

POTENCIALIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIMICROBIANOS APLICADOS EM PRODUTOS LÁCTEOS FERMENTADOS

CRISTIANE MENGUE FENIMAN

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biologia de Parasitas e Micro-
organismos

Prof. Dr. Ary Fernandes Júnior

BOTUCATU – SP

2011



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**POTENCIALIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO
ANTIMICROBIANOS APLICADOS EM PRODUTOS
LÁCTEOS FERMENTADOS**

CRISTIANE MENGUE FENIMAN

Prof. Dr. ARY FERNANDES JÚNIOR

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biologia de Parasitas e Micro-
organismos

BOTUCATU – SP

2011

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus por estar ao meu lado me amparando em todos os momentos.

Aos meus pais, Cesar e Lourdes, pelo amor incondicional e os ensinamentos repassados.

À minha irmã Greicy pelo apoio constante, principalmente na minha trajetória profissional.

Aos meus sobrinhos Gabriela e Miguel por despertarem minhas lembranças infantis.

Ao meu querido noivo Fábio, que com seu amor tem me completado.

Aos meus inseparáveis meninos Pasteur, Doguinho e Floquinho pela alegria e companheirismo.

Ao meu estimado felino Tobias, distante e saudoso.

Ao meu orientador e amigo Ary por acreditar em minha capacidade e me apoiar durante a trajetória dessa fase.

Às colegas de laboratório por acompanharem as atividades desenvolvidas.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências pela acolhida na instituição.

Ao Professor Dr. Júlio Toshima Doyama do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências pela contribuição nas análises cromatográficas.

Ao Professor Dr. Luciano Barbosa do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências pelo auxílio nas análises estatísticas.

Muito Obrigada!!!

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família:
Papai, Mamãe, Greicy, Gabriela, Miguel e meu Amado Fábio.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	09
INTRODUÇÃO.....	11
1 Atividade antimicrobiana dos OEs	11
2 Influência dos OEs na aceitação sensorial dos alimentos	13
Referências bibliográficas	14
OBJETIVOS.....	18
CAPÍTULO 1 (Aceitação de produtos alimentícios contendo óleos essenciais como antimicrobianos e flavorizantes).....	19
Resumo	20
1. Introdução.....	21
2. Material e métodos	22
2.1. Pesquisa de mercado.....	22
2.2. Análise sensorial.....	23
2.3. Análise estatística	24
3. Resultados e discussão	24
4. Conclusões.....	33
Referências bibliográficas	33
CAPÍTULO 2 (Determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> B.) combinado com edta e polietilenoglicol no iogurte)	38
Resumo	38
1. Introdução.....	39
2. Material e métodos	42
2.1. Extração e caracterização química do OE de canela	42
2.2. Análise sensorial.....	42
2.3. Avaliação antimicrobiana do OE de canela.....	43
3. Resultados e discussão	44
3.1. Caracterização química do OE de canela	44
3.2. Análise sensorial.....	45
3.3 Determinação da atividade antimicrobiana do OE de canela	45
4. Conclusões.....	47

5. Agradecimentos	47
6. Referências bibliográficas	47
CAPÍTULO 3 (Efeito inibitório de óleos essenciais contra <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e cultura starter em leite fermentado durante o período de <i>shelf-life</i>)	51
Resumo	51
1. Introdução	52
2. Material e métodos	53
2.1. Óleos essenciais (OEs) e análise química por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM)	53
2.2. Concentração inibitória mínima (CIM)	54
2.3. Análise sensorial para o iogurte contendo OE de canela	54
2.4. Curva de sobrevivência para <i>L. rhamnosus</i> e para a cultura starter	55
2.4.1. Contagem de células viáveis	56
2.4.2. Acidez titulável	57
2.4.3. Análise estatística	58
3. Resultados e discussão	58
3.1. Caracterização química dos OEs	58
3.2. Concentração inibitória mínima (CIM)	59
3.3. Análise sensorial	60
3.4. Curva de sobrevivência do <i>L. rhamnosus</i> e cultura starter	61
4. Conclusões	66
5. Agradecimentos	66
6. Referências bibliográficas	66
CAPÍTULO 4 (Enumeração celular e visualização por microscopia eletrônica de transmissão do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> tratado com óleo essencial de canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> B.)	70
Resumo	71
1. Introdução	72
2. Material e métodos	73
2.1. Obtenção do OE de canela e análise química por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM)	73
2.2. Preparação das culturas	74
2.3. Contagem de células viáveis	75
2.4. Microscopia eletrônica de transmissão	75

3. Resultados e discussão	76
3.1. Caracterização química do OE de canela	76
3.2. Contagem de células viáveis.....	77
3.3. Microscopia eletrônica de transmissão.....	78
4. Conclusões.....	80
5. Agradecimentos	80
6. Referências bibliográficas	80
APÊNDICE I – Cell enumeration and visualization by transmission electron microscopy of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> treated with essential oil of cinnamon (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> B.).....	83
APÊNDICE II – Carta de aceite do artigo Cell enumeration and visualization by transmission electron microscopy of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> treated with essential oil of cinnamon (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> B.)	97

RESUMO

Os óleos essenciais (OEs) apresentam-se como novas opções tecnológicas para serem aplicados como conservantes em alimentos. Entretanto, o uso nas concentrações necessárias para exercerem ação antimicrobiana provoca alterações sensoriais indesejáveis, além de que a essa ação não é desejável quando aplicado em produtos probióticos. O trabalho objetivou identificar e registrar as preferências do público consumidor para alimentos adicionados de OEs, avaliar a ação antimicrobiana do OE de canela em iogurte, adicionado em concentração máxima aceitável sensorialmente (CMAS) e associado com EDTA e/ou polietilenoglicol, verificar a existência de ação antimicrobiana dos OEs de canela, cravo e menta na CMAS contra o *Lactobacillus rhamnosus* e cultura *starter* de iogurte durante a vida de prateleira de leite fermentado, determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e visualizar os efeitos do OE de canela contra o *L. rhamnosus*. Os OEs foram obtidos por destilação a vapor e caracterizados quimicamente por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. A primeira parte do projeto consistiu em pesquisa de mercado para determinar a melhor associação de OEs com o sabor de frutas no iogurte e os óleos mais associados ao queijo. A máxima concentração aceitável de OE (estipulado na pesquisa de mercado) para o iogurte foi determinada na análise sensorial pela Escala Hedônica de 0 a 9 pontos, com amostras de concentrações crescentes de OE, tendo-se como referencial de aceitação a mediana mínima igual a 7 pontos, referente ao *gostei moderadamente*. Nessa concentração foi verificada a ação antimicrobiana do OE sozinho e associado com EDTA, polietilenoglicol e ambos, além do tratamento controle. Foram realizadas as contagens de aeróbios mesófilos totais, psicrotróficos e bolores e leveduras. A segunda parte do projeto consistiu na realização da curva de sobrevivência do *L. rhamnosus* e cultura *starter* em leite fermentado, isolados e associados, sendo realizadas contagens microbianas dos tratamentos controle e tratados com a CMAS dos OEs de canela, cravo e menta. Os tempos de análise foram de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 13, 21, 29, 37, 55, 73, 168 (7 dias), 136 (14 dias), 504 (21 dias) e 672 (28 dias) horas após o início de fermentação e adição dos OEs. Determinações de acidez titulável foram realizadas nos tempos 0, 5, 7, 168 (7 dias) e 672 (28 dias) horas. E a terceira e parte do projeto consistiu na análise de microscopia eletrônica de transmissão para a cultura de *L. rhamnosus* tratada por 2 horas com 0,04 e 1,0% de OE de canela, juntamente com a contagem de células viáveis após 2 horas (momento da análise microscópica) e após 24 horas. O OE de canela apresentou 67,58% de cinamaldeído como componente majoritário. Foi associado ao sabor banana no iogurte e a CMAS foi de 0,04%. Entretanto, nessa concentração não foi detectada ação

antimicrobiana significativa nas contagens microbianas totais do iogurte em relação ao controle, mesmo quando o OE foi associado com o EDTA, o polietilenoglicol e ambos. Os OEs de canela, cravo e menta não interferiram na contagem de *L. rhamnosus*, mas observou-se redução significativa na cultura *starter* e acidez titulável nos tratamentos adicionados com os OEs quando comparados ao controle. A concentração de 0,04% de OE de canela exerceu atividade bacteriostática durante a incubação de 2 horas, apresentando alterações leves na estrutura celular, mas foi considerada bactericida por possibilitar uma redução significativa após 24 horas. Já a concentração de 1,00% reduziu 3 log após 2 horas de incubação e não foi detectada contagem de células viáveis após 24 horas. As observações por microscopia eletrônica de transmissão revelaram que as células tratadas com 1,00% de OE de canela foram drasticamente danificadas, apresentando rupturas da membrana celular e extravasamento citoplasmático. Desse modo, na CMAS, o OE de canela não exerceu ação antimicrobiana, apenas flavorizante. No entanto, os OEs de canela, cravo e menta na CMAS não interferiram no desenvolvimento da bactéria probiótica *L. rhamnosus* em leite fermentado, apesar da ação antagonista contra a cultura *starter*, o que provocou queda de produção do ácido lático. Entretanto, nas condições *in vitro* utilizadas na microscopia eletrônica o OE de canela demonstrou ação bactericida contra *L. rhamnosus*. Evidencia-se a continuidade de alternativas tecnológicas para potencializar o uso de OEs como antimicrobianos em produtos lácteos, mas aplicados em concentrações que sejam aceitas sensorialmente.

Palavras-chave: antimicrobianos, óleos essenciais, produtos lácteos

ABSTRACT

Essential oils (EOs) show as new technology options to be used as preservatives in foods. However, the use in necessary concentrations to exert antimicrobial activity causes undesirable sensory changes, and this action is not desirable when applied to probiotic products. The study aimed to identify and record the preferences of the consuming public to foods added with EOs, to evaluate the antimicrobial action of cinnamon EO in yogurt, added to the higher acceptable sensory concentration (HASC) and associated with EDTA and/or polyethylene glycol, to verify the existence of antimicrobial action of cinnamon, clove and mint EOs in the HASC against *Lactobacillus rhamnosus* and yogurt starter culture during the shelf life of fermented milk, to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and to view the effects of cinnamon EO against *L. rhamnosus*. The EOs were obtained by steam distillation and chemically characterized by gas chromatography and mass spectrometry. The first part of project involved in market research to determine the best combination of EOs with the taste of fruit in yogurt and oils associated with cheese. The maximum acceptable concentration of EO (stipulated in market research) to the yogurt was determined by sensory analysis scale of 0 to 9 points, with samples of increasing concentrations of OE, haven been as reference the median minimum acceptance equals 7 points, referring to *liked moderately*. This concentration was found to antimicrobial action of EO alone and associated with EDTA, polyethylene glycol, and both, beyond a control treatment. Counts were performed total mesophilic aerobic, psychrotrophilics, and yeasts and molds. The second part of the project consisted in the survival curve of *L. rhamnosus* and starter culture in fermented milk, isolated and associated microbial, with counts made of control treatments and treateds with the HASC of cinnamon, clove and mint EOs. The analysis times were 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 13, 21, 29, 37, 55, 73, 168 (7 days), 136 (14 days), 504 (21 days) and 672 (28 days) hours after the start of fermentation and addition of EOs. Acidity determinations were performed on days 0, 5, 7, 168 (7 days) and 672 (28 days) hours. And the third and part of the project was the analysis of transmission electron microscopy for the culture of *L. rhamnosus* treated for 2 hours with 0.04 and 1.0% cinnamon EO, along with a count of viable cells after 2 hours (the time of microscopic analysis) and after 24 hours. The cinnamon EO showed 67.58% cinnamaldehyde as the major component. Was associated with the banana flavor in yogurt and HASC was 0.04%. However, this concentration was not detected significant antimicrobial activity in total microbial counts of yoghurt compared to control, even when the EO was associated with EDTA, polyethylene glycol or both. The of cinnamon, clove and mint EOs did not affect the

counting of *L. rhamnosus*, but there was significant reduction in the starter culture and acidity in the treatments added with the EOs, compared to control. The concentration of 0.04% cinnamon EO exerted bactericidal activity during the incubation of 2 hours, showed mild changes in cellular structure, but was considered bactericidal by allowing a significant reduction after 24 hours. The concentration of 1.00% reduced 3 log after 2 h incubation and was not detected viable cell count after 24 hours. Observations by transmission electron microscopy revealed that cells treated with 1.00% cinnamon EO have been severely damaged, with disruption of the cell membrane and cytoplasmic leakage. Thus, in the HASC, cinnamon EO did not have antimicrobial activity, only flavoring. However, the of cinnamon, clove and mint EOs in the HASC did not interfere with the development of probiotic bacterium *L. rhamnosus* in fermented milk, despite the antagonistic action against the starter culture, which caused a drop in production of lactic acid. However, *in vitro* conditions used in electron microscopy, cinnamon EO demonstrated bactericidal activity against *L. rhamnosus*. It is evident the continuity of technological alternatives to maximize the use of EOs as antimicrobial in dairy products, but applied at concentrations acceptable sensory.

Keywords: antimicrobials, essential oils, dairy products

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) de plantas são comumente comercializados em função de sua capacidade aromatizante. No entanto, tem despertado grande interesse devido às propriedades funcionais que também apresentam como antimicrobianos.

Como agentes ativos farmacologicamente, os OEs mostram grande espectro de atuação, contra vírus, fungos, parasitas e bactérias. Segundo Lanciotti et al. (2004) o interesse na possibilidade de uso de compostos naturais na prevenção do desenvolvimento microbiano em alimentos tem notável crescimento como resposta à pressão do consumidor para reduzir ou até mesmo eliminar os aditivos sintéticos adicionados nos alimentos industrializados.

Coerentemente com a imagem saudável, os conservantes naturais vêm adquirindo expressividade na aplicação em alimentos (Busatta et al., 2007). No mercado europeu estão disponíveis conservantes alimentícios compostos por 50% de OEs (alecrim, artimísia e citrus) e 50% de glicerol (Mendonza-Yepes et al., 1997). Outros produtos são encontrados também nos Estados Unidos a base de OEs dispersos em soluções de citrato de sódio ou cloreto de sódio, reconhecidos como aditivos alimentícios seguros (Cutter, 2000). Entretanto, insignificante quantidade desses conservantes alimentícios contendo OEs está disponível no mercado quando comparada aos demais conservantes usuais. Burt (2004) evidenciou a necessidade do enfoque de pesquisas para os aspectos legais do uso dos OEs e seus componentes em alimentos, em função das ações genotóxicas que podem apresentar, além de estudos que demonstrem os mecanismos de ação dos óleos, possibilitando adequadas aplicações tecnológicas.

Apesar da oportunidade de agregação de valor aos alimentos quando adicionados de OEs, principalmente contra micro-organismos patogênicos associados aos alimentos, há a necessidade de detalhamento para o aspecto sensorial do produto.

1 Atividade antimicrobiana dos OEs

A atividade antimicrobiana dos OEs tem sido testada principalmente sobre fungos patogênicos (Cheng et al., 2008; Angioni et al., 2006; Bakkali et al., 2005; Sacchetti et al., 2005) e bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos, como as Gram negativas *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella sonnei*, *S. flexner*, *Salmonella* Typhimurium e *Pseudomonas aeruginosa* (Moreira et al., 2005, Bagamboula, Uyttendaele & Debevere,

2004). Além das Gram negativas, Pereira et al. (2008), Oussalah et al. (2007) e Bruni et al. (2004) também verificaram a ação de OEs contra bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*, através da determinação da concentração inibitória mínima através dos métodos *in vitro* de difusão em disco e microdiluição.

Entretanto, visando à aplicação como conservantes alimentícios, estudos têm buscado a verificação da ação antimicrobiana dos OEs aplicados diretamente em alimentos.

Mendonça (2004) verificou inibição significativa no crescimento de *Staphylococcus aureus* quando inoculado em ricota com adição de 1% de OE do *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), com redução de 4,27 ciclos logarítmicos quando comparada ao crescimento de *S. aureus* em ricota sem adição de óleo. Em ricota adicionada de 1% de OE de orégano houve redução de 3,36 e 1,88 ciclos logarítmicos na população de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente (Alarcon, 2007).

Aplicando o OE de *Zataria multiflora* Boiss, uma planta típica do Irã, em sopa de cereais como modelo de sistema alimentar, Moosavy et al. (2008) verificaram que houve redução significativa na taxa de crescimento de *Salmonella* Typhimurium com o aumento das concentrações de OE e sua combinação com concentrações de nisina à temperatura de 8°C. Para *Staphylococcus aureus* uma inibição na contagem de células viáveis foi significativamente observada também com a adição de OE, nisina e suas combinações, tanto à temperatura de 8°C como à 25°C. Através do aumento da liberação dos constituintes celulares para o meio, tanto de *S. Typhimurium* como de *S. aureus*, e de observações das células por microscopia eletrônica de varredura, os autores observaram que a ação do OE em estudo e de nisina, assim como suas combinações, promoveu significativos danos morfológicos na parede celular e rompimento da membrana.

Busatta et al. (2007) obtiveram resultados que demonstraram que a adição de OE de orégano (*Origanum vulgare*) em lingüiça pode ser um via promissora para ação bacteriostática, no entanto, a aceitação sensorial decresce com o aumento da concentração de óleo adicionada.

Avaliando o OE de manjerona (*Origanum majorana* L.) Busatta et al. (2008) observaram que esse óleo aplicado em lingüiça exerceu um efeito bacteriostático quando adicionado em concentração equivalente à Concentração Inibitória Mínima (CIM) e em concentrações maiores exerceu um efeito bactericida, entretanto, ocorreram alterações no paladar do produto.

