1999; **16**: 523-529.
- Burt, SA, and Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003; **36**:62–167.
- Busatta, C, Vidal, RS, Popiolski, AS., Mossi, AJ, Dariva, C, and Rodrigues, MRA. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiol.* 2008; **25**:207-211.

Ceylan, E, and Fung, DYC. Antimicrobial activity of spices. Food Science Institute Kansas State University. Manhattan, Kansas 66506. J. Rapid Methods Automat. Micro. 2004;**12**:1-55.

Chouliara, E, Karatapanis, A, Savvaidis, IN, and Kontominas, MG. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 degrees C. Food Microbiol. 2007; **24**:607-617.

Conceição, MPJ, Faria, JAF and Gândara, AL. Influência da temperatura de comercialização sobre a microbiota de carne bovina moída, em atmosfera modificada. Hig. Aliment. 2003; **17**:67-72.

Cox, SD, Mann, JL, Bell, HC, Gustafson, JE, Warmingtn, JR, and Wyllic, SG. The mode of antimicrobial action of the essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 2000; **88**:170–175.

Dadalioglu, I, and Evrendilek, GA. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. J. Agric. Food Chem. 2004; **52**:8255-8260.

Daferera, DJ, Ziogas, BN, and Polissiou, MG. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J. Agric. Food Chem. 2000; **48**:2576-2581.

Djenane D, Martínez, L; Blanco, D; Yanguela, J; Beltrán JA; and Roncalés, P. Effect of lactic acid bacteria on extention of shelf life and growth of *Listeria monocytogenes* in beef steaks stored in CO₂ rich atmosphere. Braz. J. Microbiol. 2005; **36**:405-412.

Dorman, HJD. and Deans, SG. Antimicronial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 2000; **88**:308-316.

Ercolini, D, Russo, F, Nasi A, Ferranti P, and Villani, F. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef.. Appl. Environ. Microbiol. 2009; **75**:1990-2001.

Fik, M., Surówka, K., and Firek, B. Properties of refrigerated ground beef treated with potassium lactate and sodium diacetate. *J. Sci. Food Agric.* 2008; **88**:91–99.

Fonseca, P, Librand, APL. Avaliação das características físico químicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Braz. J. Pharm. Sci.* 2008; **44**:271-277.

Franco, BDGM, and Landgraf, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2003.

Gutierrez, J, Barry-Ryan, C, and Bourke, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Inter. J. Food Microbiol.* 2008; **124**: 91-97.

Harpaz, S, Glatman, L, Drabkin, V, and Gelman, A. Effects of herbal essential oil used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *J. Food Prot.* 2003; **66**:410-417.

Hayouni, EA, Chraief, I, Abedrabba, M, Bouix, M, and Leveau, JY. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *Int. J. Food Microbiol.* 2008; **125**:242-251.

Holley, RA, and Patel, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oil and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 2005; **27**:273-292.

IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4th edition, 1 st edition digital São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

Jay, JM. Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Sci.* 1996; **43**:59- 66.

Kostaki, M, Giatrakou, V, Savvaidis, IN, and Kontominas, MG. Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiol.* 2009; **26**:475-482.

Lambert, RJW, Skandamis, PN, Coote, P, and Nychas, GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 2001; **91**:453–462.

Lawrie, RA. *Ciência da carne*, 6th edition, Porto Alegre: Artmed, 2005.

Marshall, DL, Andrews, LS; Wells, JH; and Farr, AJ. Influence of modified atmosphere packaging on the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken. *Food Microbiol.* 1992; **9**:303-309.

Moreira, MR, Ponce, AG, Valle, CE, and Roura, SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Food Sci. Technol./Lebensm.-Wiss. Technol.* 2005; **38**:565-570.

Morton, RD. Aerobic Plate Count. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Downes FP, and Ito, K. (eds). Washington: Apha, 2001, pp. 63-67.

Nortjé, GL, Nel, L, Jordaan, E, and Naudé, RT. A microbiological survey of fresh meat in the supermarket trade. Part 2: Beef retail cuts. *Meat Sci.* 1989; **25**:99-112.

Saad, SMI, and Franco, BDGM. Influence of raw meat natural background flora on growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Rev. Microbiol.* 1999; **30**:272-277.

Sartoratto, A, Machado, ALM, Delarmelina, C, Figueira, GM, Duarte, MCT, and Rehder, VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2004; **35**:275-280.

Solomakos, N, Govaris, A, Koidis, P, and Botsoglou, N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiol.* 2008; **25**:120-127.

Souza, EL, Lima, EO, and Naraim, N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às perspectivas da indústria alimentícia. *Hig. Aliment.* 2003; **17**:38-42.

Souza, SMC, Pereira, MC, Angélico, CL, and Pimenta, CJ. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. *Ciên. Agrotec.* 2004; **28**:685-690.

Ultee, A, Bennink, MHJ, and Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; **68**:1561–1568.

Verruma-Bernardi, MR. Avaliação da perda térmica em diferentes tipos de carne bovina para elaboração de bifes. *Hig. Aliment.* 2001; **15**:93.

APÊNDICES

Short Communication

Essential Oils Against Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria in Minced Meat

Lidiane Nunes Barbosa,¹ Vera Lucia Mores Rall,¹ Ana Angélica Henrique Fernandes,²
Priscila Ikeda Ushimaru,¹ Isabella da Silva Probst,¹ and Ary Fernandes Jr.¹

Abstract

The antimicrobial activity of essential oils of oregano, thyme, basil, marjoram, lemongrass, ginger, and clove was investigated *in vitro* by agar dilution method and minimal inhibitory concentration (MIC) determination against Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*) and Gram-negative strains (*Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis). MIC_{90%} values were tested against bacterial strains inoculated experimentally in irradiated minced meat and against natural microbiota (aerobic or facultative, mesophilic, and psychrotrophic bacteria) found in minced meat samples. MIC_{90%} values ranged from 0.05%v/v (lemongrass oil) to 0.46%v/v (marjoram oil) to Gram-positive bacteria and from 0.10%v/v (clove oil) to 0.56%v/v (ginger oil) to Gram-negative strains. However, the MIC_{90%} assessed on minced meat inoculated experimentally with foodborne pathogen strains and against natural microbiota of meat did not show the same effectiveness, and 1.3 and 1.0 were the highest log CFU/g reduction values obtained against tested microorganisms.