Barbosa et al. (2009) determinaram a CIM_{90%} de OEs extraídos de condimentos para *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis. Nessas concentrações os OEs foram aplicados em carne moída e hambúrguer irradiados e inoculados com os patógenos testados. Entretanto, as concentrações inibitórias testadas *in vitro* com capacidade de inibição em 90% não demonstraram a mesma efetividade na carne e no hambúrguer, sendo que as reduções mais altas foram de 1,3 e 1,0 log para os OEs de gengibre e tomilho, respectivamente.

Em meios de cultura como sistemas alimentares, Gutierrez et al. (2008 e 2009) investigaram a influência de diferentes componentes químicos sobre a ação antimicrobiana de diversos óleos aplicados isoladamente ou combinados, sendo que os OE foram mais eficientes frente a bactérias patogênicas quando aplicados em meios com elevado teor de proteína e alta acidez. Por outro lado, verificou-se necessitar de menores teores de gorduras e carboidratos bem como níveis moderados de açúcares simples.

Filmes de polietileno de baixa densidade (LDPE) contendo agentes antimicrobianos foram também relatados como alternativas aumentar a vida de prateleira de alimentos. A adição de linalol e metilcavicol, principais constituintes do OE de manjerição, em queijo Cheddar demonstraram efeito inibitório da microbiota natural e de amostras inoculadas com *Escherichia coli* e *Listeria innocua*, durante um período de 21 dias. Foi aplicado o teste triangular durante 1, 2, 3, 4 e 6 semanas como análise sensorial e os painelistas não detectaram significativamente o linalol em relação ao tratamento controle, até o final do período de estocagem (Suppakul et al., 2008).

2 Influência dos OEs na aceitação sensorial dos alimentos

Apesar do fato de que Smith-Palmer, Stewart & Fyfe (1998) obtiveram efeito bactericida *in vitro* com concentrações menores que 0,1% de OEs de diversas plantas, mas Smith-Palmer, Stewart & Fyfe (2001) evidenciaram que concentrações de 0,5 e 1% desses óleos são necessárias para inibir com êxito a contaminação de alimentos. Além disso, o uso de concentrações insuficientes permitiu o restabelecimento de células injuriadas não letalmente e foi verificado que a composição química, em relação à gordura, da matriz alimentar mostrou ser um importante fator na determinação da eficiência dos OEs. Assim, acredita-se que a necessidade do uso de altas concentrações de OEs em alimentos do que em meios

laboratoriais é devido a um ambiente de crescimento mais complexo no alimento, o qual providencia grande proteção às células microbianas contra os agentes antimicrobianos.

O uso de OEs, nas concentrações necessárias para serem efetivos como conservantes em alimentos, despertam o interesse de adequação em relação às alterações nas propriedades sensoriais do produto. Smith-Palmer, Stewart & Fyfe (2001) expuseram algumas visões tecnológicas para essa adequação.

- ↪ O OE não é apenas um conservante, mas também um componente flavorizante, como muitas ervas e condimentos que aromatizam produtos já existentes.
- ↪ Incorporar os OEs em produtos que já tenham um forte aroma, para assim mascarar a presença do mesmo.
- ↪ Aplicar alguns dos principais componentes ativos, ao invés do óleo completo. Com isso espera-se reduzir as alterações sensoriais, mantendo a atividade antimicrobiana.
- ↪ Desenvolvimento de combinações sinérgicas, tanto entre dois OEs ou um OE com outro antimicrobiano. Moosavy et al. (2008) propôs como alternativa a redução da quantidade total de óleo incorporado nos produtos alimentícios, diminuindo o efeito sensorial indesejável, e obtendo um forte efeito inibitório sinérgico entre OE e nisina, mantendo a ação antimicrobiana.
- ↪ Os OEs podem ser combinados com agentes quelantes, como o ácido etilendiaminotetracético, embora esse não seja considerado um conservante, eles podem potencializar outros agentes antimicrobianos.
- ↪ Utilizar os OEs com agentes dispersantes, como o polietilenoglicol, para aumentar o contato com as células microbianas, especialmente em alimentos com um alto teor lipídico.

Referências bibliográficas

Alarcon, M. M. V. Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em queijo ricota. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 2007. 56p.

Angioni, A.; Barra, A.; Coroneo, V.; Dessi, S.; Cabras, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from

stem;leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, p. 4364-4370, 2006.

Bagamboula, C. F.; Uytendaele, M.; Debevere, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21, p. 33-42, 2004.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Zhiri, A.; Idaomar, M. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 585, p. 1-13, 2005.

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

Bruni, R.; Medici, A.; Andreotti, E.; Fantin, C.; Muzzoli, M.; Dehesa, M.; Romagnoli, C.; Sacchetti, G. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 85, p. 415-421, 2004.

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

Busatta, C.; Mossi, A. J.; Rodrigues, A. R. M.; Cansian, R. L.; Oliveira, J. V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, p. 610-616, 2007.

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

Cheng, S-S.; Liu, J-Y.; Chang, E-H.; Chang, S-T. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*, 99, p. 5145-5149, 2008.

Cutter, C. N. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, 65, p. 601-607, 2000.

Lanciotti, R.; Gianotti, A.; Patrignani, F.; Belletti, N.; Guerzoni, M. E.; Gardini, F. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Food Science & Technology*, 15, p. 201-208, 2004.

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

Gutierrez, J.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26, p. 142-150, 2009a.

Mendonça, A. T. Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 2004. 72p.

Mendonza-Yepes, M. J.; Sanchez-Hidalgo, L. E.; Maertens, G.; Marin-Iniesta, F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. *Journal of Food Safety*, 17, p. 47-55, 1997.

Moosavy, M. H.; Basti, A. A.; Misahi, A.; Salehi, T. Z.; Abbasifar, R.; Mousavi, H. A. E.; Alipour, M.; Razavi, N. E.; Gandomi, H.; Noori, N. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Research International*, 41, p. 1050-1057, 2008.

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

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

Pereira, A. A.; Cardoso, M. G.; Abreu, L. R.; Morais, A. R.; Guimarães, L. G. L.; Salgado, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Ciência e Agrotecnologia*, 32, p. 887-893, 2008.

Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M.; Bruni, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91, p. 621-632, 2005.

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

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

Suppakul, P.; Sonneveld, K.; Bigger, S. W.; Miltz, J. Efficacy of polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil. *LWT – Food Science and Technology*, 41, p. 779-788, 2008.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve o objetivo geral de potencializar o uso de OEs em alimentos, especificamente em produtos lácteos fermentados, tendo como objetivos específicos:

- ↪ Identificar a preferência de consumo para alimentos com adição de conservantes naturais, bem como registrar as preferências quanto às associações entre os OEs em dois sistemas alimentares (iogurte e queijo processado), avaliados pela análise sensorial dos alimentos, de acordo com as formulações estabelecidas previamente.
- ↪ Determinar a concentração máxima de OE de canela considerada aceitável sensorialmente em iogurte e avaliar se nessa concentração o OE é capaz de exercer atividade antimicrobiana, isolado ou associado com etilenodiaminotetracético (EDTA) e/ou polietilenoglicol.
- ↪ Verificar a atividade antimicrobiana dos OEs de canela, cravo e menta sobre a bactéria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* utilizando o leite fermentado como modelo alimentar durante o seu período de vida de prateleira, sendo os OEs adicionados na concentração máxima aceitável determinada por análise sensorial, bem como ensaios *in vitro* para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).
- ↪ Verificar a sensibilidade da cultura de *L. rhamnosus* quando tratada com OE de canela através de enumeração de células viáveis e visualização celular por microscopia eletrônica de transmissão.

CAPÍTULO 1

Artigo submetido em 03 de junho de 2010 ao periódico *Natural Products Research* e apresentado conforme as normas da revista.

Aceitação de produtos alimentícios contendo óleos essenciais como antimicrobianos e flavorizantes

C.M. Feniman^{1*}, V.L.M. Rall², J.M. Sforcin², A.A.H. Fernandes³, A. Fernandes Júnior²

¹*Departamento de Tecnologia, Campus Regional de Umuarama, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama-PR, Brasil*

²*Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil*

³*Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil*

(Received XX Month Year; final version received XX Month Year)

*Autor Correspondente: tel./fax +55 44 36219300 - E.mail: crisfeniman@yahoo.com.br; V. L. M. Rall: vlmr@ibb.unesp.br; J. M. Sforcin: sforcin@ibb.unesp.br; A. A. H. Fernandes: angélica@ibb.unesp.br; A. Fernandes Júnior: ary@ibb.unesp.br

Aceitação de produtos alimentícios contendo óleos essenciais como antimicrobianos e flavorizantes

Resumo

Nosso grupo tem investigado o potencial dos óleos essenciais (OEs) como conservantes naturais e flavorizantes em sistemas alimentares. Trezentos entrevistados de ambos os sexos opinaram sobre alimentos com OEs e suas preferências pelas combinações dos OEs em iogurte e queijo foram determinadas e foi aplicada uma análise sensorial (Escala Hedônica) para as combinações dos produtos definidas pelo questionário. Os OEs foram caracterizados quimicamente por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM). Consumidores com idade acima de 41 anos de ambos os sexos foram estabelecidos como consumidores potenciais para os produtos avaliados. Iogurte sabor banana com OE de canela e queijo associado com os OEs de orégano e manjerição foram investigados e a maior concentração aceitável de OE de canela em iogurte com polpa de banana foi de 0,04% (p/p). Para o queijo, a concentração aceitável de OE de orégano foi de 0,08% (p/p) e de OE de manjerição foi de 0,06% (p/p). A indústria láctea tem o potencial de inovação tecnológica utilizando óleos essenciais como conservantes antimicrobianos, que também conferem sabor e aroma aos produtos. Entretanto, pesquisas complementares são necessárias para potencializar o efeito antimicrobiano nas concentrações aceitáveis determinadas neste estudo.

Palavras-chave: aceitação, ação antimicrobiana, óleos essenciais, flavorizantes e alimento

1. Introdução

A segurança de alguns conservantes químicos e as reações negativas de consumidores em relação a conservantes químicos e artificiais tem proporcionado um aumento no interesse para alternativas naturais para aumentar o *shelf-life* dos produtos alimentícios e reduzir o potencial dos alimentos serem veículos de toxinfecções alimentares, através da realização de pesquisas que buscam novos métodos para assegurar o controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (Nedorostova, Kloucek, Kokoska, Stolcova, & Pulkrabek, 2009; Moosavy et al., 2008; Souza, Stamford, Lima, Trajano, & Barbosa Filho, 2005; Lanciotti et al., 2004; Cox, Mann, & Markham, 2000). Desse modo, uma das estratégias utilizadas pelo setor alimentício é o estímulo ao consumo de produtos naturais.

Óleos essenciais (OEs) de plantas podem apresentar atividade antimicrobiana, atraindo o interesse das pesquisas científicas, especialmente sobre fungos patogênicos (Cheng, Liu, Chang, & Chang, 2008; Angioni, Barra, Coroneo, Dessi, & Cabras, 2006; Bakkali, Averbeck, Averbeck, Zhiri, & Idaomar, 2005; Sacchetti et al., 2005) e bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos, como *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella sonnei*, *S. flexner*, *Salmonella* Typhimurium e *Pseudomonas aeruginosa* (Moreira, Ponce, Valle, & Roura, 2005, Bagamboula, Uyttendaele, & Debevere, 2004). Barros et al. (2009), Bruni et al. (2004), Oussalah, Caillet, Saucier and Lacroix (2007) e Pereira et al. (2008) reportaram a ação dos EOs contra bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*. Essas pesquisas determinaram a Concentração Inibitória Mínima (CIM) através dos métodos de difusão em disco e microdiluição. Entretanto, visando à aplicação em alimentos, estudos verificaram a ação antimicrobiana dos óleos essenciais quando aplicados em alimentos, como vegetais minimamente processados (Gutierrez, Bourke, Lonchamp, & Barry-Ryan, 2009; Lanciotti et al., 2004), suco de brócolis (Munõz, Guevara, Palop, Tabera, & Fernández, 2009), cevada (Moosavy et al., 2008), linguiça (Busatta, Mossi, Rodrigues, Cansian, & Oliveira, 2007; Busatta et al., 2008), carne moída e hambúrguer (Barbosa et al., 2009) e queijo (Smith-Palmer, Stewart & Fyfe, 2001).

Em sistemas de modelos alimentares, Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008, 2009) investigaram a influência de diferentes componentes químicos sobre a ação antimicrobiana de diversos OEs aplicados isoladamente ou combinados, sendo que os OEs foram mais eficientes contra bactérias patogênicas quando aplicados em meios com elevado teor de proteína e alta acidez. Por outro lado, houve necessidade de baixos teores de gorduras e carboidratos bem como níveis moderados de açúcares simples.

Desse modo faz-se necessário identificar a aceitação do consumidor quanto à utilização dos óleos essenciais como antimicrobianos, pois além de agirem como conservantes também irão conferir aos alimentos sabores e aromas característicos. Mingoti (2001) referiu-se à utilização de pesquisas de mercado com o propósito de obter informações sobre a opinião dos consumidores em relação aos produtos já existentes no mercado ou protótipos.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi identificar o público consumidor para alimentos com adição de conservantes naturais, bem como registrar as preferências quanto às associações entre os OEs em dois sistemas alimentares (iogurte e queijo processado), avaliados pela análise sensorial dos alimentos, de acordo com as formulações estabelecidas previamente.

2. Material e métodos

2.1. Pesquisa de mercado

A pesquisa de mercado envolveu a coleta de dados primários junto a potenciais consumidores, que também foram analisados quanto ao perfil e propensão de compra para os produtos propostos.

Para identificar as combinações preferidas de OE com os produtos lácteos, além de estabelecer o mercado alvo consumidor para alimentos com o apelo de conservantes naturais, procedeu-se uma pesquisa de mercado delineada por levantamento de dados primários baseados nos parâmetros propostos por Pieniak, Verbeke, Vanhonacker, Guerrero and Hersleth (2009).

Foi aplicado um questionário direto formado por 12 questões sobre as características do consumidor (sexo e idade), comportamento de consumo (frequência de consumo semanal de iogurte e queijo, além da influência exercida pelo apelo de produtos naturais) e preferência da combinação de sabor de OEs com sabores de frutas para o iogurte e OEs em combinação com o queijo. Esse questionário foi aplicado a 300 entrevistados, sendo jovens e adultos de diferentes faixas etárias, de ambos os sexos e incluídos no meio universitário, cujo universo corresponde a 2.500 indivíduos.

Para evidenciar possíveis falhas na redação do questionário, como complexidade das questões, imprecisão na redação, não necessidades de questões, exaustão entre outros aspectos, aplicou-se um pré-teste à aproximadamente 30 elementos pertencentes à população pesquisada.

2.2. Análise sensorial

Após análise dos resultados e observação das combinações sugeridas pela pesquisa de mercado, foi realizada a análise sensorial com painelistas não treinados, pelo teste da Escala Hedônica, com 9 pontos variando entre as opções *Gostei Extremamente* e *Desgostei Extremamente* (Poste, Mackie, Butler, & Larmond, 1991). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista e foi realizado de acordo com os padrões éticos estabelecidos em 1964 na Declaração de Helsinki. Todos os indivíduos informaram seus consentimentos previamente para sua inclusão neste estudo.

O iogurte foi preparado com o fermento lácteo *Thermophilic Yoghurt Culture Yo-Flex*® (Christian Hansen – Brasil) com incubação de leite integral com 3% de gordura e 10% de açúcar, até a formação de 0,8% de ácido láctico, sendo então homogeneizado com a polpa de fruta e o OE (de canela em função da escolha estabelecida pela pesquisa de mercado). O queijo processado foi preparado a partir de 75% de queijo tipo mussarela, fundido com 1% de citrato de sódio e adicionado de 17% de creme de leite e 7% de água. Após a fusão, o OE (de orégano e manjerição em função da escolha estabelecida pela pesquisa de mercado) foi adicionado durante o resfriamento da massa, antes do envase. Em ambos os produtos foram utilizadas as concentrações 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2 e 0,4% (p/p) dos OEs.

Os OEs foram extraídos por destilação a vapor em aparelho tipo Clevenger (modelo MA480 – Marconi). A densidade dos OEs foi determinada (Fonseca & Librand, 2008) e a análise química por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM) foi realizada com o auxílio do equipamento Shimadzu GC-MS QP5050A, utilizando uma coluna capilar CBP-5 de 50m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura do filme. A temperatura do injetor foi de 250°C, a temperatura da interface foi de 250°C, o detector foi operado em modo *Electron Impact* (EI) a 70eV e utilizou-se hélio como gás de arraste. As condições cromatográficas para o OE de canela foram: temperatura inicial de 60°C, aquecimento até 160°C, com taxa de 3°C.min⁻¹, aquecimento até 220°C a uma taxa de 15°C.min⁻¹ e manutenção dessa temperatura por 20 minutos. Para o OE de orégano as condições foram: temperatura inicial de 60°C, aquecimento até 160°C, com taxa de 3°C.min⁻¹, aquecimento até 180°C a uma taxa de 10°C.min⁻¹ e manutenção dessa temperatura por 5 minutos, aquecimento até 200°C a uma taxa de 15°C.min⁻¹ e manutenção dessa temperatura por 3 minutos e aquecimento até 220°C a uma taxa de 20°C.min⁻¹ e manutenção dessa temperatura por 10 minutos. Já para o OE de manjerição as condições foram: temperatura inicial de 60°C, aquecimento até 160°C, com taxa de 3°C.min⁻¹, aquecimento até 220°C a uma

taxa de $15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e manutenção dessa temperatura por 10 minutos. A identificação dos componentes do óleo essencial foi feita com base na biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology, MD,USA) para análise dos espectros de massas e também nos dados da literatura (Adams, 1989).

Cada produto foi analisado em dias distintos após 48hs de seu processamento. Duas sessões foram realizadas para evitar fadiga sensorial dos panelistas, entre 9:00 e 11:00 horas e entre 15:00 e 17:00 horas. Em cada período foram servidas 4 amostras de concentrações intercaladas.