Introduction

THE NEW TECHNOLOGIES of food preservation include nonthermal inactivation, such as ionization radiation, high hydrostatic pressure, and pulsed electric fields; modified atmosphere and active packaging; biopreservation; and natural antimicrobial compounds (Devlieghere *et al.*, 2004). Plants are a source of bioactive molecules and have been widely used both traditionally and commercially to increase the shelf-life and safety of foods (Sasidharan *et al.*, 2008).

Biological properties of essential oils and their antimicrobial activity have been attributed to phenolic compounds, such as the carvacrol, eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol), and thymol (Seydim and Sarikus, 2006). These compounds have hydrophobic characteristics and interact with different sites of microbial cell (e.g., cell wall and cytoplasmic membrane), causing loss of cellular constituents, collapse of membrane structure, and cell death (Burt, 2004). Bactericidal or bacteriostatic activity of essential oils, *in vitro* and in food assays, against

Salmonella enterica, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Candida albicans* strains has been reported (Lambert *et al.*, 2001; Chorianopoulos *et al.*, 2004; Friedman *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004). Studies *in vitro* have used spices as antimicrobials in laboratory media although the levels of spices and their essential oils to inhibit microorganisms in food have been found to be higher than those assays performed using culture media (Burt and Reinders, 2003; Uhart *et al.*, 2006).

Thus, we aimed to determine *in vitro* the minimal inhibitory concentration (MIC) of essential oils from *Thymus vulgaris* (thyme), *Origanum majorana* (marjoram), *Origanum vulgare* (oregano), *Ocimum basilicum* (basil), *Zingiber officinale* (ginger), *Cymbopogon citratus* (lemon grass), and *Caryophyllus aromaticus* (clove) against *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, and *Salmonella* Enteritidis strains. MIC_{90%} values were evaluated in minced meat irradiated and experimentally inoculated with these pathogenic bacteria and against natural microbiota of minced meat (mesophiles and psychrotrophs).

Departments of ¹Microbiology and Immunology and ²Chemistry and Biochemistry, Biosciences Institute, São Paulo State University, São Paulo, Brazil.

Materials and Methods

Plants and essential oils

Fresh leaves of oregano, thyme, basil, marjoram, and lemon grass; rhizome of ginger; and dried inflorescence clove were purchased from the local market. Steam distillation using the Clevenger system was used to obtain the essential oils, which were stored at 5°C in sealed glass vials before use.

Bacterial strains

Five strains of *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, and *Salmonella* Enteritidis isolated from food samples were used. ATCC strains of each bacterial species (Lm ATCC 7644, Sa ATCC 25923, SE ATCC 13076, and Ec ATCC 25922) were also tested.

In vitro antibacterial assay: MIC test

Mueller-Hinton agar (Difco, Sparks, NV) plates containing essential oils (0.025%v/v, 0.05%v/v, 0.1%v/v, 0.3%v/v, 0.5%v/v, 0.7%v/v, 1.0%v/v, 1.5%v/v, 2.0%v/v, and 3.0%v/v) and Tween 80 (0.2%) were inoculated by Sterr's inoculator with bacterial strains incubated overnight at 36°C in brain heart infusion (Difco) and standardized in sterile saline (10^{10} CFU/mL). The bacterial growth was indicated as the presence and/or absence of colonies on media after at 37°C/24 h, and the MIC was the lowest concentration showing no growth at Mueller-Hinton agar (NCCLS, 2004). Afterward, MIC_{90%} values were calculated.

Oils' antimicrobial activity in minced meat assay

Two antimicrobial tests were carried out on minced meat (1) antimicrobial activity of essential oils against pathogenic bacterial strains (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, and *Salmonella* Enteritidis) experimentally inoculated on irradiated meat and (2) antimicrobial activity against the natural microbiota (mesophilic and psychrotrophic bacteria) of meat. MIC_{90%} values achieved *in vitro* tests according to the Gram-

positive bacteria (*L. monocytogenes* and *S. aureus*) and Gram-negative bacteria (*E. coli* and *Salmonella* Enteritidis) were tested in meat because the susceptibility profile was similar among the essential oils.

Minced meat samples (25 g) were packaged in individual portions, frozen (-20°C), and irradiated with 10.2 kGy, aiming to eliminate natural microbial populations. The irradiated meat samples were experimentally inoculated (10^4 – 10^8 CFU/g) with bacterial strains, and essential oils (%v/g) were added to meat and maintained at $5^{\circ}\text{C}/3\text{h}$. Serial dilutions and pour plate method were performed with plate count agar (PCA) (Difco), and after $35^{\circ}\text{C}/24\text{--}48\text{h}$ the CFU/g was recorded. Tests were performed in duplicate.

The mesophilic and psychrotrophic enumeration were performed on minced meat, and individual samples (25 g) were tested with or without essential oils according to the MIC_{90%} values from *in vitro* sensibility tests. The meat samples with oils and the controls were kept at 5°C, and serial dilutions were performed at 0 h (sample without oil) and 6 and 24 h (samples with and without oil) counting CFU/g in PCA. The psychrotrophics were recorded at 0 and 24 h after contact with essential oils using serial dilution and inoculation on PCA and incubation at 5°C/7 days.

Statistical analysis

The nonparametric test of Kruskal-Wallis was employed to compare independent treatments. Student-Newman-Keuls test was applied to multiple comparisons. To meat assays, nonparametric test of Mann-Whitney was used for groups (with or without oil), while the nonparametric variance analysis and Kruskal-Wallis was performed to bacteria.

Results and Discussion

All strains were susceptible to essential oils, and clove showed the highest antimicrobial activity ($MIC_{90\%} = 0.09\%v/v$), followed by lemongrass ($0.25\%v/v$) and thyme ($0.26\%v/v$). Lemon grass was the most effective against Gram-positive ($0.05\%v/v$), followed by clove, ginger ($0.09\%v/v$), and thyme ($0.10\%v/v$).