Os provadores avaliaram as amostras escolhendo para cada uma a opção que mais se adequava à sua aceitabilidade. Dados de 28 provadores para o iogurte e 30 provadores para o queijo foram coletados.

2.3. Análise estatística

Os dados da pesquisa de mercado foram analisados estatisticamente através de análise de correspondência (Mingoti, 2005), categorizando os elementos de acordo com as variáveis sexo e idade. Essas categorias foram associadas ao consumo semanal de cada produto, ao interesse ou não de compra do produto por conter conservante natural e também em relação ao aumento de compra pelo mesmo motivo. Análise de frequência e teste de Friedman foram aplicados para as combinações de óleos e sabores dos produtos (Poste, Mackie, Butler, & Larmond, 1991). Os dados da análise sensorial foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* SAS (SAS, 2009).

3. Resultados e discussão

Os entrevistados foram categorizados quanto ao sexo, idade, consumo e os produtos, iogurte e queijo, sendo essas categorias relacionadas à incidência de consumo semanal (Tabela 1).

De acordo com a análise de correspondência, o valor crítico da distribuição qui-quadrado com 45 graus de liberdade foi de 100,22, com $p < 0,05$. Como o valor tabular do qui-quadrado nessa significância é de 64, verificou-se que existe associação entre o consumo semanal e as categorias baseadas no sexo, idade e produtos, queijo e iogurte. Essas correspondências podem ser visualizadas na Figura 1.

Tabela 1. Consumo semanal de iogurte e queijo de acordo com o sexo e idade.

Categoria	Não consome	1 vez	2 ou 3 vezes	Todos os dias
Iogurte – Feminino até 18 anos	7	9	5	4
Iogurte – Feminino 19 até 30 anos	15	60	44	8
Iogurte – Feminino 31 até 40 anos	4	14	7	1
Iogurte – Feminino acima de 41 anos	4	5	8	6
Iogurte – Masculino até 18 anos	5	8	6	0
Iogurte – Masculino 19 até 30 anos	17	27	13	0
Iogurte – Masculino 31 até 40 anos	4	1	3	1
Iogurte – Masculino acima de 41 anos	2	6	5	1
Queijo – Feminino até 18 anos	3	7	10	5
Queijo – Feminino 19 até 30 anos	12	50	48	17
Queijo – Feminino 31 até 40 anos	2	8	12	4
Queijo – Feminino acima de 41 anos	1	1	11	10
Queijo – Masculino até 18 anos	5	6	7	1
Queijo – Masculino 19 até 30 anos	12	15	24	6
Queijo – Masculino 31 até 40 anos	1	2	4	2
Queijo – Masculino acima de 41 anos	1	3	7	3

Uma avaliação subjetiva do posicionamento das coordenadas para a correspondência das categorias quanto ao consumo de queijo, observou-se que há um consumo equilibrado em 2 ou 3 vezes por semana para todas as categorias. Quanto ao iogurte, o sexo masculino demonstrou-se um consumidor de baixo potencial, sendo que as categorias mais jovens não consomem e a categoria acima de 40 anos apresentou um consumo de apenas 1 vez por semana. Esse baixo consumo também foi visualizado nas categorias femininas entre 19 e 40 anos. Entretanto, a categoria feminina acima de 41 anos destacou-se no consumo de iogurte, considerado médio/elevado. Essa disposição ofereceu informações para definir o público alvo adulto para o consumo de queijo em todas as faixas etárias e para o consumo de iogurte principalmente a categoria feminina na faixa etária acima de 41 anos.

Os resultados também foram comparados quanto ao sexo e idade e relacionados à preferência dos consumidores por produtos naturais, estímulo para compra ou não do produto contendo conservante natural e aumento do consumo pelo mesmo motivo. A correspondência foi verificada pelo valor crítico do qui-quadrado igual a 35,86 a $p < 0,05$, maior que o valor tabular do qui-quadrado igual a 32,67 para 21 graus de liberdade (Figura 2). Observou-se que a opção de produtos com conservantes naturais foi decisiva na preferência, decisão e aumento do consumo para a faixa etária acima de 41 anos, tanto no sexo feminino quanto no masculino. Verificou-se que com o aumento na faixa etária houve também um aumento no senso crítico quanto às escolhas dos alimentos em função da experiência de vida, conhecimentos acumulados, além de valorização dos cuidados preventivos através da alimentação. Todavia, a inovação de produtos alimentícios no mercado consumidor deve

considerar os fatores de cultura, identidade e idade para aumentar a segurança, saúde e conveniência (Guerrero et al., 2009).

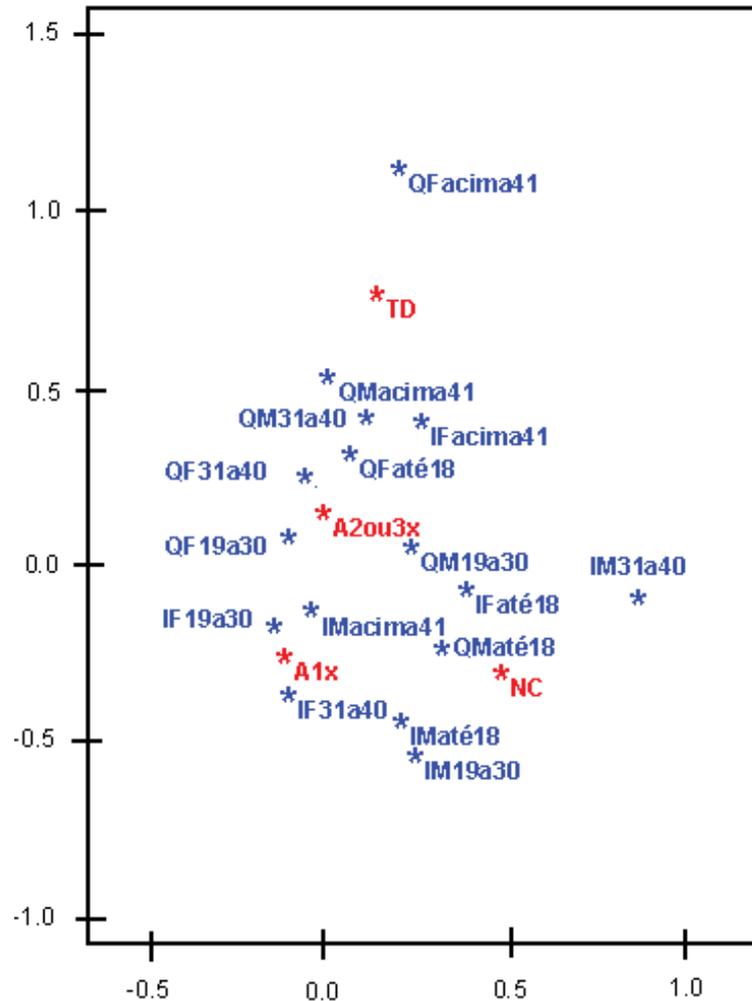


Figura 1. Correspondência entre idade, sexo, queijo e iogurte com o consumo seminal desses. (IFaté18) Iogurte Feminino até 18 anos. (IF19a30) Iogurte Feminino 19 a 30 anos. (IF31a40) Iogurte Feminino 31 a 40 anos. (IFacima41) Iogurte Feminino acima de 41 anos. (IMaté18) Iogurte Masculino até 18 anos. (IM19a30) Iogurte Masculino 19 a 30 anos. (IM31a40) Iogurte Masculino 31 a 40 anos. (IMacima41) Iogurte Masculino acima de 41 anos. (QFaté18) Queijo Feminino até 18 anos. (QF19a30) Queijo Feminino 19 a 30 anos. (QF31a40) Queijo Feminino 31 a 40 anos. (QFacima41) Queijo Feminino acima de 41 anos. (QMaté18) Queijo Masculino até 18 anos. (QM19a30) Queijo Masculino 19 a 30 anos. (QM31a40) Queijo Masculino 31 a 40 anos. (QMacima41) Queijo Masculino acima de 41 anos. (NC) Não consome. (A1x) Uma vez por semana. (A2ou3x) Duas ou três vezes por semana. (TD) Todos os dias da semana.

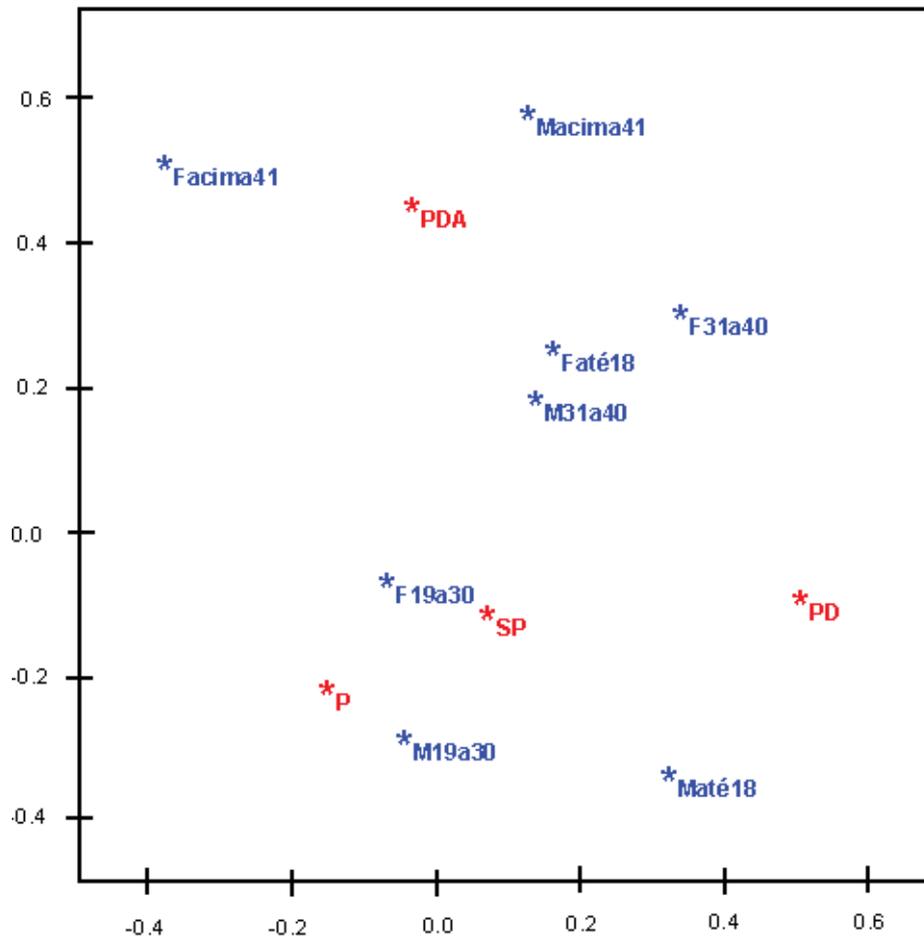


Figura 2. Correspondência entre as categorias idade e sexo com a preferência, indução de compra e aumento de consumo de produtos naturais. (Faté18) Feminino até 18 anos. (F19a30) Feminino 19 a 30 anos. (FW31a40) Feminino 31 a 40 anos. (Facima41) Feminino acima de 41 anos. (Maté18) Masculino até 18 anos. (M19a30) Masculino 19 a 30 anos. (M31a40) Masculino 31 a 40 anos. (Macima41) Masculino acima de 41 anos. (SP) Sem preferência. (P) Preferência. (PD) Preferência e decisão. (PDA) Preferência, decisão e aumento.

Ares, Giménez and Gámbaro (2008), Pieniak, Verbeke, Vanhonacker, Guerrero e Hersleth (2009) e Pohjanheimo e Sandell (2009) relataram que fatores associados à saúde são considerados importantes pelos consumidores durante a escolha de alimentos.

Outro aspecto importante é que o aumento da demanda por produtos naturais e seguros, tanto em países desenvolvidos com em desenvolvimento, tem acompanhado também o aumento do poder aquisitivo das populações em poder pagar o valor agregado desses produtos (McGill, 2009).

De acordo com os dados obtidos, evidenciou-se que a exploração do mercado consumidor para o apelo de produtos com conservantes naturais, a exemplo dos OEs, deve priorizar as faixas etárias acima de 40 anos e que os indivíduos do sexo masculino é uma

categoria que deve ter atenção mais consistente e objetiva, tanto para a escolha de produtos naturais quanto para o aumento do consumo de lácteos, especialmente iogurte.

Como resultado importante da pesquisa de mercado também foi possível identificar as combinações preferidas de OEs e os produtos lácteos. Em relação ao iogurte foram testadas as opções de sabores de frutas (abacaxi, banana, maçã, mamão, melão, morango, pêsego e outros) em combinação com os óleos essenciais de canela, cravo e menta.

Além da indicação do sabor de fruta que mais se adequava para cada OE, foi solicitada a indicação da melhor combinação. Uma análise de frequência dos dados foi realizada, conforme resultados apresentados na Figura 3.

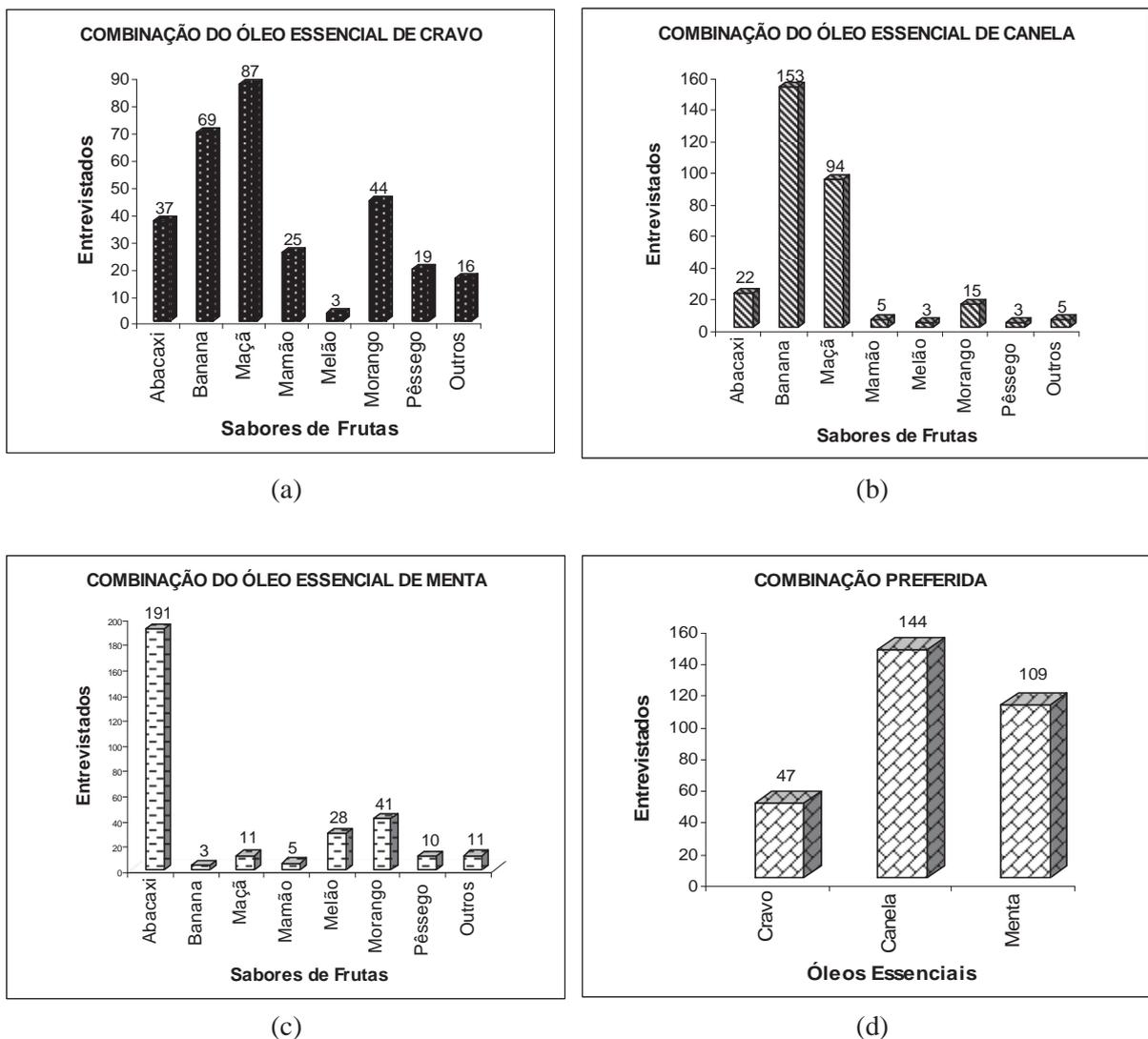


Figura 3. Combinações de OEs e sabores de frutas para o iogurte. (a) OE de cravo. (b) OE de canela. (c) OE de menta. (d) Combinação preferida.

Verificou-se que o óleo de cravo teve associação mais diversificada, porém com predominância do sabor de maçã para um total de 87 entrevistados (29%). Por outro lado, o óleo de menta foi predominantemente associado com o sabor abacaxi, escolhido por 191 entrevistados (64%). O óleo de canela apresentou associação com o sabor banana para 153 entrevistados (51%) e foi a combinação mais preferida para 144 entrevistados (48%), sugerindo que um produto com essa combinação deva ter melhor aceitabilidade pelo público consumidor devido à sua pré-concepção de associação.

Quanto ao queijo, a análise dos dados referentes à preferência dos sabores de condimentos associados ao produto encontra-se na Tabela 2. O condimento orégano foi o que mais se destacou na preferência dos entrevistados, apesar de ser estatisticamente igual, $p < 0,05$, ao condimento manjericão. Entretanto, a mediana para o orégano encontrou-se na nota 5 (ótimo), enquanto que o manjericão apresentou a nota 3 (regular) como mediana. Assim, da mesma forma que para o iogurte, a exploração da aplicação de orégano como agente antimicrobiano no queijo mostra-se com grande possibilidade de aceitação pelo consumidor devido ao forte conceito associativo desse condimento ao queijo.