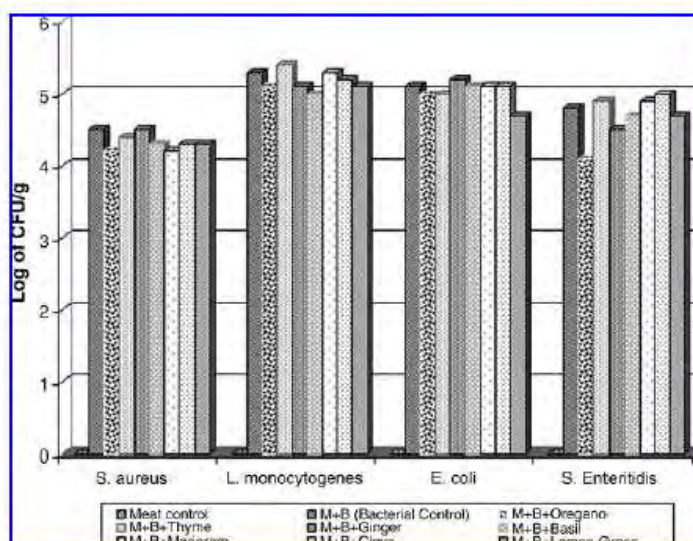


FIG. 1. Log of CFU/g values from *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria Monocytogenes*, and *Salmonella* Enteritidis is experimentally inoculated in irradiated minced meat added with essential oils and maintained at 5°C/3h.

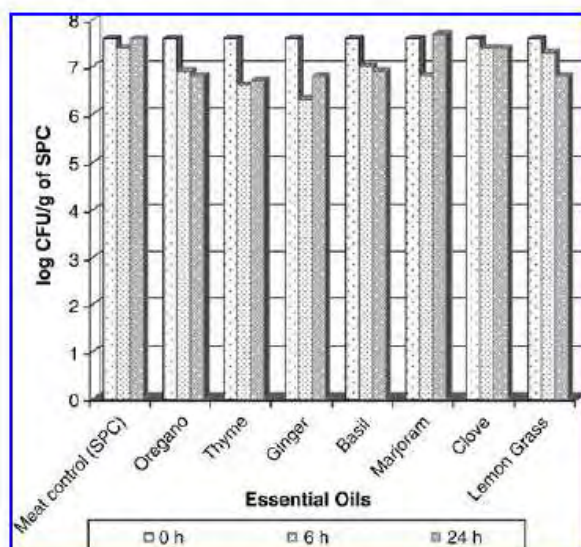


FIG. 2. Log of CFU/g of standard plate count (SPC) values recorded on minced meat samples after 5°C/6 and 24 h of essential oil addition.

oils and dove oil for Gram-negative strains (0.10%v/v). *In vitro* studies have demonstrated the antibacterial activity of essential oils against *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, and *S. aureus*, and Gram-negative bacteria were less susceptible than Gram-positive bacteria (Burt, 2004).

The CFU/g (log) values of *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, and *Salmonella* Enteritidis assays with or without essential oil contact in meat experimentally inoculated are shown in

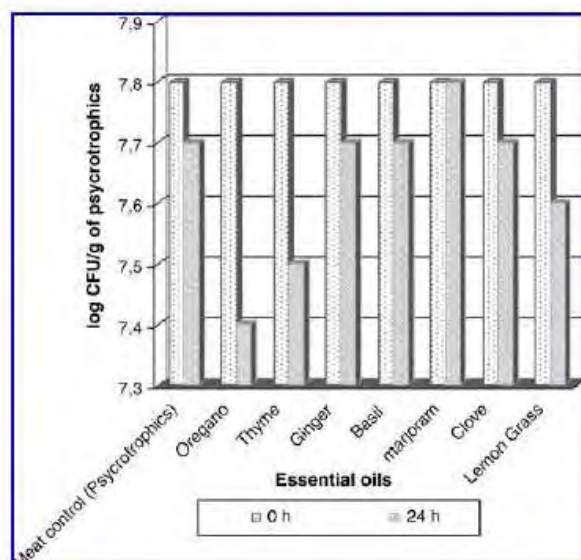


FIG. 3. Log of CFU/g for psychrotrophic microorganism values recorded on minced meat samples after 5°C/24 h of essential oil addition.

Fig. 1. The reduction between tests and control treatments was not significant, and the oils were able to reduce 1 log compared with the control. Although no significant differences were found, the bacteriostatic effect of oils was verified, and no bacterial developments were recorded at 5°C/3 h for all bacterial strains.

The log CFU/g values for mesophilic aerobic bacteria from minced meat recorded at 0 h (positive control) and 6 and 24 h after adding oil to meat are presented in Fig. 2. No significant differences were verified, and 1.3 and 1.0 were log CFU/g reduction values to ginger and thyme oils, respectively. The psychrotrophic reduction tests (Fig. 3) after 24 h of oils and meat contact produced the highest log reduction with oregano oil (0.4).

Although the antimicrobial activity *in vitro* of oils has been moderately effective on meat model, the potential use of these oils in food preservation technologies should be found in optimal concentrations to ensure the safety of the food, appropriated organoleptical characteristics, and accepted by consumers. Studies aiming to elucidate the interaction between essential oils and components of food matrices or additives, stability of oils during food processing, and the standardization of antibacterial methods are still needed.

Acknowledgments

This research was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP 05/56110-2 and 05/55039-2). We thank the Companhia Brasileira de Esterilização (CBE) for meat sample irradiation, Dr. Luciano Barbosa for statistical analysis, and Dr. José Maurício Sforcin for critical review of the article.

References

- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 2004;94: 233–253.
- Burt SA and Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O 157:H7. *Lett Appl Microbiol* 2003;36:162–167.
- Chorianopoulos N, Kalpoutzakis E, Aliagannis N, Mitaku S, Nychas G, and Haroutounian SA. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *J Agric Food Chem* 2004;52:8261–8267.
- Devlieghere F, Vermeiren L, and Devereux J. New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int Dairy J* 2004;14: 273–285.
- Friedman M, Henika PR, Levin CE, and Mandrell RE. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J Agric Food Chem* 2004;52:6042–6048.
- Kim JW, Kim YS, and Kyung KH. Inhibitory activity of essential oils garlic and onion against bacteria and yeasts. *J Food Prot* 2004;67:499–504.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, and Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 2001;91:453–462.
- [NCCLS] National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 7th edition. Approved Standard M7.A6. NCCLS: Wayne, PA, 2004.

- Sasidharan S, Zuraini Z, Yoga Latha L, Sngetha S, and Suryani S. Antimicrobial activities of *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC extracts. Food Pathog Dis 2008;5:303-309.
- Seydim AC and Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. Food Res Int 2006;39: 639-644.
- Uhart M, Maks N, and Ravishankar S. Effect of spices on growth and survival of *Salmonella* Typhimurium DT 104 in ground beef stored at 4 and 8°C. J Food Saf 2006;26:115-125.

Address correspondence to:

Ary Fernandes Jr., Ph.D.