Tabela 2. Teste de Friedman aplicado para a preferência de condimentos associados com queijo.

Friedman (fr) = 535,7	Orégano	Tomilho	Manjericão	Louro	Gengibre
Soma dos Ranks	1.379,5 ^a	836,5 ^{bd}	1.009,5 ^{abc}	731,5 ^{bcd}	543 ^d
Mediana	5	3	3	2	1
Média dos Ranks	5	2.8	3.3	2.4	1.8
Desvio Padrão	0,9365	1,3688	1,3303	1,1262	0,9855

letras iguais na mesma coluna indicam que as medianas são estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Desse modo, o estudo prosseguiu com os OEs de canela para o iogurte e de orégano e manjericão para o queijo processado, sendo então realizada a caracterização do OEs.

O OE de canela apresentou densidade de 1,0049g/ml e sua análise cromatográfica está apresentada na Figura 4, sendo que 89,58% dos componentes foram identificados e os compostos majoritários foram o cinamaldeído, seguido pelo acetato de cinamil e cineol.

O OE de orégano teve densidade de 0,9004g/ml e seu cromatograma (Figura 5) demonstra que 78,26% dos componentes foram identificados e o α -terpineno e o p-cimeno foram os mais significativos.

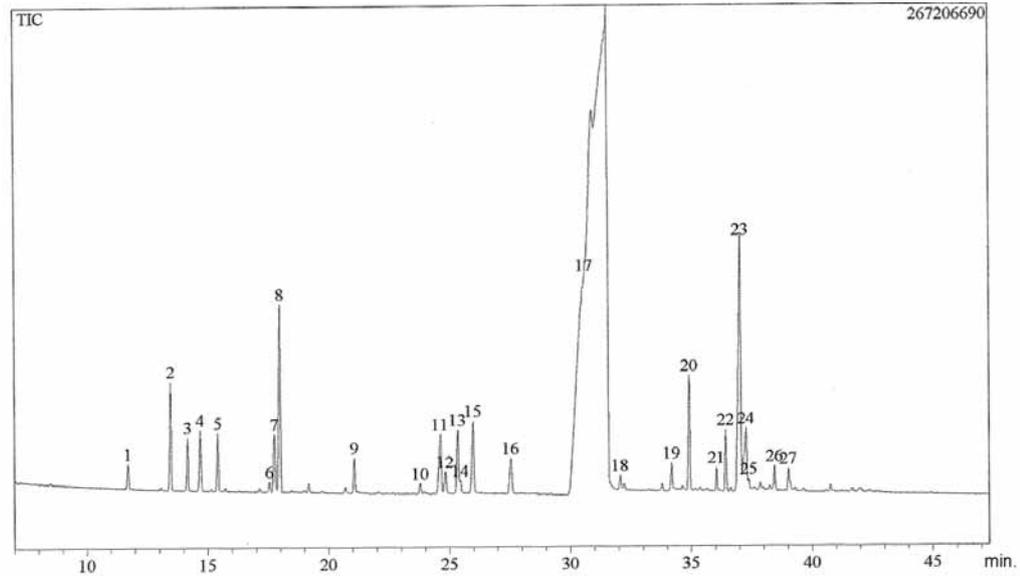


Figura 4. Cromatograma obtido para o OE de canela utilizado na identificação de compostos através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM); 88,59% dos compostos foram identificados. 2: α -pineno (1,62%); 3: camphene (0,79%); 5: β -pineno (0,93%); 6: cymeno (0,17%); 7: limoneno (1,11%); 8: cineol (3,31%); 9: linalool (0,55%); 12: borneol (0,50%); 13: terpineno-4-ol (1,22%); 15: α -terpineno (1,43%); 17: cinamaldeído (67,58%); 19: eugenol (1,82%); 22: caryophylleno (0,88%); 23: acetato de cinamila (6,49%); 25: α -humuleno (0,19%).

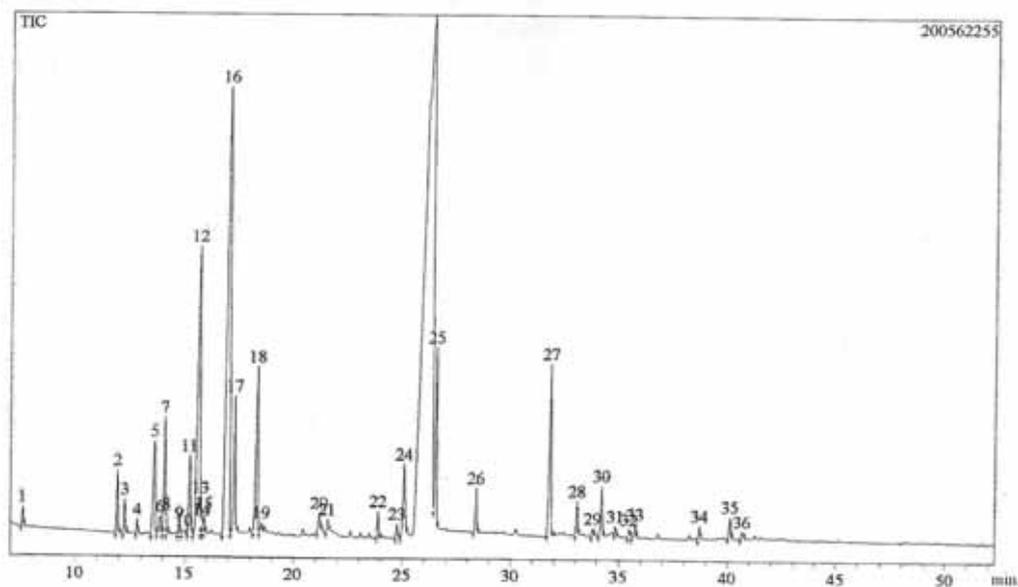


Figura 5. Cromatograma obtido para o OE de orégano utilizado na identificação de compostos através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM); 78,26% dos compostos foram identificados. 3: α -pineno (0,84%); 5: octen-3-ol (3,88%); 7: mirceno (3,44%); 11: α -terpineno (0,99%); 12: p-cimeno (14,96%); 13: limoneno (0,76%); 16: α -terpineno (29,36%); 18: limalol (7,13%); 20: borneol (0,66%); 25: timol (5,93%); 27: cariofileno (7,81%); 29: germacrene (0,25%); 31: bisabolol (0,25%).

O OE de manjeriço teve densidade de 0,8828g/ml e 54,60% dos compostos foram identificados (Figura 6) com o linalol e o eugenol quantificados em elevadas quantidades.

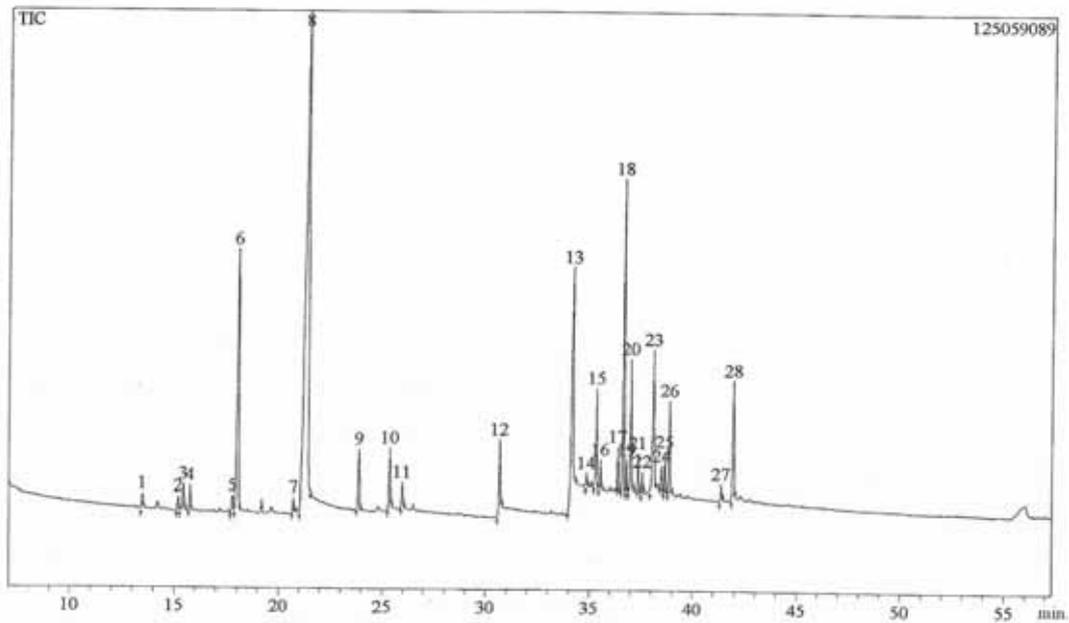


Figura 6. Cromatograma obtido para o OE de manjeriço utilizado na identificação de compostos através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM); 54,60% dos compostos foram identificados. 1: α -pineno (0,41%); 2: β -pineno (0,40%); 3: mirceno (0,75%); 5: limoneno (0,68%); 8: linalol (38,07%); 9: cânfora (2,00%); 13: eugenol (10,36%); 14: copaene (0,36%); 17: β -cariofileno (0,93%); 24: germacreno (0,64%).

Quanto aos resultados dos testes de aceitabilidade (Tabela 3), realizados de acordo com a metodologia da Escala Hedônica, foram adotadas combinações de OE de canela com o sabor de banana para o iogurte e os OEs de orégano e manjeriço para o queijo, que foram os dois condimentos que se destacaram na análise de preferência. Tanto para os tratamentos com OE de canela no iogurte quanto os tratamentos com os OEs de orégano e manjeriço no queijo, as notas atribuídas apresentaram decréscimo em função do aumento da concentração de OE adicionado.

No iogurte, até a concentração 0,04% de OE de canela não houve diferença significativa ($p < 0,05$), sendo que nessa concentração foi obtida média 6,28, equivalente na escala Hedônica ao *Gostei Ligeiramente*. No entanto, a mediana foi 7,00 explicando 50% dos dados referentes à opção *Gostei Moderadamente*.

Tabela 3. Análise de variância para a pontuação do iogurte e do queijo na avaliação sensorial através da Escala Hedônica.

Tratamentos		0,01%	0,02%	0,04%	0,06%	0,08%	0,1%	0,2%	0,4%
Iogurte (Canela)	Média	7,82 ^a ±	6,89 ^{ab} ±	6,28 ^{abc} ±	5,57 ^{bc} ±	4,57 ^{cd} ±	4,28 ^{cd} ±	2,61 ^{de} ±	1,92 ^e ±
		0,92	1,75	1,82	2,25	2,14	2,26	1,91	1,43
	Mediana	8	7,5	7	6	4,28	4	2	1
Queijo (Orégano)	Média	6,2 ^{ab} ±	6,26 ^{ab} ±	6,73 ^a ±	6,26 ^{ab} ±	5,96 ^{abc} ±	5,63 ^{abc} ±	4,8 ^{bc} ±	4,3 ^{bc} ±
		1,97	1,99	1,81	2,01	2,07	2,18	2,36	2,27
	Mediana	7	7	7	7	7	6	5	4
Queijo (Manjericão)	Média	7,1 ^a ±	6,66 ^{ab} ±	5,76 ^{abc} ±	5,66 ^{abc} ±	5,1 ^{cd} ±	5,23 ^{bcd} ±	4,03 ^{de} ±	2,56 ^e ±
		1,42	1,68	2,04	1,93	1,98	2,26	1,95	1,52
	Mediana	7	7	6	6,5	6	5,5	4	2

letras iguais na mesma linha indicam que as medianas são estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

No queijo processado, entre os tratamentos com OE de orégano até a concentração 0,1% não houve diferença estatística ($p < 0,05$). Entretanto, a concentração definida como máxima a ser aplicada ao queijo processado foi a de 0,08%, que correspondeu ao valor médio de 5,97 (equivalente ao *Gostei Ligeiramente*) e mediana igual a 7,00 (equivalente ao *Gostei Moderadamente*). Para o OE de manjericão, até a concentração 0,06% não houve diferença estatística ($p < 0,05$). Essa concentração foi definida como máxima a ser aplicada ao queijo processado, com média de 5,80, ou seja, equivalente ao *Gostei Ligeiramente*, e mediana igual 7,00, equivalente ao *Gostei Moderadamente*.

Para as concentrações máximas de OEs obtidas neste estudo, pesquisas evidenciaram que são suficientes para garantir efeito bactericida *in vitro* (Di Pasqua, Hoskins, Betts, & Mauriello, 2006; Dorman & Deans, 2000; Gutierrez, Bourke, Lonchamp, & Barry-Ryan, 2008; Helander et al., 1998; Oussalah et al., 2007; Pereira et al., 2008). No entanto, a inibição *in vitro* foi verificada com concentrações acima dos valores máximos aceitáveis sensorialmente neste estudo (Busatta, Mossi, Rodrigues, Cansian, & Oliveira, 2007; Busatta et al., 2008; Hammer, Carson, & Riley, 1999; Moreira, Ponce, Valle, & Roura, 2005), além de pesquisas determinarem o efeito antimicrobiano no alimento somente quando a concentração seja em torno de 1,0% (Burt, 2004; Smith-Palmer, Stewart, & Fyfe, 2001). Neste estudo, a maior concentração empregada foi de 0,4%, inferior a que na literatura tem sido relatada por apresentar efeito antimicrobiano no alimento, mas que no estudo apresentou rejeição significativa pelos provadores, com valor da média de 1,93 (*Desgostei Muito*) para o OE de canela no iogurte, 4,33 (*Desgostei Ligeiramente*) para o OE de orégano e 2,83 (*Desgostei Moderadamente*) para o óleo de manjericão no queijo processado.

Os dados de aceitabilidade de certa forma direcionam para a aplicação dos OEs em alimentos, especialmente como flavorizantes. Entretanto, pesquisas têm buscado alternativas tecnológicas para aumentar o efeito antimicrobiano dos OEs nos alimentos em concentrações aceitáveis sensorialmente. Desse modo, enfatiza-se a necessidade de estudos posteriores para a verificação da atividade antimicrobiana nas concentrações determinadas neste estudo, assim como da associação da aplicação dos OEs com alternativas tecnológicas para potencializar a ação antimicrobiana.

4. Conclusões

A definição do público alvo consumidor facilita o desenvolvimento de produtos que tenham maior possibilidade de aceitação no mercado. A associação de produtos e conservantes naturais aos alimentos tem maior aceitação pelo público com maior faixa etária e principalmente pelo sexo feminino. Através desta pesquisa pode-se observar que o segmento de produtos lácteos tem o potencial de inovação tecnológica para esse setor do mercado de alimentos – produtos lácteos, utilizando EOs como conservantes antimicrobianos, além de conferirem sabor e aroma característicos aos produtos. Assim, as associações entre OE de canela e sabor banana para o iogurte e a aplicação de OEs de orégano e manjerição em queijos despontam com grande possibilidade de aceitação devido ao forte conceito prévio de associação para esses sabores, mas que necessitam de pesquisas complementares para verificar e potencializar o efeito antimicrobiano nas concentrações determinadas neste estudo.

Referências bibliográficas

- Adams, R.P. (1989). Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. San Diego, California: Academic Press, INC.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem; leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4364-4370.
- Ares, G., Giménez, A., & Gámbaro, A. (2008). Understanding consumer's perception of conventional and functional yogurts using word association and hard laddering. *Food Quality and Preference*, 19, 636-643.
- Bagamboula, C.F., Uytendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21, 33-42.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., & Idaomar, M. (2005). Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 585, 1-13.
- Barbosa, L.N., Rall, V.L.M., Fernandes, A.A.H., Ushimaru, P.I., Probst, I.S., & Fernandes Júnior, A. (2009). Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 725-728.
- Barros, J.C., Conceição, M.L., Gomes Neto, N.J., Costa, A.C.V., Siqueira Júnior, J.P., Basílio Júnior, I.D., & Souza, E.L. (2009). Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1139-1143.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., Romagnoli, C., & Sacchetti, G. (2004). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 85, 415-421.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Busatta, C., Mossi, A.J., Rodrigues, A.R.M., Cansian, R.L., & Oliveira, J.V. (2007). Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 610-616.
- Busatta, C., Vidal, R.S., Popiolski, A.S., Mossi, A.J., Dariva, C., Rodrigues, M.R.A., Corazza, F.C., Corazza, M.L., Oliveira, J.V., & Cansian, R.L. (2008). Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, 25, 207-211.
- Cheng, S-S., Liu, J-Y., Chang, E-H., & Chang, S-T. (2008). Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*, 99, 5145-5149.
- Cox, S.D., Mann, C.M., & Markham, J.L. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca altermifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170-175.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., & Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2745-2749.

- Dorman, H.J.D., & Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.
- Fonseca, P., & Librand, A.P.L. (2008). Evaluation of physico-chemical and phytochemical characteristics of different tinctures of barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Brazilian Journal of Pharmacology and Science*, 44, 271-277.
- Guerrero, L., Guàrdia, M.D., Xicola, J., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Zakowska-Biemans, S., Sajdakowska, M., Sulmont-Rossé, C., Issanchou, S., Contel, M., Scalvedi, M.L., Granli, B.S., & Hersleth, M. (2009). Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study. *Appetite*, 52, 345-354.
- 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.
- Gutierrez, J., Bourke, P., Lonchamp, J., & Barry-Ryan, C. (2009). Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 195-202.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., & Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.
- 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, 3590-3595.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M.E., & Gardini, F. (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Food Science & Technology*, 15, 201-208.
- McGill, A.E.J. (2009). The potential effects of demands for natural and safe foods on global food security. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 402-406.
- Mingoti, S.A. (2001). How to estimate the amount of important characteristics missing in a consumers sample by using bayesian estimators. *Pesquisa Operacional*, 21, 31-38.
- Mingoti, S.A. (2005). *Análise de dados através de métodos de estatística multivariada – uma abordagem aplicada*. Belo Horizonte, MG: UFMG.

- Moosavy, M.H., Basti, A.A., Misahi, A., Salehi, T.Z., Abbasifar, R., Mousavi, H.A.E., Alipour, M., Razavi, N.E., Gandomi, H., & Noori, N. (2008). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Research International*, *41*, 1050-1057.
- Moreira, M.R., Ponce, A.G., Valle, C.E., & Roura, S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT – Food Science and Technology*, *38*, 565-570.
- Munõz, M., Guevara, L., Palop, A., Tabera, J., & Fernández, P.S. (2009). Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria monocytogenes* in broth and food systems using flow cytometry. *LWT – Food Science and Technology*, *42*, 220-227.
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., & Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, *20*, 157-160.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, *18*, 414-420.
- Pereira, A.A., Cardoso, M.G., Abreu, L.R., Morais, A.R., Guimarães, L.G.L., & Salgado, A.P.S.P. (2008). Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Ciência e Agrotecnologia*, *32*, 887-893.
- Pieniak, Z., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Guerrero, L., & Hersleth, M. (2009). Association between traditional food consumption and motives for food choice in six European countries. *Appetite*, *53*, 101-108.
- Pohjanheimo, T., & Sandell, M. (2009). Explaining the liking for drinking yoghurt: the role of sensory quality, food choice motives, health concern and product information. *International Dairy Journal*, *19*, 459-466.
- Poste, L.M., Mackie, D.A., Butler, G., & Larmond, E. (1991). *Laboratory methods for sensory analysis of food*. Ottawa: Canada Communication Group.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, *91*, 621-632.

SAS. (2009). Institute Inc. Cary, NC. Verson 9.00. Licensed by UNESP.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463-470.

Souza, E.L., Stamford, T.L.M., Lima, E.O., Trajano, V.N., & Barbosa Filho, J.M. (2005). Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 549-558.

CAPÍTULO 2

Artigo submetido em 24 de dezembro de 2010 ao periódico *Ciência e Agrotecnologia* e apresentado conforme as normas da revista.

Assessment of the Antimicrobial Activity of the Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* B.) Essential Oil Combined With EDTA and Polyethylene Glycol in Yogurt

Determinação da Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* B.) Combinado Com EDTA e Polietilenoglicol no Iogurte

Cristiane Mengue Feniman*

Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia, Campus Regional de Umuarama, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama-PR, Brasil

Vera Lúcia Mores Rall

Doutora em Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil

Margarida Júri Saeki

Doutora em Ciências Biológicas, Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil

Ary Fernandes Júnior

Doutor em Agronomia, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil

Resumo

A utilização de óleos essenciais (OEs) como antimicrobianos em alimentos é restrita devido à necessidade de elevadas concentrações, interferindo nos atributos sensoriais. Alternativas tecnológicas são propostas na literatura, como combinar os OEs com agentes quelantes e

*Corresponding author: Master in Food Science and Technology, Department of Technology, Regional Campus of Umuarama, State University of Maringá, Av. Ângelo Moreira da Fonseca, 1800, Umuarama-PR, Brazil, CEP 87506-370, tel./fax +55 44 36219300, e-mail address: crisfeniman@yahoo.com.br

dispersantes. Este estudo objetivou determinar ação antimicrobiana de OE de canela (*Cinnamomum zeylanicum* B.) em amostras de iogurte quando adicionado na concentração máxima aceitável sensorialmente, isolado ou associado com etilenodiaminotetracético (EDTA) e/ou polietilenoglicol. A análise química do OE de canela foi realizada por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM) e avaliada a ação antimicrobiana do na concentração de 0,04% (p/p), estabelecido como a concentração máxima aceitável sensorialmente, através da contagem de aeróbios mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras em amostras de iogurte com polpa natural de banana. Os tratamentos foram (1) controle, (2) OE, (3) OE + 0,01% de EDTA, (4) OE + 0,2% de polietilenoglicol e (5) OE + 0,01% de EDTA + 0,2% de polietilenoglicol, em triplicatas. O composto majoritário do OE de canela foi o cinamaldeído. A adição do polietilenoglicol como um coadjuvante tecnológico reduziu as contagens de aeróbios mesófilos e bolores e leveduras, mas sem diferença estatística. O crescimento de psicrotróficos não foi detectado.

Palavras-chave: óleo essencial de canela, iogurte, atividade antimicrobiana.

1. Introdução

Os produtos alimentícios devem ser protegidos contra deterioração microbiana durante sua vida de prateleira e estarem isentos de patógenos. A demanda de produtos seguros e naturais, sem conservantes químicos, tem crescido entre os consumidores. Assim, ressalta-se a necessidade de pesquisas que avaliem técnicas alternativas de preservação da qualidade microbiológica e que garantem a segurança dos produtos, mantendo suas propriedades nutricionais e sensoriais (Goñi et al., 2009).

Os óleos essenciais (OE) apresentam-se como novas opções tecnológicas para serem aplicados como conservantes. Apresentam largo espectro de atuação contra bactérias, vírus, fungos, parasitas e insetos, com aplicações medicinais e cosméticas e com potencial de utilização nas indústrias farmacêutica, sanitária, cosmética, agricultura e alimentícia. Em função do modo de extração, normalmente por destilação a vapor, eles contêm uma variedade de moléculas voláteis como terpenos, terpenóides, compostos aromáticos derivados do fenol e componentes alifáticos (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008).

A canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) da família Lauraceae tem sido utilizada como especiaria por milhares de anos, sendo observadas referências bíblicas e menções de sua aplicação em fluidos balsâmicos no Egito. Sua aplicação é relacionada com a ação

antibacteriana, fungicida e antioxidante (Barceloux, 2009). O OE de canela é constituído de cinamaldeído como constituído majoritário, além do β -cariofileno, linalol e outros terpenos. É usado largamente como aditivo alimentício e agente flavorizante e considerado como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (Barceloux, 2009; Tzortzakis, 2009).

Considerando a planta da canela, OE e resinas podem ser extraídas de folhas e cascas. Singh, Maurya, DeLampasona e Catalan (2007) observaram que o OE de folhas e cascas tem ação antifúngica, enquanto que o OE e a resina de folhas têm ação bactericida. Os autores também mencionaram que resinas, de folhas ou casca, tiveram uma excelente atividade contra oxidação primária e secundária em óleo de mostarda quando foram empregados na concentração de 0,02%.

Kim, Park e Park (2004) isolaram o cinamaldeído de *Cinnamomum cassia* B. e a sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o crescimento de *Escherichia coli* O157: H7 foi de 250mg/ml e Wong et al. (2008) encontraram a CIM de 26,2 μ g/ml contra linhagens de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. A CIM do OE de canela variou entre 0,5 e 1,0% contra linhagens de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de espécimes humanas (Nuryastuti et al., 2009) e a CIM foi de 3,2mg/ml para *S. aureus*, >1,6mg/ml para *Bacillus subtilis*, 3,2mg/ml para *Klebsiella pneumoniae*, >1,6mg/ml para *Proteus vulgaris*, >0,8mg/ml para *Pseudomonas aeruginosa* e >1,6mg/ml para *Escherichia coli* (Prabuseenivasan, Jayakumar, & Ignacimuthu, 2006).

Numerosos estudos *in vitro* de OEs contra bactérias patogênicas veiculadas por alimentos foram realizados, principalmente utilizando os métodos de difusão em disco e microdiluição. Entretanto, em menor proporção são realizados estudos sobre a atividade antimicrobiana de OEs aplicados diretamente em alimentos, como vegetais minimamente processados (Gutierrez, Barry-Ryan, & Bourke, 2009, Lanciotti et al., 2004), suco de brócolis (Munhoz et al., 2009), cevada (Moosavy et al., 2008), linguiça (Busatta et al., 2008; Busatta et al., 2007), carne moída e hamburguer (Barbosa et al., 2009) e queijo (Smith-Palmer, Stewart, & Fyfe, 2001).

Embora os OEs e seus componentes sejam altamente eficientes contra patógenos e micro-organismos deteriorantes de origem alimentar em meios de cultura, o mesmo efeito foi encontrado somente quando as concentrações maiores de OEs foram utilizadas em alimentos, o que implicou em um impacto organoléptico por exceder limite sensorialmente aceitável (Burt, 2004).

Busatta et al. (2007) reportaram que o OE de orégano (*Origanum vulgare*) em lingüiça pode ser uma via promissora pelo o efeito bacteriostático, entretanto, a aceitação sensorial decresceu com o aumento da concentração do óleo. Para o OE de mangerona (*Origanum majorana*) em lingüiça, Busatta *et al.* (2008) também obtiveram um efeito bacteriostático na CIM determinada *in vitro* e efeito bactericida quando empregado em concentrações maiores, entretanto, alterações sensoriais foram observadas.

Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (1998) observaram efeito bactericida *in vitro* em concentrações menores que 0,1% de OEs e Smith-Palmer *et al.* (2001) mostraram que concentrações de OEs de 0,5 até 1,0% foram necessárias para inibir a contaminação de alimentos. Além disso, o uso de concentrações insuficientes permite a restauração de células não danificadas letalmente e foi verificada que a composição química do alimento, em relação à gordura, é um fator determinante na eficiência dos OEs. Assim, acredita-se que sejam necessárias altas concentrações de OEs em alimentos em relação às concentrações determinadas em testes *in vitro* para exercer atividade antimicrobiana em virtude de o alimento ser um sistema complexo quimicamente que proporciona proteção para as células microbianas.

Diferentes compostos mostraram influência na atividade antimicrobiana dos OEs. Em modelos de sistemas alimentícios, Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008, 2009) demonstraram que os óleos foram mais eficientes contra bactérias patogênicas quando aplicados em meios de alto conteúdo protéico e acidez. Todavia, houve necessidade de baixo conteúdo de gordura e carboidratos, assim como moderados níveis de açúcares simples para manter a efetividade dos OEs.

Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (2001) descreveram as propostas de incorporar os óleos essenciais em produtos que já tenham um forte aroma, para assim mascarar a presença do mesmo; aplicar alguns dos principais componentes ativos, ao invés do óleo completo; desenvolver combinações sinérgicas, tanto entre dois óleos essenciais ou um óleo essencial com outro antimicrobiano; combinar os óleos essenciais com agentes quelantes, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), embora esse não seja considerado um conservante, ele pode potencializar outros agentes antimicrobianos e utilizar os óleos essenciais com agentes dispersantes, como o polietilenoglicol, para aumentar o contato com as células microbianas, especialmente em alimentos com um alto teor lipídico.

Ojagh et al. (2009) aplicaram revestimento de quitosana e OE de canela em trutas e observaram inibição da oxidação lipídica e o aumento da vida de prateleira de 12 dias (controle) para 16 dias de armazenamento a 4°C. Uma análise sensorial foi realizada após três

dias de estocagem e as amostras foram preparadas através de aquecimento por 10 a 20 min. à 98°C, adicionadas de 1,5% de sal. Os resultados indicaram que as películas foram imperceptíveis e a película com o OE de canela não produziu depreciação sensorial.

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi determinar a concentração máxima de OE de canela considerada aceitável sensorialmente no iogurte e avaliar se nessa concentração o OE é capaz de exercer atividade antimicrobiana, isolado ou associado com etilenodiaminotetracético (EDTA) e/ou polietilenoglicolico.

2. Material e métodos

2.1. Extração e caracterização química do OE de canela

O OE de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) foi extraído por arraste de vapor em destilador (modelo MA480 - Marconi) e a densidade determinada pela pesagem do volume de 1ml (Fonseca & Librand, 2008). A caracterização química foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado em espectrômetro de massa (CG-EM) (modelo QP5050A - Shimadzu), com 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 foi de 250°C, a temperatura da interface foi de 250°C, o detector foi operado em modo electron impact (EI) a 70eV e utilizou-se He como gás de arraste. As condições cromatográficas para o OE de canela foram temperatura inicial de 60°C, aquecimento até 160°C, com taxa de 3°C.min⁻¹, aquecimento até 220°C a uma taxa de 15°C.min⁻¹ e manutenção dessa temperatura por 20 minutos. A identificação dos componentes do óleo essencial foi feita com base na biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology, MD,USA) para análise dos espectros de massas e também nos dados da literatura (Adams, 1989).

2.2. Análise sensorial

Este teste foi realizado com 28 painelistas não treinados, de ambos os sexos e com idade entre 20 e 50 anos. Foi aplicado o teste da Escala Hedônica com 9 pontos, os quais variaram entre as opções *Gostei Extremamente* (9) e *Desgostei Extremamente* (1) (Poste et al., 1991). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista e foi realizado de acordo com os padrões éticos estabelecidos em 1964 na Declaração de Helsinki.

Todos os indivíduos informaram seus consentimentos previamente para sua inclusão neste estudo.

Iogurte foi obtido por inoculação de leite pasteurizado com *Thermophilic Yoghurt Culture Yo-Flex*® (Christian Hansen-Brazil), sendo incubado a 42°C até que foi formado 0.80% de ácido láctico, seguido de homogeneização com 20% (p/v) de polpa de fruta, preparada com banana *in natura*, e 10% (p/v) de açúcar. Os tratamentos foram estabelecidos com a adição de OE de canela nas concentrações 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2 e 0,4% (p/p).

Após 48 horas do processamento, duas sessões de análise sensorial foram realizadas para evitar fadiga sensorial dos painelistas, sendo essas entre 09:00 e 11:00 horas e entre 15:00 e 17:00 horas. Em cada período quatro amostras com concentrações intercaladas foram servidas.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey utilizando o *software* SAS e a concentração máxima aceitável sensorialmente de OE de canela em iogurte foi considerado a que teve uma pontuação mínima igual a 7,0, equivalente ao *Gostei Moderadamente*.

2.3. Avaliação antimicrobiana do OE de canela

A concentração de OE de canela utilizada no estudo foi de 0,04% (p/p), correspondente à concentração máxima aceitável estabelecida durante a análise sensorial.

O iogurte foi obtido como descrito previamente e unidades analíticas de 200g foram separadas em recipientes assépticos e os tratamentos foram estabelecidos: (1) tratamento controle, (2) adição de OE, (3) adição de OE associado com 0,01% (p/p) de EDTA, (4) adição de OE associado com 0,2% (p/p) de polietilenoglicol e (5) adição de OE associado com 0,01% de EDTA e 0,2% de polietilenoglicol (ambos p/p). As unidades analíticas permaneceram sob refrigeração a 4°C por 48 horas antes de serem realizadas as análises microbiológicas e após diluição seriada os inóculos foram semeados em meio apropriado. A contagem total foi realizada por semeadura de superfície para aeróbios mesófilos (*Plate Count Agar* – Difco, 37°C/48hs), psicrotróficos (*Plate Count Agar* - Difco, 7°C/10 dias) e bolores e leveduras (*Potato Dextrose* - Difco, 25°C/3 a 5 dias) (Downes, 2001).

O experimento foi realizado em triplicata e os dados foram submetidos à ANOVA e teste de Tuckey utilizando o *software* SAS.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização química do OE de canela

O OE de canela apresentou densidade 1,0049g/ml e a composição química por CG-EM é mostrada na Fig. 1, sendo 89,58% dos compostos foram identificados e o cinamaldeído, seguido do acetato de cinamila e cineol foram os principais componentes. De acordo com Domadia et al. (2007), o efeito bactericida do cinamaldeído ocorre durante a divisão celular, interferindo na reação de agregação das proteínas *filamentation temperature sensitive protein Z* (FtsZ) e inibição da hidrólise de GTP necessária para a polimerização da FtsZ. A FtsZ é uma proteína procariótica homóloga da tubulina e regula a divisão celular através da formação do disco Z no plano de divisão celular. O cinamaldeído liga-se com a FtsZ perturba a formação citocinética do disco Z e inibe sua dinâmica de arranjo, consequentemente a divisão celular.

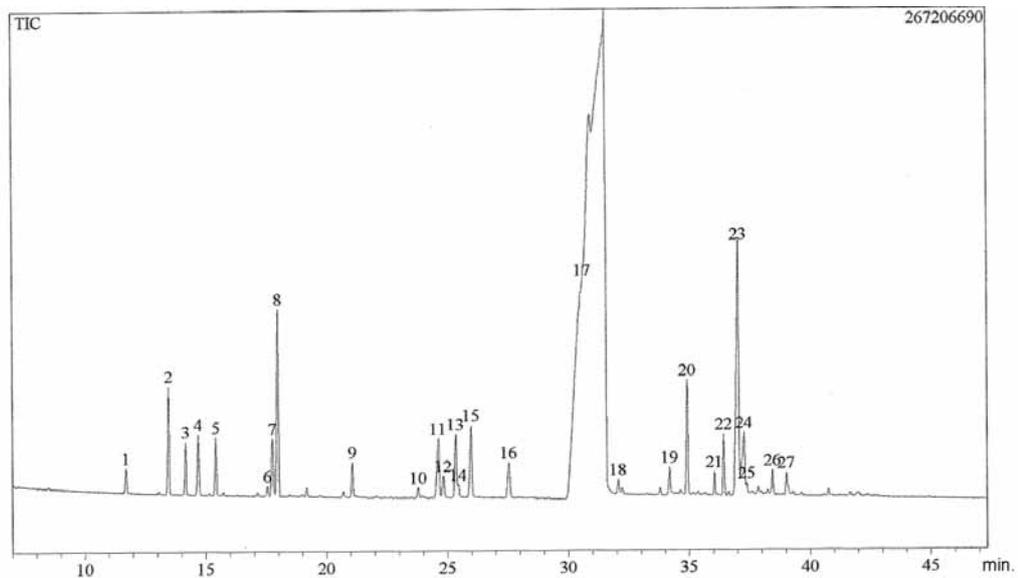


Fig. 1. Cromatograma obtido para o OE de canela utilizado na identificação de compostos através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM); 88,59% dos compostos foram identificados. 2: α -pineno (1,62%); 3: camphene (0,79%); 5: β -pineno (0,93%); 6: cymeno (0,17%); 7: limoneno (1,11%); 8: cineol (3,31%); 9: linalool (0,55%); 12: borneol (0,50%); 13: terpineno-4-ol (1,22%); 15: α -terpineno (1,43%); 17: cinamaldeído (67,58%); 19: eugenol (1,82%); 22: caryophylleno (0,88%); 23: acetato de cinamila (6,49%); 25: α -humuleno (0,19%).