Department of Microbiology and Immunology

Biosciences Institute

São Paulo State University

IBB/UNESP/Botucatu

Sao Paulo 18618-000

Brazil

E-mail: ary@ibb.unesp.br



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 04 de julho de 2.005

OF. 207/2005-CEP

*Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Ary Fernandes Júnior
Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biociências*

Prezado Dr. Ary,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso aditivo em alimentos", de sua autoria, com a participação da Profª Drª Vera Lúcia Moraes Rall, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 04 de julho de 2.005.

Situação do projeto perante o CEP: APROVADO

Atenciosamente,

*Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Departamento de Microbiologia e Imunologia

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O estudo tem por objetivo utilizar plantas condimentares como forma de melhorar as características higiênico-sanitárias de alimento, através da sua ação antimicrobiana. Isto tem como finalidade restringir os riscos de intoxicações pelo consumo de alimentos bem como aumentar o tempo de validade dos mesmos. Portanto, neste momento você está recebendo amostras de hambúrguer processadas com adição de óleo essencial de plantas condimentares com finalidade de verificar se as características sensoriais, especialmente o sabor, deste alimento sofreu modificações que possam provocar algum tipo de rejeição do mesmo. Salientamos que este alimento não recebeu adição de microrganismos, não tendo qualquer risco para a saúde humana.

Assim agradecemos a colaboração e solicitamos autorização para publicação dos resultados obtidos.

Atenciosamente

Provador

Ary Fernandes Junior
Rua Emilio Cani, 520, Botucatu, SP
Tel. 38822108
ary@ibb.unesp.br

Pesquisador

Lidiane Nunes Barbosa
Rua Izidoro Bertaglia, 1503, Botucatu, SP
Tel. 38116058
linuba2@yahoo.com.br

Antimicrobial activity of aromatic plant essential oils in bovine meat and burger**Running title: Antimicrobial activity of plant essential oils**

Lidiane Nunes Barbosa¹, Bruna Fernanda Murbach Telles Machado¹, Isabela Silva Probst¹,
Vera Lucia Mores Rall¹, Ary Fernandes Junior^{1*}

¹Departament of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Departament of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil. District de Rubião Junior, s/n, Botucatu, São Paulo. Tel (14) 38116058; fax (14) 38153744

E-mail address: ary@ibb.unesp.br

Abstract

Aromatic plant essential oils (EO) represent promising alternatives to eliminate bacteria that usually contaminate food. The aim of this study was to determine the antimicrobial activity of oregano (*Origanum vulgare*), thyme (*Thymus vulgaris*), basil (*Ocimum basilicum*) and marjoram (*Origanum majorana*) EO in bovine minced meat and burger artificially contaminated with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis. Samples of those foods were previously irradiated at a mean dose of 10 kGy for sterilization; then, they were infected with salmonella and listeria separately and received increasing EO concentrations. After 3-hour contact (oils x bacteria), serial dilutions (10^{-1} to 10^{-5}) and deep plating in Plate Count Agar were performed, followed by incubation at 37°C/24h and bacterial count. The same tests were carried out with a fixed EO concentration and bacterial counts at 6, 24 and 48 hours. In minced meat, marjoram EO at 0.8% v/v eliminated listeria, whereas in burger this bacterium was completely eliminated by marjoram and thyme EO also at 0.8% v/v. Considering salmonella, oregano and marjoram EO had equal inhibitory potential in meat (1.6% v/v) and burger (1.2% v/v), whereas basil EO had the lowest antimicrobial capacity. The EO antimicrobial activity differed with the studied food, the bacterial strain and the contact time; marjoram oil was noticeable in 3h-contact tests and oregano was capable of reducing total bacterial counts in three of the four time variation models studied. These data established the potential use of EO in meat models, aiming at their preservation.

Keywords: essential oils, antimicrobial activity, minced meat, burger, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis.

1. Introduction

The increasing number of outbreaks of diseases caused by foodborne pathogenic and spoilage microorganisms is a concern for both consumers and industries (Shan *et al.*, 2007). The global incidence of foodborne illness is difficult to assess, but in 2005 an estimated 1.8 million people died of diarrheal diseases (WHO, 2007).

Methods like heating, freezing, drying, lyophilization, irradiation, high hydrostatic pressure, fermentation, or addition of antimicrobials and chemical products are used to control contamination by microorganisms. However, after these treatments some microorganism

populations are destroyed, others can survive and others can be partially damaged (Wu *et al.*, 2001).

In addition, consumers have preferred natural and/or minimally processed products to foods containing synthetic additives (Dadalioglu and Evrendilek, 2004). Thus, aimed at reducing health risks and economic losses caused by microorganisms contaminating foods, the use of natural antibacterial compounds has been shown a promising alternative (Smid and Gorris, 1999; Oussalah *et al.*, 2007). Among such natural products, essential oils, chitosan, nisin and lysozyme are active compounds of potential use for food preservation (Devlieghere *et al.*, 2004).

Essential oils are volatile secondary metabolites of several plant species and present a consistency similar to that of oil; they are obtained from plant material like leaves, flowers, buds, seeds, branches, bark, herbs, wood, fruits and roots. These substances are used in perfumes, flavorings and other products, besides presenting medicinal use (Burt, 2004). Antibacterial activity depends on the plant species, the essential oil type, composition and concentration, the microorganism type, the substrate composition, the processing and the storage condition (Bertini *et al.*, 2005).

Considering the different groups of chemical compounds present in essential oils, the antibacterial activity of the latter is probably not attributed to a specific mechanism but to the presence of several targets in the cell (Burt, 2004). However, the consensus is that most aromatic and phenolic compounds exert their antimicrobial effects on the cell membrane, altering its structure and functions (Holey and Patel, 2005). Thus, plant elements previously considered only vectors of characteristic aroma and flavor now have a new perspective of use (Souza *et al.*, 2003).

Several studies have reported the antimicrobial activity of plants such as marjoram, oregano, thyme and basil (Deans and Svoboda, 1990; Daferera *et al.*, 2000; Burt and Reinders, 2003; Nevas *et al.*, 2004; Vági *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2005; Di Pasqua *et al.*, 2005; Oussalah *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2009).

Nowadays, there is an increasingly frequent consumption of easy-to-prepare or ready-to-consume meat products such as meatballs, burgers, breaded, sausages, mortadella and salami. However, meats are often involved in outbreaks of foodborne toxoinfections due to their high activity of water, favorable pH to the growth of microorganisms and high percentage of proteins, minerals and vitamins, making them excellent culture media for the development of pathogens and spoilage bacteria (Cardoso and Araújo, 2003). Minced meat has greater microbiological problems than sliced meat since the former is more handled and

presents higher area/volume ratio. Thus, the development of methods to lengthen the useful life of this highly perishable food is important for producers (Conceição *et al.*, 2003; Fik *et al.*, 2008).