3.2. Análise sensorial

A aceitação do iogurte pelos painelistas foi decrescendo com o aumento da concentração de OE de canela no alimento. De acordo com a Tabela 1, entre a menor concentração de OE de canela até 0,04% não houve diferença estatística ($p < 0,05$) e a média 6,28 para a concentração 0,04% foi equivalente ao *Gostei Ligeiramente* de acordo com a Escala Hedônica. Entretanto, para essa concentração a mediana foi igual a 7,00, explicando 50% dos dados referentes à opção *Gostei Moderadamente*.

Tabela 1

Análise de variância para a pontuação do iogurte e do queijo na avaliação sensorial através da Escala Hedônica.

Tratamentos		0,01%	0,02%	0,04%	0,06%	0,08%	0,1%	0,2%	0,4%
Iogurte (Canela)	Média	7,82 ^a ±	6,89 ^{ab} ±	6,28 ^{abc} ±	5,57 ^{bc} ±	4,57 ^{cd} ±	4,28 ^{cd} ±	2,61 ^{de} ±	1,92 ^e ±
		0,92	1,75	1,82	2,25	2,14	2,26	1,91	1,43
	Mediana	8	7,5	7	6	4,28	4	2	1
Queijo (Orégano)	Média	6,2 ^{ab} ±	6,26 ^{ab} ±	6,73 ^a ±	6,26 ^{ab} ±	5,96 ^{abc} ±	5,63 ^{abc} ±	4,8 ^{bc} ±	4,3 ^{bc} ±
		1,97	1,99	1,81	2,01	2,07	2,18	2,36	2,27
	Mediana	7	7	7	7	7	6	5	4
Queijo (Manjeriçã)	Média	7,1 ^a ±	6,66 ^{ab} ±	5,76 ^{abc} ±	5,66 ^{abc} ±	5,1 ^{cd} ±	5,23 ^{bcd} ±	4,03 ^{de} ±	2,56 ^e ±
		1,42	1,68	2,04	1,93	1,98	2,26	1,95	1,52
	Mediana	7	7	6	6,5	6	5,5	4	2

letras iguais na mesma linha indicam que as medianas são estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Embora estudos tenham mostrado a atividade antimicrobiana de OEs contra patógenos e deteriorantes quando adicionados em alimentos, as concentrações encontradas são elevadas e causam depreciação sensorial no produto. Assim, iniciando a avaliação com a concentração aceitável sensorialmente nós podemos trabalhar com opções tecnológicas que melhorem a atividade antimicrobiana dos OEs à baixa concentração.

3.3 Determinação da atividade antimicrobiana do OE de canela

A concentração de 0,04% de OE de canela foi estabelecida para verificar a ação antimicrobiana no iogurte e os resultados das contagens microbianas são mostrados na Tabela 2. De acordo com as contagens padrões com aeróbios mesófilos e bolores e leveduras não foi detectada redução de log para todos os tratamentos.

Tabela 2

Análise microbiológica para os diferentes tratamentos do iogurte com adição de óleo essencial (OE) de canela. Médias são expressas em UFC/ml.

Tratamentos	Mesófilos	Bolores e leveduras	Psicrotróficos
1: controle	$7,2 \times 10^3 \text{ abc} \pm 635,0$	$3,3 \times 10^2 \text{ bc} \pm 57,7$	$<100 \text{ a} \pm 0,0$
2: OE de canela	$7,4 \times 10^3 \text{ ab} \pm 1113,5$	$3,3 \times 10^2 \text{ bc} \pm 57,7$	$<100 \text{ a} \pm 0,0$
3: OE de canela + EDTA	$6,0 \times 10^3 \text{ bc} \pm 550,7$	$7,0 \times 10^2 \text{ a} \pm 200,0$	$<100 \text{ a} \pm 0,0$
4: OE de canela + polietilenoglicol	$5,4 \times 10^3 \text{ c} \pm 351,2$	$2,4 \times 10^2 \text{ c} \pm 72,1$	$<100 \text{ a} \pm 0,0$
5: OE de canela + EDTA + polietilenoglicol	$8,5 \times 10^3 \text{ a} \pm 871,8$	$5,3 \times 10^2 \text{ ab} \pm 57,7$	$<100 \text{ a} \pm 0,0$

letras iguais na mesma coluna indicam que as medianas são estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

O OE de canela isolado e combinado com o EDTA e EDTA + polietilenoglicol não foi efetivo para reduzir a contagem de mesófilos, mas a associação do OE de canela com polietilenoglicol diferenciou estatisticamente da contagem do tratamento com o EO isolado, em virtude da média desse tratamento ter apresentado um valor mais elevado que o controle e maior variação. De acordo com Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (2001), a ação dispersante do polietilenoglicol pode ter possibilitado maior contato do óleo com as células, promovendo sinergismo. Enquanto que a ação quelante do EDTA nos cátions presentes na membrana citoplasmática aumenta a ação desestabilizante do OE, causando morte celular por lise. Entretanto, a associação do OE de canela com os coadjuvantes testados aqui, EDTA e polietilenoglicol, não teve efeito redutor e a média apresentou-se acima da média obtida para o tratamento controle. Esse mesmo comportamento foi observado nas contagens de bolores e leveduras.

O tratamento com o OE de canela isolado não reduziu a contagem de bolores e leveduras, mas no tratamento do OE com o polietilenoglicol possibilitou uma pequena redução, apesar de não apresentar diferença estatística. No entanto, o OE de canela associado com EDTA somente e com polietilenoglicol, tratamentos 3 e 5 respectivamente, proporcionou maior desenvolvimento desses micro-organismos, um efeito contrário observado para as bactérias mesófilas. O tratamento de OE associado com EDTA apresentou a média da contagem de bolores e leveduras superior aos tratamentos controle e adição de EO isolado, com diferença estatística.

Tzortzakis (2009) observou redução no desenvolvimento de colônias de *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger in vitro* quando utilizou 25ppm de OE de canela na fase vapor e houve

redução na produção de esporos acima de 63% das placas cultivadas e quando uma concentração de 100ppm foi empregada, a germinação de esporos de *A. Níger* foi acelerada.

Com relação à contagem microbiana de psicrotróficos não foi verificado crescimento na diluição 10^{-1} , sendo considerado o valor menor que 100 UFC/ml, tanto nos tratamentos quanto no controle. Deve-se considerar que as análises foram realizadas após 48 horas da preparação do produto e esse período em que permaneceram refrigeradas não foi suficiente para o desenvolvimento dos possíveis psicrotróficos contaminantes.

4. Conclusões

A concentração de 0,04% de OE de canela, a máxima aceita sensorialmente no iogurte, pode ser comparada com as CIMs utilizadas nos estudos *in vitro*, mas nessa concentração não foi detectada atividade antimicrobiana no iogurte com significância estatística e a presença de polietilenoglicol como coadjuvante reduziu as contagens de aeróbios mesófilos e bolores e leveduras. No entanto, há grandes desafios tecnológicos para adequar a concentração de OE que não deprecie a característica sensorial do alimento e exerça a sua propriedade antimicrobiana.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Christian Hansen-Brasil pelo apoio através da doação da cultura *starter*.

6. Referências bibliográficas

Adams, R.P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy**. San Diego: Academic Press, INC., 1989. 302p.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils- a review. **Food Chemical International & Toxicology**, Cambridge, v.46, n.2, p.446-475, Feb., 2008.

Barbosa, L.N.; Rall, V.L.M.; Fernandes, A.A.H.; Ushimaru, P.I.; Probst, I.S.; Fernandes Júnior, A. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v.6, n.6, p.725-728, Jul./Aug. 2009.

Barceloux, D.G. Cinnamon (*Cinnamomum* Species). **Disease Month**, Cambridge, v.55, n.6, p.327-335, Jun. 2009.

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

Busatta, C.; Mossi, A.J.; Rodrigues, A.R.M.; Cansian, R.L.; Oliveira, J.V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38, n.1, p.610-616, Jan./Mar. 2007.

Busatta, C.; Vidal, R.S.; Popiolski, A.S.; Mossi, A.J.; Dariva, C.; Rodrigues, M.R.A.; Corazza, F.C.; Corazza, M.L.; Oliveira, J.V.; Cansian, R.L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, Cambridge, v.25, n.1, p.207-211, Feb. 2008.

Domadia, P.; Swarup, S.; Bhunia, A.; Sivaraman, J.; Dasgupta, D. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. **Biochemical Pharmacology**, Cambridge, v.74, n.6, p.831-840, Sep. 2007.

Downes, F.P. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 2nd edition. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

Fonseca, P.; Librand, A.P.L. Evaluation of physico-chemical and phytochemical characteristics of different tinctures of barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). **Brazilian Journal of Pharmacology Science**, São Paulo, v.44, n.2, p.271-277, Apr./Jun. 2008.

Goñi, P.; López, P.; Sánchez, C.; Gómez-Luz, R.; Becerril, R.; Nerín, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, Cambridge, v.116, n.4, p.982-989, July/Sep. 2009.

Gutierrez, J.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, Cambridge, v.124, n.1, p.91-97, May 2008.

Gutierrez, J.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, Cambridge, v.26, n.2, p.142-150, Apr. 2009.

Kim, H.O.; Park, S.-W.; Park, H.H.-D. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot. **Food Microbiology**, Cambridge, v.21, n.1, p.105-110, Feb. 2004.

Lanciotti, R.; Gianotti, A.; Patrignani, F.; Belletti, N.; Guerzoni, M. E.; Gardini, F. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.15, n.3-4, p.201-208, Mar./Apr. 2004.

Moosavy, M.H.; Basti, A.A.; Misahi, A.; Salehi, T.Z.; Abbasifar, R.; Mousavi, H.A.E.; Alipour, M.; Razavi, N.E.; Gandomi, H.; Noori, N. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. **Food Research International**, Cambridge, v.41, n.10, p.1050-1057, Dec. 2008.

Munõz, M.; Guevara, L.; Palop, A.; Tabera, J.; Fernández, P. S. Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria monocytogenes* in broth and food systems using flow cytometry. **LWT – Food Science and Technology**, Cambridge, v.42, n.1, p.220-227, Oct./Dec. 2009.

Nuryastuti, T.; Mei, H. C.; Busscher, H.J.; Irvati, S.; Aman, A.T.; Krom, B. P. Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.75, n.21, p.6850-6855, Nov. 2009.

Ojagh, S.M.; Rezaei, M.; Razavi, S.H.; Mohamad, S.; Hosseini, H. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, Cambridge, v.120, n.1, p.193-198, May 2010.

Poste, L.M.; Mackie, D.A.; Butler, G.; Larmond, E. **Laboratory methods for sensory analysis of food**. Ottawa: Canada Communication Group, 1991. 89p.

Prabuseenivasan, S.; Jayakumar, M.; Ignacimuthu, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v.6, n.39, p.39, Nov. 2006.

Singh, G.; Maurya, S.; DeLampasona, M.P.; Catalan, C.A.N. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and

their constituents. **Food and Chemical Toxicology**, Cambridge, v.45, n.9, p.1650-1661, Sep. 2007.

Smith-Palmer, A.; Stewart, J.; Fyfe, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, Cambridge, v.18, n.4, p.463-470, Aug. 2001.

Tzortzakis, N.G. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Cambridge, v.10, n.1, p.97-102, Jul./Sep. 2009.

Wong, S.Y.Y.; Grant, I.R.; Friedman, M.; Elliott, C.T.; Situ, C. Antibacterial activities of naturally occurring compounds against. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.74, n.19, p.5986-5990, Oct. 2008.

CAPÍTULO 3

Artigo submetido em 14 de janeiro de 2011 ao periódico Brazilian Journal of Microbiology e apresentado conforme as normas da revista.

EFEITO INIBITÓRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA *Lactobacillus rhamnosus* E CULTURA *STARTER* EM LEITE FERMENTADO DURANTE O PERÍODO DE *SHELF-LIFE*

Cristiane Mengue Feniman^{1*}, Vera Lúcia Mores Rall², Margarida Júri Saeki³, Ary Fernandes Júnior²

¹Departamento de Tecnologia, Campus Regional de Umuarama, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama-PR, Brasil

²Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil

³Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil

*Autor para correspondência: tel./fax +55 044 36219317

E-mail: crisfeniman@yahoo.com.br

Resumo

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OEs) desperta grande interesse na aplicação em alimentos em função da ação antagonista para micro-organismos patogênicos. Entretanto, ressalta-se que em alimentos probióticos a ação bacteriostática ou bactericida dos OEs é indesejável para bactérias benéficas. O *Lactobacillus rhamnosus* faz parte do grupo de bactérias do ácido láctico e é utilizado em produtos funcionais, isolado ou juntamente com uma cultura *starter*. Objetivou-se verificar o perfil de sensibilidade do *L. rhamnosus* e cultura *starter* de iogurte em leite fermentado com adição de OE de canela, cravo e menta. Os OEs

foram preparados via destilação com arraste por vapor d'água e caracterizados quimicamente por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM) e obtenção das respectivas densidades. As contagens bacterianas foram realizadas, visando traçar a curva de sobrevivência de *L. rhamnosus* e cultura *starter* (isolados e associados) através da adição de OEs na concentração de 0,04% (v/v), considerada como a máxima aceitável organolepticamente através de análise sensorial previamente, em amostras de leite fermentado. Paralelamente foi acompanhada a acidez titulável durante os 28 dias de experimentação. Também foram determinados os respectivos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos OEs utilizando a metodologia da microdiluição em meio *Brain Heart Infusion* (BHI), sendo que os valores obtidos foram 0,025, 0,2 e 0,4% (v/v), respectivamente para OEs de canela, cravo e menta. Verificou-se que o OE de canela apresentou maior atividade antimicrobiana, principalmente contra a cultura *starter*, interferindo na produção de ácido láctico. As contagens de células viáveis de *L. rhamnosus* foram menores em relação aos controles nos tratamentos com os três OEs, mas não foram diferentes estatisticamente, mantendo-se acima da contagem mínima de 10^6 UFC/ml necessária para que o produto seja considerado probiótico. Nesse caso, a aplicação do OE de canela em iogurte inviabiliza a fermentação da cultura *starter*, mas não desfavorece a aplicação do *L. rhamnosus* em leite fermentado probiótico. Além disso, os OEs de cravo e menta causaram *stress* subletal para o *L. rhamnosus*.

Palavras-chave: *L. rhamnosus*, cultura *starter*, óleos essenciais, leite fermentado.

1. Introdução

A viabilidade das células probióticas é o fator mais importante a ser observado durante o desenvolvimento de alimentos probióticos, sendo ele dependente de outros fatores secundários, como ótimo crescimento e sobrevivência durante o processamento do alimento, estocagem do produto, trânsito no trato gastrointestinal, adesão ao epitélio intestinal, propriedades antimicrobianas e resistência antibiótica (21).

Além das propriedades funcionais, os micro-organismos probióticos devem apresentar características tecnológicas que permitam a produção em larga escala e que possam ser incorporados em produtos alimentícios sem perda da viabilidade e funcionalidade (16).

Os principais gêneros bacterianos considerados probióticos são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo esses incorporados nos alimentos isoladamente ou associados. De acordo com a legislação brasileira, para produzir efeito benéfico as bactérias probióticas

devem estar viáveis e com concentração entre 10^8 e 10^9 UFC/g de produto e seu consumo deve ser associado com uma dieta balanceada e estilo de vida saudável (2). Diversas propriedades funcionais associadas com o *Lactobacillus rhamnosus* têm sido reportadas na literatura, incluindo: efeito antiobesidade (18), colonização do trato gastrointestinal (15, 17), aumento da imunidade (22), diminuição de distúrbios inflamatórios do intestino (5) e efeitos anticarcinogênicos (13).

Entretanto, a fermentação do leite por uma ou mais espécies probióticas requer um longo período de incubação e a qualidade do produto resultante é inferior sensorialmente, sendo esses os principais fatores para que normalmente se produza produtos probióticos associados com a cultura *starter* do iogurte. Tradicionalmente o iogurte é obtido por fermentação da cultura *starter* composta por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (22).

Um dos principais fatores que afetam a viabilidade das bactérias probióticas é a competição com outros micro-organismos contaminantes. Assim, é importante garantir a inativação de células indesejáveis, mas sem interferir no desenvolvimento de bactérias benéficas (16).

A adição de óleos essenciais (OE) com ação antimicrobiana desperta grande interesse na aplicação em alimentos em função da ação antagonista para micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Entretanto, se faz importante verificar se essa ação ocorre contra células probióticas em alimentos funcionais. Desse modo, esse trabalho objetivou determinar a atividade antimicrobiana dos OEs de canela, cravo e menta (na concentração máxima aceita, baseada em análise sensorial prévia) contra o *L. rhamnosus* e cultura *starter*, durante o período de *shelf life* de leite fermentado. Além disso, ensaios *in vitro* foram realizados para obter a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos em estudo.

2. Material e métodos

2.1. Óleos essenciais (OEs) e análise química por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM)

Os OEs de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cravo (*Syzygium aromaticum* L.) e menta (*Mentha piperita* L.) foram extraídos por arraste de vapor em destilador para produção de OEs (modelo MA480 - Marconi) e suas densidades foram obtidas pesando-se o volume de 1ml (10). A caracterização química foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM) (modelo QP5050A - Shimazu), no qual foi utilizada uma coluna capilar CBP-5 de 50m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25mm e 0,25 μ m de

espessura do filme. A temperatura do injetor foi de 250°C, a temperatura da interface foi de 250°C, o detector foi operado em modo *Electron Impact* (EI) a 70eV e utilizou-se hélio como gás de arraste. As condições cromatográficas para o OE de canela foram temperatura inicial de 60°C, aquecimento até 160°C, com taxa de 3°C.min⁻¹, aquecimento até 220°C a uma taxa de 15°C.min⁻¹ e manutenção dessa temperatura por 20 minutos. Para o OE de cravo a temperatura inicial foi de 50°C, aquecimento até 180°C, com taxa de 3°C.min⁻¹, e manutenção dessa temperatura por 40 minutos. E para o OE de menta a temperatura inicial foi de 70°C, aquecimento até 240°C, com taxa de 4°C.min⁻¹ e manutenção dessa temperatura por 20 minutos. A identificação dos componentes dos OEs foi feita com base na biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology, MD,USA) para análise dos espectros de massas e também nos dados da literatura (10).

2.2. Concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios de sensibilidade foram realizados em triplicata para cada óleo em estudo utilizando a metodologia da microdiluição em microplacas de ELISA (6) dos óleos em meio *Brain Heart Infusion* (BHI-Difco) mais 0,5% de Tween 80, tendo sido preparadas as concentrações 0,025, 0,04, 0,06, 0,08, 0,10, 0,20, 0,40, 0,80, 1,00, 1,50 e 2,00 (%v/v) em volumes finais de 200µl. Foram realizados ensaios controles positivos (bactéria mais meio de cultura) e negativos (meio de cultura) e controle da esterilidade dos OEs (meio mais óleos). O inóculo bacteriano foi padronizado em solução salina 0,85% estéril na escala 0,5 de MacFarland, obtendo suspensão bacteriana ao redor de 1,5x10⁸UFC/mL, a partir de cultura incubada a 37°C/48horas. Foram inoculados volumes de 2µL da suspensão bacteriana padronizada, obtendo assim no volume de 200µL uma contagem inicial ao redor de 10⁵ UFC/ml. Após incubação a 35°C/24h, procedeu-se a leitura dos ensaios com adição de indicador redox (resazurina 0,01%), sendo que a coloração azul final em cada concentração indicava resultado negativo e a coloração rosa resultado positivo para o crescimento bacteriano. Nesse caso, a CIM foi considerada aquela em que não houve crescimento bacteriano após o período de incubação.

2.3. Análise sensorial para o iogurte contendo OE de canela

Foram utilizados 28 painelistas não treinados, de ambos os sexos e com idade entre 20 e 50 anos. Foi aplicado o teste da Escala Hedônica com 9 pontos, os quais variaram entre as opções *Gostei Extremamente* e *Desgostei Extremamente* (20). Este estudo foi aprovado pelo

Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista e foi realizado de acordo com os padrões éticos estabelecidos em 1964 na Declaração de Helsinki.

Iogurte foi obtido por inoculação de leite pasteurizado com *Thermophilic Yoghurt Culture Yo-Flex*® (Christian Hansen-Brazil), sendo então incubado a 42°C até que foi formado 0,80% de ácido láctico, seguido de homogeneização com 20% (p/v) de polpa de fruta, preparada com banana *in natura*, e 10% (p/v) de açúcar. Os tratamentos foram estabelecidos com a adição de OE de canela nas concentrações 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2 e 0,4% (p/p).

Após 48 horas do processamento, duas sessões de análise sensorial foram realizadas para evitar fadiga sensorial dos painelistas, sendo estas entre 09:00 e 11:00 e a outra entre 15:00 e 17:00 horas, sendo que em cada período foram servidas quatro amostras do alimento com concentrações intercaladas

2.4. Curva de sobrevivência para *L. rhamnosus* e para a cultura starter

Como o iogurte é um produto lácteo preparado com leite pasteurizado, adaptou-se esse modelo alimentar para a base láctea de leites fermentados. A base láctea foi esterilizada para garantir a fermentação apenas pelos micro-organismos que foram empregados nos ensaios. Assim, como meio de crescimento dos micro-organismos, e tratamentos, foram preparados frascos contendo 200ml de leite desnatado reconstituído a 12% (p/v) e adicionado de 10% (p/v) de açúcar, representando a base láctea do iogurte ou de leites fermentados (Ferreira, 2001). Os frascos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos e resfriado a 42°C. A linhagem de *L. rhamnosus* ATCC 9595 foi obtida da coleção de micro-organismos de referência da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro – Brasil). O inóculo bacteriano foi obtido em Caldo *Soy Trypticase* (TSB) após incubação a 35°C/48h, seguido de obtenção de suspensão padronizada na escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em solução salina 0,85% estéril. Dessa suspensão foram tomados volumes de 1ml e adicionados diretamente nos frascos, resultando em uma concentração inicial nos frascos do alimento ao redor de $7,5 \times 10^5$ UFC/ml.

Como cultura *starter* para iogurte foi utilizada a cultura liofilizada *Thermophilic Yoghurt Culture Yo-Flex*® (Christian Hansen-Brasil), sendo ativada previamente na concentração de 10g/L por fermentação durante 42°C/4horas. Como inóculo foi utilizado 1ml de cultura ativada, o qual apresentou concentração final de 0,05g/L, conforme recomendação do fabricante.

A concentração dos OEs utilizados na curva de sobrevivência foi de 0,04% (v/v), determinada previamente com a análise sensorial feita com o OE de canela adicionado a

iogurte com polpa de banana e que foi considerada ideal para não depreciar as características do produto e inviabilizá-lo para o consumo. O mesmo tipo de ensaios foi aplicado para os OEs de cravo e menta para as contagens do *L. rhamnosus* na curva de sobrevivência, para que fosse possível comparação entre os tratamentos com ao menos três diferentes OEs. A concentração utilizada para ambos OEs foi a mesma utilizada para o OE de canela.

Os tratamentos preparados foram os seguintes: 1) controle (sem adição de OE) LR para o *L. rhamnosus*; 2) tratado LR + 0,04% canela OE; 3) tratado LR + 0,04% cravo OE; 4) tratado LR + 0,04% menta OE; 5) controle CS para a cultura *starter*; 6) tratado CS + 0,04% canela OE; 7) tratado CS + 0,04% cravo OE; 8) tratado + 0,04% menta OE; 9) controle LR-CS para o *L. rhamnosus* + cultura *starter*; 10) tratado LR-CS + 0,04% canela OE; 11) tratado LR-CS + 0,04% cravo OE; e 12) tratado LR-CS + 0,04% menta OE.

2.4.1. Contagem de células viáveis

Após a adição dos inóculos nos substratos para os micro-organismos probiótico e cultura *starter*, foi feita a adição dos OEs nos respectivos frascos tratamentos já descritos, e estes foram mantidos em banho de água à 42°C/7h, seguido da incubação a ±4°C em refrigerador, permanecendo nessa temperatura até o final do experimento, ou seja, durante 28 dias.

Para a contagem de células viáveis, as superfícies foram semeadas em duplicatas em em placas de Petri com meio de cultura *Agar Soy Trypticase (TSA)* enriquecido com 1% de extrato de levedura (6) nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 21, 37, 55, 73, 176 (7 dias), 344 (14 dias), 512 (21 dias) e 680 (28 dias) horas, a partir de diluições seriadas de cada tratamento e respectivos controles. O período de incubação para contagem bacteriana foi de 35°C/48h.

É importante salientar que nos tratamentos em que havia mistura ou associação de *L. rhamnosus* com a cultura *starter*, foi possível realizar as contagens individuais para ambas as bactérias, uma vez que as colônias apresentavam características morfológicas distintas (Fig. 1), sendo que as colônias de *L. rhamnosus* se mostravam circulares, uniformes, brancas e brilhantes enquanto as colônias da cultura *starter* apresentam-se ovulares, não uniformes, transparentes e opacas. Ambas apresentaram diâmetro de aproximadamente 1 milímetro cada.

Desta forma, para os tratamentos de 9 a 12 foram efetuadas duas contagens em cada placa, totalizando assim 16 conjuntos de leitura do número de células viáveis (Tabela 1).

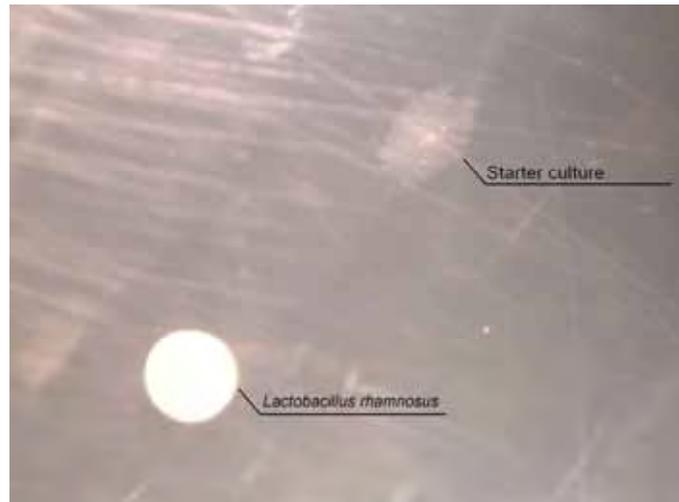


Figura 1. Colônias de *Lactobacillus rhamnosus* e cultura starter de iogurte.

Tabela 1

Descrição dos tratamentos e contagens para obtenção dos dados da contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* e cultura starter durante a curva de sobrevivência.

Contagem	Tratamentos	Descrição
1	1	Controle LR (<i>L. rhamnosus</i>)
2	2	Tratado LR + 0,04% OE de canela
3	3	Tratado LR + 0,04% OE de cravo
4	4	Tratado LR + 0,04% OE de menta
5	5	Controle CS (cultura <i>starter</i>)
6	6	Tratado CS + 0,04% OE de canela
7	7	Tratado CS + 0,04% OE de cravo
8	8	Tratado CS + 0,04% OE de menta
9	9	Controle LR + CS (contagem apenas de <i>L. rhamnosus</i>)
10	9	Controle LR + CS (contagem apenas de cultura <i>starter</i>)
11	10	Tratado LR + CS + 0,04% OE de canela (contagem apenas de <i>L. rhamnosus</i>)
12	10	Tratado LR + CS + 0,04% OE de canela (contagem apenas de cultura <i>starter</i>)
13	11	Tratado LR + CS + 0,04% OE de cravo (contagem apenas de <i>L. rhamnosus</i>)
14	11	Tratado LR + CS + 0,04% OE de cravo (contagem apenas de cultura <i>starter</i>)
15	12	Tratado LR + CS + 0,04% OE de menta (contagem apenas de <i>L. rhamnosus</i>)
16	12	Tratado LR + CS + 0,04% OE de menta (contagem apenas de cultura <i>starter</i>)

2.4.2. Acidez titulável

A análise de acidez titulável foi realizada nos tempos 0, 3, 5, 7, 176 (7 dias) e 680 (28 dias) horas. Procedeu-se a retirada asséptica de alíquotas de 10ml para cada tratamento. Foram adicionados 100ml de água destilada e procedeu-se a titulação com solução Dornic (NaOH N/9). O volume gasto de NaOH foi expresso em graus Dornic (°D) (4).

2.4.3. Análise estatística

Os resultados da análise sensorial foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, e a concentração máxima aceitável sensorialmente de OE de canela em iogurte foi considerada a que teve uma pontuação mínima igual a 7,0, equivalente ao *Gostei Moderadamente*.

Foi aplicado o teste de Friedman e comparação das medianas pelo método de Dunn para os dados obtidos em ambas as análises de contagem de células viáveis e de acidez titulável.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização química dos OEs

O OE de canela apresentou densidade 1,0049g/ml e sua composição química por CG-EM são mostradas na Fig. 1, sendo que 89,58% dos compostos foram identificadas e o cinamaldeído, seguido pelo acetato de cinamil e cineol, foram os componentes majoritários.

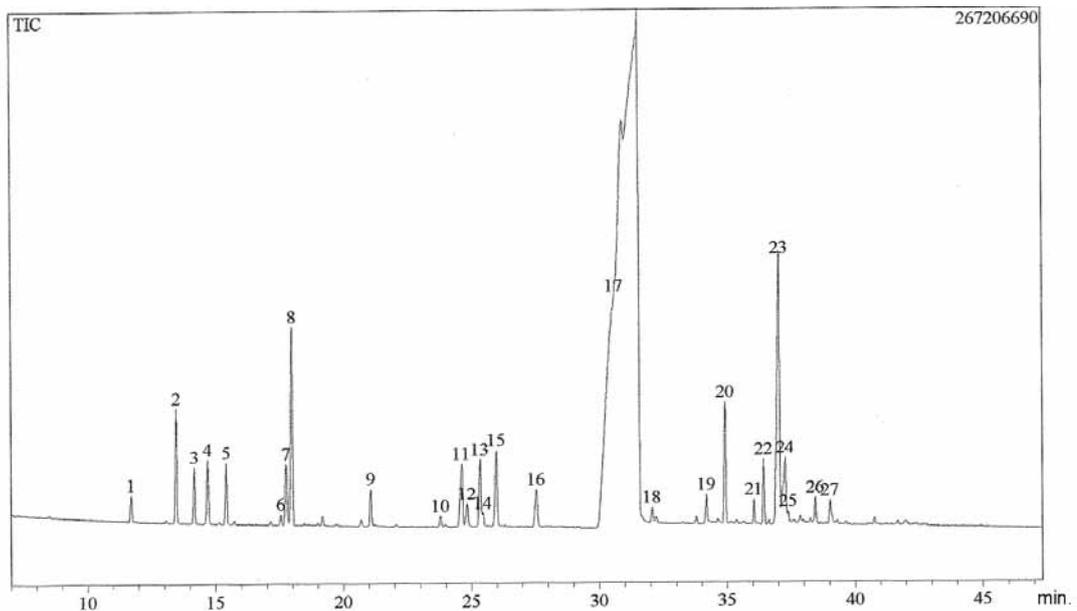


Figura 2. Cromatograma obtido para o OE de canela utilizado na identificação de compostos através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM); 88,59% dos compostos foram identificados. 2: α -pineno (1,62%); 3: camphene (0,79%); 5: β -pineno (0,93%); 6: cymeno (0,17%); 7: limoneno (1,11%); 8: cineol (3,31%); 9: linalool (0,55%); 12: borneol (0,50%); 13: terpineno-4-ol (1,22%); 15: α -terpineno (1,43%); 17: cinamaldeído (67,58%); 19: eugenol (1,82%); 22: caryophylleno (0,88%); 23: acetato de cinamila (6,49%); 25: α -humuleno (0,19%).

No OE de cravo, com densidade de 1,0121g/ml e respectivo cromatograma (Fig. 2), verificou-se que 99,66% dos compostos foram identificados, sendo o eugenol e acetato de eugenol os principais componentes encontrados. O OE de menta, densidade de 0.8830g/ml, apresentou 76,72% dos compostos identificados (Fig. 3) com mentona e pulegona como componentes majoritários.

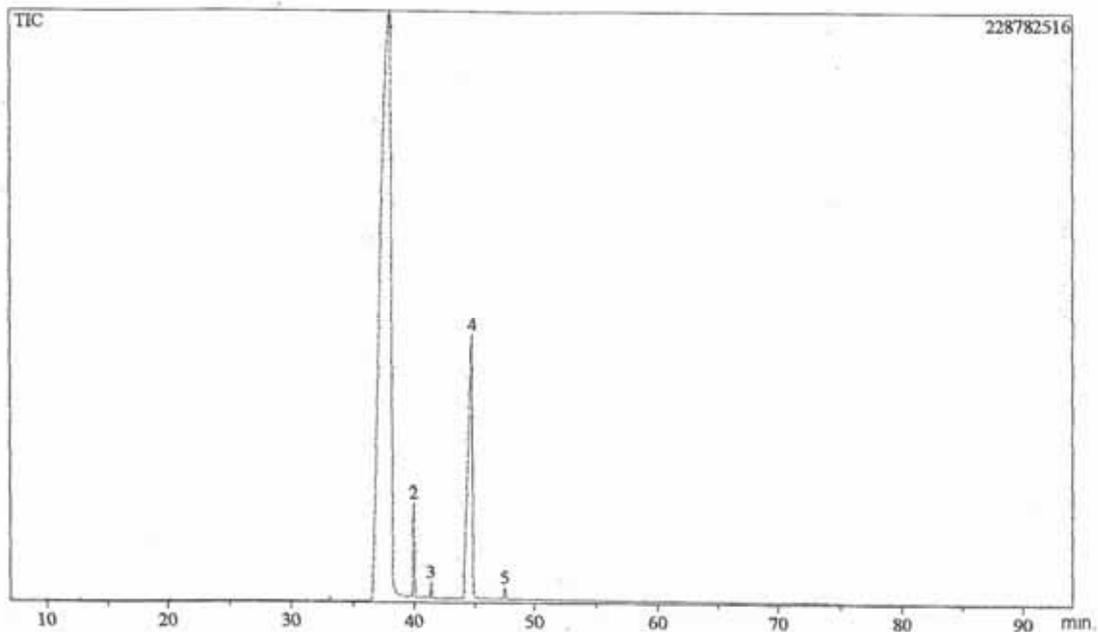


Figura 3. Cromatograma obtido para o OE de cravo utilizado na identificação de compostos através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM); 99,66% dos compostos foram identificados. 1: eugenol (77,58%); 2: trans-cariofileno (2,68%); 3: α -humuleno (0,57%); 4: acetato de eugenol (18,83%).

3.2. Concentração inibitória mínima (CIM)

De acordo com o método de microdiluição, a CIM é definida como a menor concentração necessária para inibir o crescimento microbiano visível. A leitura por turvação ou indicador redox resazurina são os meios mais utilizados para determinar a obtenção e visualização do valor da CIM, sendo que a resazurina apresenta como vantagem o fato de não precipitar e permitir uma leitura direta (7). A leitura da CIM por resazurina não evidenciou crescimento microbiano em qualquer concentração testada do OE de canela, sendo assim estabelecido o valor de 0,025%v/v como a CIM para esse OE, enquanto que para o OE de cravo a CIM foi de 0,2%v/v e para o OE de menta foi de 0,4%v/v.