Therefore, the aim of this study was to test four spice plants (*Origanum vulgare*-oregano, *Thymus vulgaris*-thyme, *Ocimum basilicum*-basil and *Origanum majorana*-marjoram) for the potential use of their essential oils as natural food additives based on their antimicrobial activity in bovine minced meat and burger samples artificially contaminated with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis.

2. Materials and Methods

2.1. Essential oil collection and chemical characterization

Essential oils (EO) of *Origanum vulgare* (oregano), *Thymus vulgaris* (thyme), *Ocimum basilicum* (basil) and *Origanum majorana* (marjoram) were prepared according to the classic methodology of steam distillation using Clevenger-type equipment, brand Marconi, model M480 (Bernardo-Gil *et al.*, 2002, Souza *et al.*, 2004). After EO were obtained, oil yield and density values were determined (Fonseca and Librand, 2008).

Chemical analysis was done by using a mass-spectrometer attached to a gas chromatograph (GC-MS), brand Shimazu, model QP5050A, and a capillary column, CBP-5, 50m length, 0.25mm inner diameter and 0.25µm film thickness. The temperature of the injector was 250°C and that of the interface was 250°C; the detector operated in mode EI at 70eV and He was the carrier gas. Chromatographic conditions were: **oregano** - initial temperature of 60 °C, heating at a rate of 3°C.min⁻¹ up to 160°C, heating at 10°C.min⁻¹ up to 180°C, maintenance of this temperature for 5min, heating at 15°C.min⁻¹ up to 200°C, maintenance of this temperature for 3min, heating at a rate of 20°C.min⁻¹ up to 220°C, and maintenance of this temperature for 10min; **thyme, basil and marjoram** - initial temperature of 60°C, heating at 3°C.min⁻¹ up to 160°C, heating at 15°C.min⁻¹ up to 220°C, and maintenance of this temperature for 10min. Essential oil compounds were identified based on NIST library, mass spectra and data available in literature (Adams, 1989).

2.2. Bacterial strains

The used bacterial strains were *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis isolated from foods subjected to microbiological analysis in the Department of Microbiology and Immunology, São Paulo State University-UNESP, Botucatu, São Paulo State, Brazil. The

samples were identified according to Hitchins (2003) and Andrews *et al.* (2001) and kept in agar stock until used.

2.3. Meat models

The meat models were prepared and handled in the Laboratory of Nutrition and Dietetics, UNESP, Botucatu. One lot of bovine minced meat *in natura* (semimembranosus) was obtained at the local commerce in Botucatu; the standard count of total aerobic mesophiles was done using an initial dilution of 25g in 225 ml sterile buffered water (10^{-1} to 10^{-5}) and deep plating in Plate Count Agar culture medium (PCA - Difco), followed by incubation at 35°C/24-48 hours and count of colonies (CFU) (Morton, 2001). A basic recipe of bovine burger was prepared by using a portion of the same sample of minced meat (80%), salt (1.2%) and chopped onion (18.8%); then, two portions of 25 grams (meat and burger) were prepared, individually packed and frozen. The frozen samples (meat and burgers) were forwarded in a thermal box containing ice to the Brazilian Company of Sterilization (CBE) in Jarinu, São Paulo State, where they were subjected to the process of gamma ray irradiation at a mean dose of 12 kGy in an irradiator, brand Harwell Dosimeters (UK).

2.4. Proximate analysis

To control EO activity in the foods, samples were also subjected to a proximate analysis before and after the irradiation process in order to detect possible changes in the meat products. The analyses included moisture, protein, lipid and ash assessment (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) and were performed in triplicate in the Laboratory of Technology for Products of Animal Origin, Department of Management and Agroindustrial Technology, College of Agronomical Sciences, UNESP, Botucatu.

2.5. Determination of the antimicrobial action of essential oils against pathogenic bacteria in bovine burger and minced meat *in natura*

The samples were thawed at refrigerator temperature on the day before the experiments; then, artificial contamination assays were carried out with a bacterial concentration around 10^5 - 10^4 CFU/g food, using listeria and salmonella cultured in Brain Heart Infusion (BHI-Difco) at 35°C/24 hours and standardized according to 0.5 McFarland scale. Control assays were done for bacterium addition to the foods without EO addition and for sterility of food samples.

Each bacterium was directly added to the food inside a plastic bag and homogenized, followed by addition of the respective essential oil volumes corresponding to values between 0.1 and 2.2 %v/v, with variations according to the tested EO and bacteria. The initial values were adopted based on the studies of Barbosa *et al.* (2009), who used the same bacterial species and EO. After the addition and mixture of oils, the samples were kept at refrigerator temperature for 3 hours (Barbosa *et al.*, 2009). In another step of this study, using the protocol that was previously adopted, assays were done with a concentration just below the one at which bacterial count was <10 CFU/g; however, counts were done at 0, 6, 24 and 48 hours of food storage, aimed at verifying the direct influence of the time of contact between EO and bacteria on foods. For bacterial counts, serial dilutions of each food sample were done from an initial dilution of 25g in 225 ml sterile buffered water (dilution between 10^{-1} and 10^{-5}), followed by deep plating in PCA culture medium (Difco), incubation at 35°C/24-48 hours and count of colonies in the plates containing between 25 and 250 colonies by using a colony counter, model Phoenix. The final result, expressed as CFU/g, was obtained by multiplying the number of colonies by the inverse factor of the dilution of the respective count plate. Assays were done in duplicate.

2.6. Statistical analysis

For the proximate analysis, Student's t test was employed. As regards the mean values of concentrations, oils, and oils versus concentrations, a two-way analysis of variance was adopted. To compare treatments (oils and control), concentrations and their interactions, Tukey's test was used. A value of $p > 0.05$ indicates no significant difference between groups. The statistical software SAS version 9.0, licensed by UNESP in 2009, was employed.

3. Results

The lot of minced meat from which the samples were separated had standard initial count of 6×10^4 CFU/g. Counts before and after the irradiation of food samples were compared aimed at the complete elimination of the microbiota residing in the lot of meat, which was confirmed through controls prepared over the experiment for the sterility of the used food samples. Thus, the obtained bacterial counts only contained the artificially inoculated bacteria subsequently recovered rather than eventual contaminants.

The general aspects of the plants used in the biological assays of sensitivity to the studied bacterial strains are shown in Table 1. The yield of EO from the plant material used in its production was extremely low, and the presence of thymol in the members of this plant family (Lamiaceae) was confirmed.

Table 1- General aspects of the spice plants used in the biological assays of sensitivity to the studied bacterial strains in bovine minced meat and burger.

Species	Common name	Used part	Density (mg/mL)	Yield (%)	Major compounds
<i>Origanum vulgare</i>	Oregano	Leaves, steam	917	0.11	γ -terpinene (29.36%), p -cymene (14.96%), caryophyllene (7.81%)
<i>Thymus vulgaris</i>	Thyme	Leaves, steam	900	0.10	thymol (54.19%), γ -terpinene (11.72%), p -cymene (7.39%)
<i>Ocimum basilicum</i>	Basil	Leaves, steam	867	0.07	linalool (38.07%), eugenol (10.06%), camphor (2.00%)
<i>Origanum majorana</i>	Marjoram	Leaves, steam	870	0.07	terpineol (15.60%), thymol (9.66%), γ -terpinene (9.20%)

Proximate analysis (Table 2) was done to verify possible changes in meat and burger compounds, compared to non-irradiated samples. Moisture, proteins, lipids and ash were determined to learn about the general aspects of the product. The irradiation did not alter the samples significantly ($p > 0.05$ in all assays). Literature indicates that the percentage of water

reaches 75%, proteins around 20%, ash around 1%, and lipids (intercellular fat) close to 3% (IAL, 1985). Thus, the irradiation process did not significantly alter the bovine meat and burger samples, which were within the expected limits. It must be emphasized that the aim of our work was not to study the aspects related to the irradiation process of such foods; however, this parameter must be considered in future studies.

Table 2- Percentages obtained in the proximate analysis of bovine minced meat and burger samples before and after irradiation.

Samples	Moisture (%)	Protein (%)	Fat (%)	Ash (%)
Minced meat	73.1 a*	22.3 a*	2.2 a*	1.1 a*
Irradiated minced meat	73.6 a*	23.3 a*	1.9 a*	1.1 a*
Burger	75.6 a**	19.2 a**	2.5 a**	2.0 a**
Irradiated burger	75.3 a**	18.0 a**	2.3 a**	2.4 a**

*The same letters in lines for the parameters minced meat and irradiated minced meat do not differ statistically ($p>0.05$)

**The same letters for the parameters burger and irradiated burger do not differ statistically ($p>0.05$)

Based on the results obtained by Barbosa et al. (2009), the concentrations 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 and 2.2%v/v were adopted to standardize the analyses and allow the comparison among the efficacies of oils; the value 0.1%v/v was close to that obtained *in vitro*.

The mean values of log/CFU per gram of food against *Listeria monocytogenes* (closed symbols) and *Salmonella* Enteritidis (open symbols) subjected to different concentrations of oregano, thyme, basil and marjoram EO are shown in Figure 1. Up to the maximal concentration of 2.2 %v/v, all EO led to a complete reduction, i.e. the bacterial count defined as log of CFU/g was <10 . In addition, the strain *L. monocytogenes* was more sensitive to the action of EO than *Salmonella* in both meat and burger.

The MIC values (%v/v) obtained in the sensitivity assays for bovine meat and burger are shown in Table 3.

Table 3- MIC values obtained for *L. monocytogenes* and *S. Enteritidis* in the sensitivity assays with bovine minced meat and burger added of essential oils.

Strain	Food	Oregano	Thyme	Basil	Marjoram
<i>L. monocytogenes</i>	Meat	1.6 b	1.6 b	1.6 c	0.8 a
	Burger	1.2 b	0.8 a	1.6 c	0.8 a
<i>S. Enteritidis</i>	Meat	1.6 a	1.6 b	2.2 c	1.6 a
	Burger	1.2 b	1.2 a	2.0 c	1.2 ab

*Values followed by the same letter in the same line do not differ statistically ($p < 0.05$)

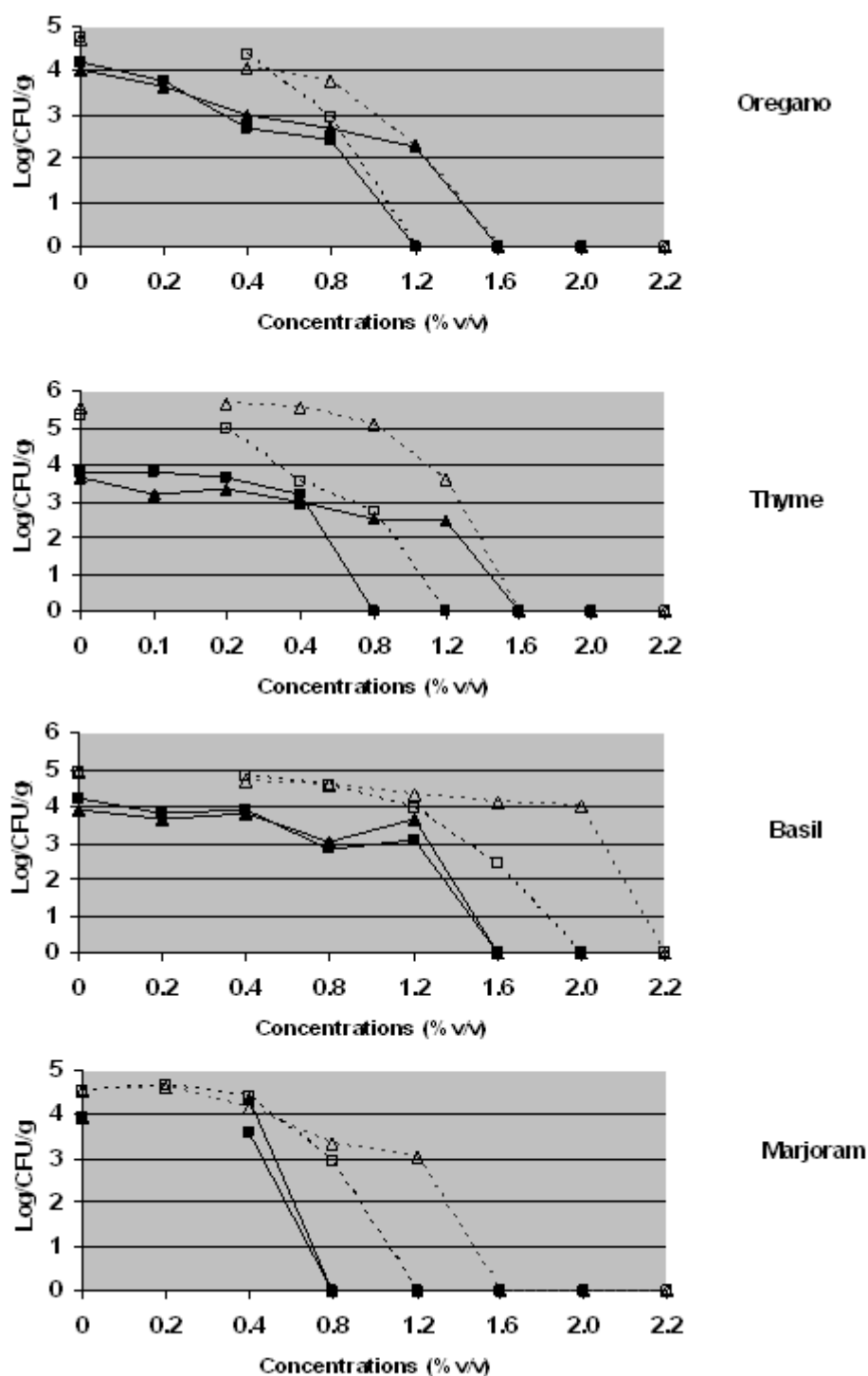


Figure 1. Numbers of log CFU/g for *L. monocytogenes* (closed symbols) and *S. Enteritidis* (open symbols) recovered from bovine minced meat (triangles) and burger (squares) subjected to different essential oil concentrations.

To verify the influence of the time of contact between essential oils and bacteria, concentrations immediately inferior to those at which microbial counts were <10 CFU/g at 0, 6, 24 and 48 hours were tested, and the samples were kept at refrigerator temperature

throughout the experiment. The values of log CFU/ml for bacterial counts relative to oils are presented in Figures 2 and 3. In general, listeria had higher sensitivity and oregano oil was more effective considering time of contact between bacteria and the respective EO.

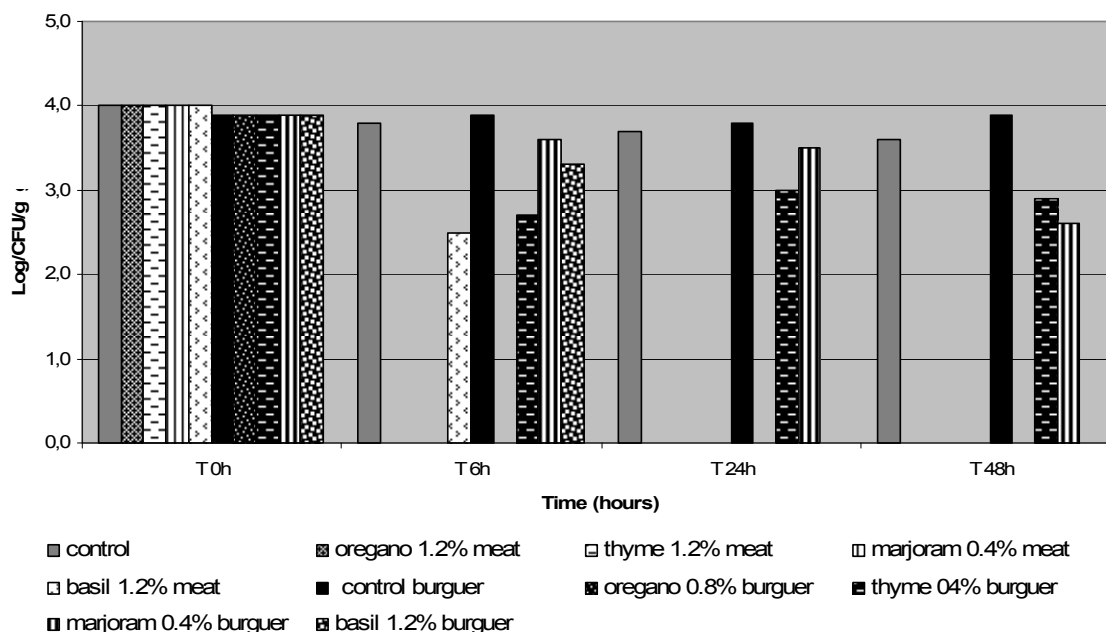


Figure 2- Antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes* in bovine minced meat and burger at 0, 6, 24 and 48h.

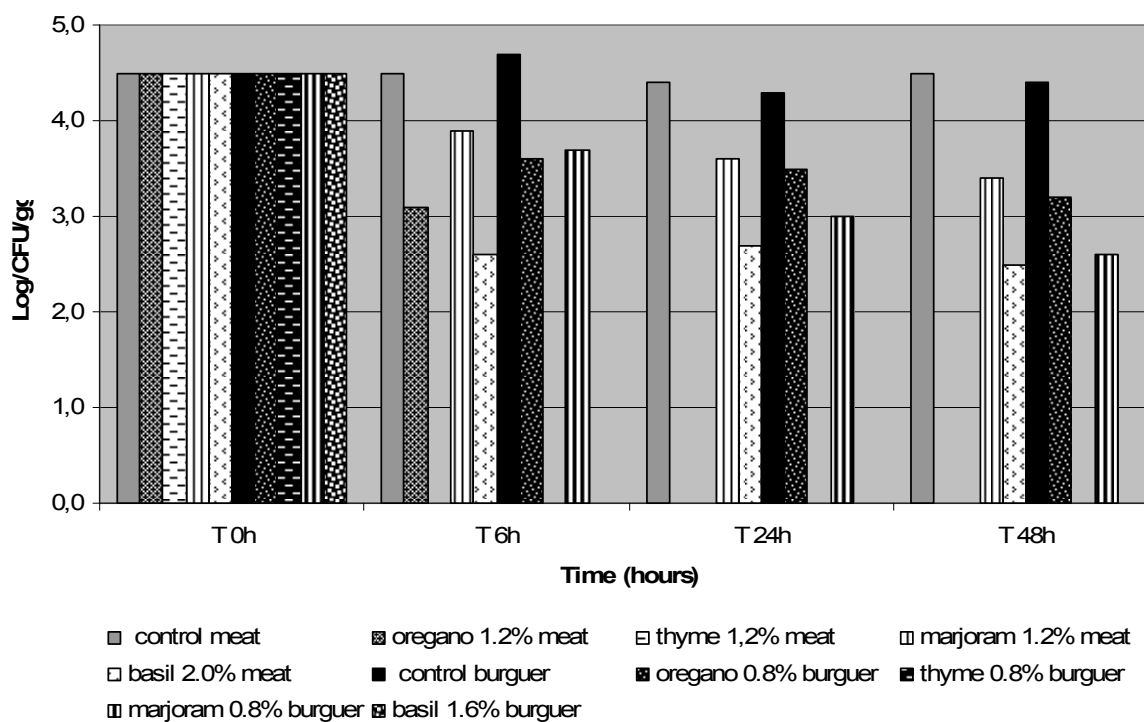


Figure 3- Antimicrobial activity of essential oils against *Salmonella Enteritidis* in bovine minced meat and burger at 0, 6, 24 and 48h.

4. Discussion

The initial oil concentration adopted was not efficient against listeria and salmonella strains, which confirms the results of studies reporting that, when applied directly on the food, EO present an inhibitory action profile different from that observed *in vitro*; this is explained by the complexity of the food system and the possible interactions between EO and food compounds. According to Burt (2004), among the compounds present in meat products, a high fat content represents a considerable impairment for EO action. A study performed with cheese indicated that food composition can determine the efficiency of plant essential oils against *L. monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis (Smith-Palmer *et al.*, 2001). This justifies our choice for preparing a simple bovine burger in order to minimize the quantity of nutrients that could interact with the essential oil, compromising its action. Nevertheless, further studies must be carried out in order to test EO antimicrobial action in food models, verifying possible interactions between EO and additives and/or ingredients in the foods.

Skandamis and Nychas (2000) reported that oregano oil can contribute to the intrinsic safety of eggplant salad, synergistically acting under low pH and at reduced storage temperatures since the essential oil becomes more hydrophobic under low pH and, therefore, can interact more efficiently in the lipid phase of the bacterial membrane. According to Mejlholm and Dalgaard (2002), EO can be successfully used as antimicrobials in foods if applied together with high salt levels, reduced water activity, low pH, and at palatable levels.

As regards listeria in minced meat, marjoram oil was the most efficient, leading initial bacterial counts to <10 CFU/g at the concentration of 0.8%. The remaining three oils allowed total count reduction at the concentration of 1.6%; however, only oregano and thyme had the same efficiency concerning the initial contamination of samples. Considering these data and the decreasing antimicrobial activity of EO, marjoram > oregano = thyme > basil. In burger samples, marjoram and thyme were the most efficient oils, leading listeria counts to <10 CFU/g at 0.8%, whereas basil oil was only efficient at the double this concentration (marjoram = thyme > oregano > basil).

In the assays with salmonella, basil oil had the lowest inhibitory efficiency in meat (2.2%) and burger (2.0%). Thus, for minced meat the results were the following: marjoram=oregano>thyme>basil, whereas for burger, marjoram=oregano>basil and marjoram=thyme>basil, and oregano≠thyme.

In general, the bacteria had higher sensitivity to EO in burger samples. As already mentioned, salt (NaCl) at sufficient concentration acts as an antimicrobial agent, delaying the

subsequent spoilage due to the increase in the osmotic pressure of the medium, which results in decreased water activity, making difficult its use by bacteria. Thus, the presence of this ingredient in burger formulation may have functioned as an additional barrier to the growth of the studied microorganisms, compared to minced meat *in natura*. This is very interesting since meat prepared for consumption is always added of a type of spice such as a certain salt content to intensify the flavor.

The EO considered most efficient reduced by at least 3.7 log the initial counts in meat products subjected to artificial contamination, and this reduction was punctual, presenting some progressive falls in the number of colony forming units when the essential oil period of action was 3 hours. Thus, there was the need of assays to elucidate whether a longer contact period could reduce the EO quantity necessary for the studied foods, adopting an initial artificial contamination around 4 log/CFU/g for both bacteria (*listeria* and *salmonella*).

As regards the association between *listeria* and meat, basil oil at the concentration 1.2%v/v led the count to <10 CFU/g at 24 hours, whereas oregano, thyme (1.2%v/v) and marjoram (0.4%v/v) oils led the counts to <10 CFU/g at 6 hours. For *listeria* in burger, oregano and basil EO kept the same efficiency, whereas thyme and marjoram were not capable of leading counts to <10 CFU/g at the end of 48 hours of experiment. For *salmonella* in minced meat, oregano and thyme oils were capable of leading counts to <10 CFU/g at 24 and 6 hours, respectively, whereas marjoram and basil caused discreet reductions at the end of 48 hours of experiment. For *salmonella* in burger, thyme and basil EO were the most efficient, leading to total count reduction at the end of 6 hours of contact, whereas oregano and marjoram caused only a discreet reduction during the 48h-contact period.

The antimicrobial activity of EO depends not only on their chemical composition but also on their structural configuration, functional groups and possible synergistic interactions among their compounds (Dorman and Deans, 2000). Chemical composition is also studied to better understand the cell targets of the molecules found in plants (Souza *et al.*, 2005).

In a 3-h period, marjoram oil had noticeable efficiency against the tested microorganisms, followed by thyme and oregano, the latter presenting the best results in the tests with time variation. Terpineol, the major compound found in marjoram oil, is believed to inhibit the oxidative respiration and induce the membrane deformation (expansion) having as consequences changes in the membrane permeability (Cox *et al.*, 2000), whereas thymol (thyme) disintegrates the outer membrane present in the wall of Gram-negative bacteria, releasing lipopolysaccharides (LPS) and increasing the permeability of the cytoplasm

membrane to ATP (Helander *et al.*, 1998). p-Cymene (oregano/thyme) is hydrophobic and causes important disturbances in the cytoplasm membrane (Ultee *et al.*, 2002).

5. Conclusions

The antimicrobial activity of essential oils differed with the food, the strain and the contact time. Although all oils had antimicrobial activity in 3h-contact assays, marjoram essential oil had the best antimicrobial efficiency, whereas basil oil was the least efficient. In assays of time variation, oregano oil was capable of leading counts to <10 CFU/g in three of the four studied models of time variation. It is recommended that the use of these antimicrobial products from plants in foods be guided by the levels tolerated by consumers, and this procedure should not be the only means to preserve foods of any nature. Future studies are needed, specially about the acceptance of essential oils used as additives in the tested foods.