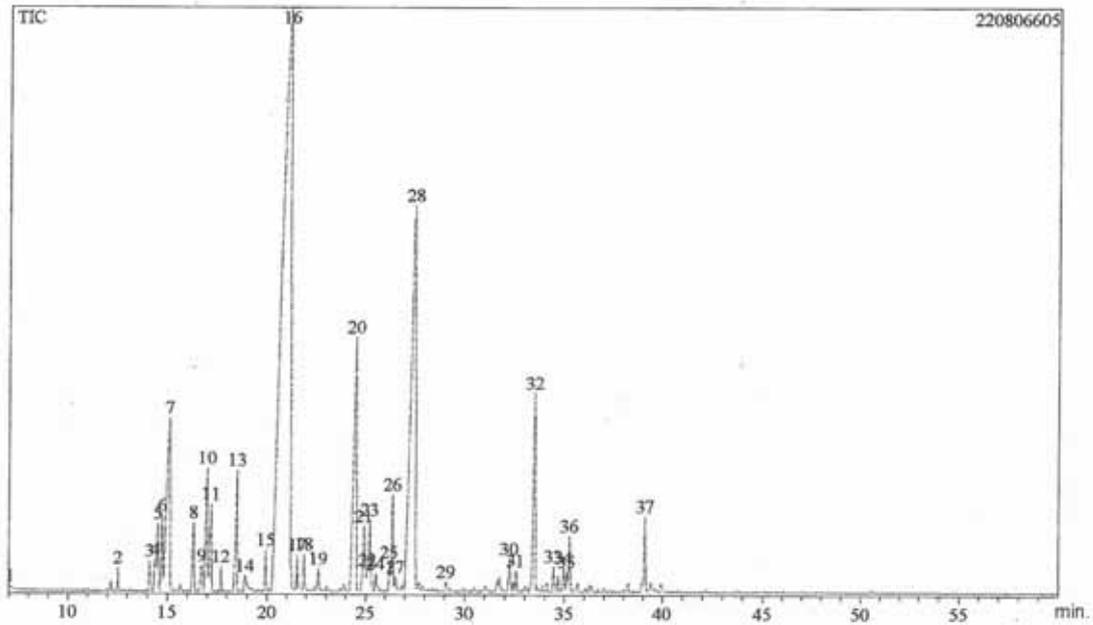


Figura 4. Cromatograma obtido para o OE de menta utilizado na identificação de compostos através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM); 76,72% dos compostos foram identificados. 3: α -pineno (0,41%); 5: 3-octanono (1,16%); 7: 3-octanol (5,73%); 10: limoneno (2,19%); 11: 1,8-cineol (1,40%); 16: mentona (43,10%); 28: pulegona (19,19%); 32: cariofileno (3,25%); 33: α -cariofileno (0,29%).

Para outras bactérias Gram positivas foram encontrados os valores de CIM de 0,05% para o OE de canela para *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (19). A CIM do OE de cravo foi de 0,25% e do OE de menta foi de 1,0% para *S. aureus* (12). Goñi et al. (11) relataram que para o OE de canela os valores de CIM na fase vapor foram de 18mg/L para *Bacillus cereus*, 54mg/L para *L. monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*, e 36mg/L para *S. aureus* enquanto para o OE de cravo os valores de CIM foram 18mg/L para *Bacillus cereus* e *L. monocytogenes*, 90mg/L para *Enterococcus faecalis* e 27mg/L para *S. aureus*.

3.3. Análise sensorial

Verificou-se que a aceitação do iogurte pelos painelistas (Tabela 2) foi decrescendo em função do aumento da concentração de OE de canela no alimento. Assim, entre a menor concentração de OE de canela até 0,04% não houve diferença estatística a 5% e a média 6,28 de aceitação para a concentração 0,04% foi equivalente ao *Gostei Levemente* da Escala Hedônica, mas para essa concentração a mediana foi igual a 7,00, explicando 50% dos dados referentes à opção *Gostei Moderadamente*. Assim, considerou-se a concentração de 0,04% como a máxima aceitável sensorialmente.

A concentração de 0,04% foi maior que a CIM do OE de canela verificado para o *L. rhamnosus*. Entretanto, essa concentração foi inferior a CIM do OE de cravo e menta. Embora atividade bactericida tenha sido detectada *in vitro* nas concentrações menores que 0,1% de OEs (23), concentrações de 0,5 a 1,0% de OEs foram necessárias para inibir com êxito a contaminação de alimentos (24).

Tabela 2

Medianas para a contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* e cultura *starter* e acidez titulável.

Tratamentos	Descrição das Contagens Microbianas	Log	°D
1	1: Controle LR (<i>L. rhamnosus</i>)	8,15 ^{abc}	29,5 ^b
2	2: Tratado LR + OE de canela	7,02 ^{bc}	25 ^b
3	3: Tratado LR + OE de cravo	7,87 ^{abc}	31 ^{ab}
4	4: Tratado LR + OE de menta	7,91 ^{abc}	32 ^{ab}
5	5: Controle CS (cultura <i>starter</i>)	9,99 ^a	55 ^a
6	6: Tratado CS + OE de canela	4,73 ^c	28 ^b
7	7: Tratado CS + OE de cravo	8,45 ^{ab}	52 ^a
8	8: Tratado CS + OE de menta	8,48 ^{ab}	51 ^a
9	9: Controle LR + CS (apenas <i>L. rhamnosus</i>)	9,13 ^a	55 ^a
9	10: Controle LR + CS (apenas cultura <i>starter</i>)	10,23 ^a	-
10	11: Tratado LR + CS + OE de canela (apenas <i>L. rhamnosus</i>)	6,98 ^{bc}	26 ^b
10	12: Tratado LR + CS + OE de canela (apenas cultura <i>starter</i>)	<1,00 ^c	-
11	13: Tratado LR + CS + OE de cravo (apenas <i>L. rhamnosus</i>)	7,93 ^{abc}	45 ^a
11	14: Tratado LR + CS + OE de cravo (apenas cultura <i>starter</i>)	8,76 ^{ab}	-
12	15: Tratado LR + CS + OE de menta (apenas <i>L. rhamnosus</i>)	7,93 ^{abc}	49 ^a
12	16: Tratado LR + CS + OE de menta (apenas cultura <i>starter</i>)	8,61 ^{ab}	-

letras iguais na mesma coluna indicam que as medianas são estatisticamente iguais (p<0,05).

Assim evidenciou-se a necessidade de buscar alternativas tecnológicas que favoreçam a ação antimicrobiana dos OEs quando aplicados nos alimentos em baixa concentração, como efeito sinérgico entre os OEs ou com outras tecnologias de conservação. Contudo, é importante assegurar que essa concentração não tenha ação sobre bactérias benéficas, para o caso de aplicação de OEs em produtos com finalidade probiótica.

3.4. Curva de sobrevivência do *L. rhamnosus* e cultura *starter*

O *L. rhamnosus* não produziu ácido láctico significativamente para alcançar as características tecnológicas na fabricação de iogurte ou outros produtos lácteos fermentados, tornando necessário associar essa bactéria com a cultura *starter* do iogurte (22). Os dados da mediana para a acidez na Tabela 2 mostraram que a acidez titulável nos tratamentos que continham somente o *L. rhamnosus* não houve diferença significativa com o controle LR. Nos

tratamentos LR com OE de cravo e menta (tratamentos 3 e 4) observou-se um pequeno aumento em relação ao controle LR. No entanto, para o tratamento 2, LR com OE de canela, a acidez se manteve próxima da acidez inicial (Fig. 4).

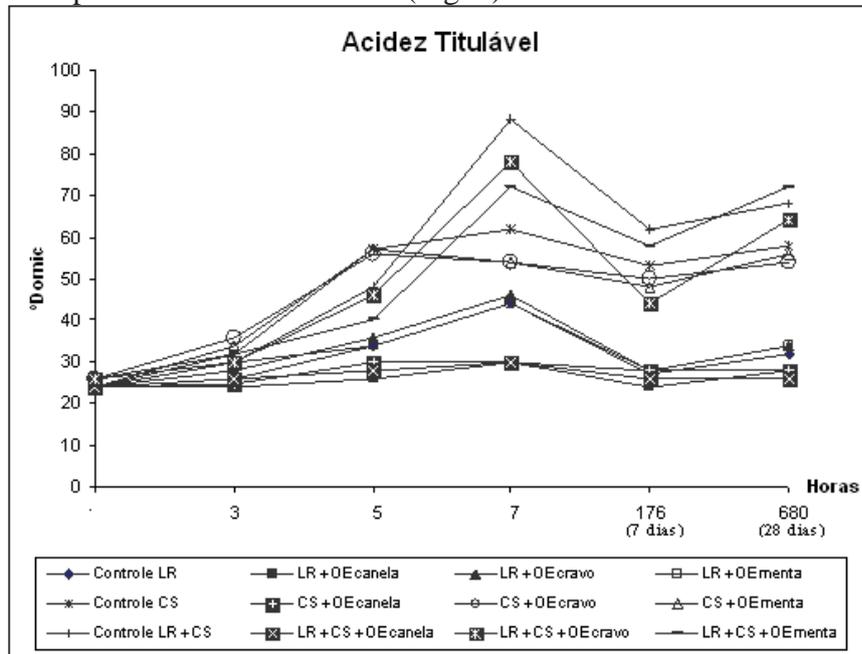


Figura 5. Determinação da acidez titulável em °Dornic durante fermentação e estocagem de leite fermentado com cultura starter (CS) de iogurte e *L. rhamnosus* (LR). Tratamentos com adição de 0,04% de óleos essenciais (EOs).

A acidez titulável foi significativamente maior nos tratamentos em que havia apenas a cultura *starter* de iogurte, inclusive nos tratamentos em que foram adicionados os OEs de cravo e menta. Entretanto, os tratamentos com adição de cultura *starter* e OE de canela (tratamentos 6 e 11) a acidez se manteve próxima do tratamento controle LR, em que continha somente o *L. rhamnosus*, mostrando uma inativação da cultura *starter* pelo OE de canela.

Os comportamentos do *L. rhamnosus* e da cultura *starter* para a produção de ácido láctico podem ser relacionados também de acordo com a contagem de células viáveis (Tabela 2). Apesar de não ter ocorrido diminuição significativa no Log de UFC/mL entre as contagens LR com adição dos OEs e a contagem controle LR, observou-se uma diminuição mais acentuada, aproximadamente 1 Log, no tratamento em que foi adicionado o OE de canela. Em relação à cultura *starter*, contagem 6 (CS tratado com OE de canela), verificou-se uma redução acentuada de aproximadamente 5 Log. Quanto as contagens 7 e 8 (CS tratado com OE de cravo e menta, respectivamente) houve uma queda de aproximadamente 1,5 Log, mas não foi estatisticamente significativa.

Para os tratamentos contendo OE de canela (contagens 11 e 12) houve uma diminuição de 2,15 Log para a contagem de *L. rhamnosus* (tratamento 11) em relação ao controle (tratamento 9) e a mediana para a cultura *starter* foi considerada menor que 10 UFC/ml, até mesmo na diluição 10^{-1} semeada após 7 horas de incubação (Fig 5).

De acordo com as Fig. 6 e 7, verificou-se que ao final do experimento para a curva de sobrevivência, as contagens referentes a *L. rhamnosus* e cultura *starter*, quando tratados com OEs de cravo e menta, foram inferiores as contagens controles 9 e 10, respectivamente, porém, em todo o período de experimentação os dois OEs mostraram comportamentos similares.

As medianas das contagens de células viáveis da cultura *starter* mantiveram a redução aproximada 1,5 Log, como ocorreu nos tratamentos nas contagens 7 e 8 em relação ao controle CS (contagem 5). Entretanto, o *L. rhamnosus* apresentou maior sensibilidade aos OEs de cravo e menta quando associado à cultura *starter*, pois houve redução de aproximadamente 1 Log, valor este superior à redução observada nas contagens 3 e 4 em relação ao controle LR (contagem 1), que foram de 0,28 e 0,24 Log para os OEs de cravo e menta, respectivamente.

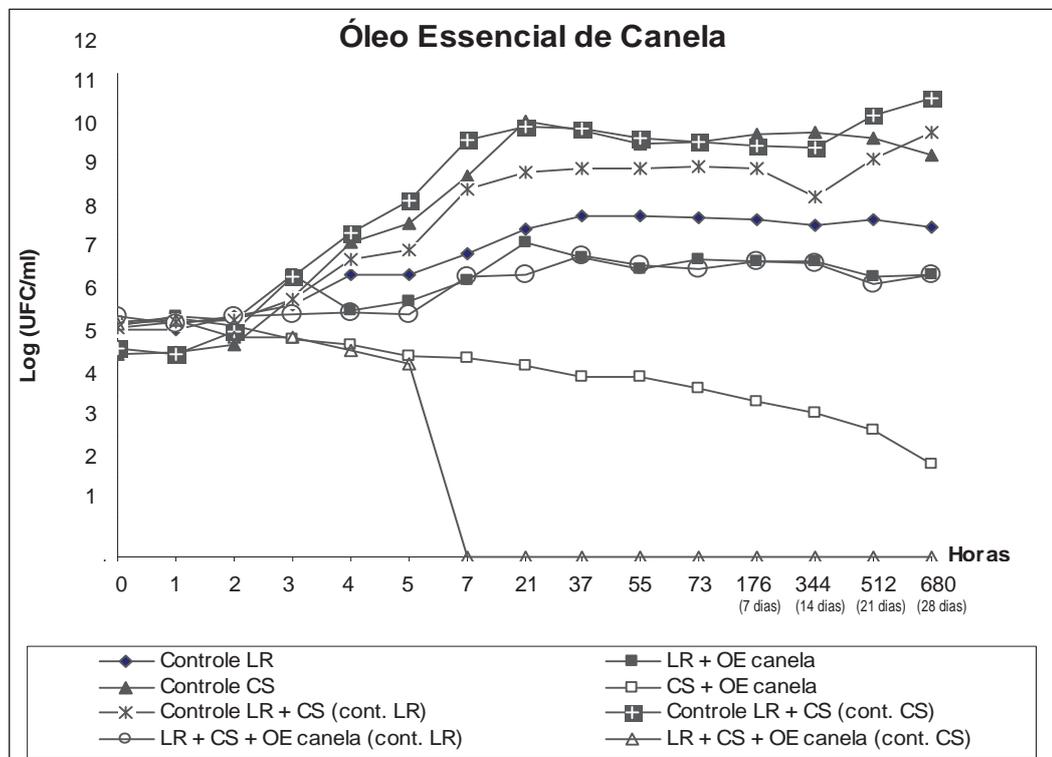


Figura 6. Contagem de células viáveis durante fermentação e estocagem de leite fermentado com cultura *starter* (CS) de iogurte e *L. rhamnosus* (LR). Tratamentos com adição de 0,04% de OE de canela.

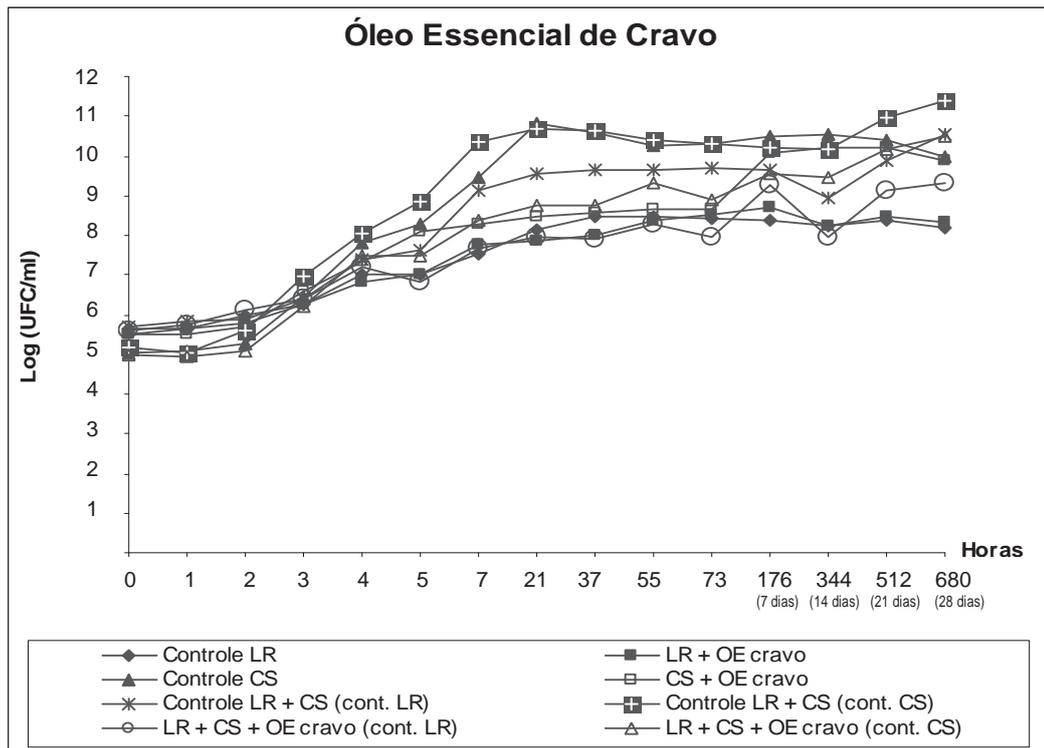


Figura 7. Contagem de células viáveis durante fermentação e estocagem de leite fermentado com cultura starter (CS) de iogurte e *L. rhamnosus* (LR). Tratamentos com adição de 0,04% de OE de cravo.

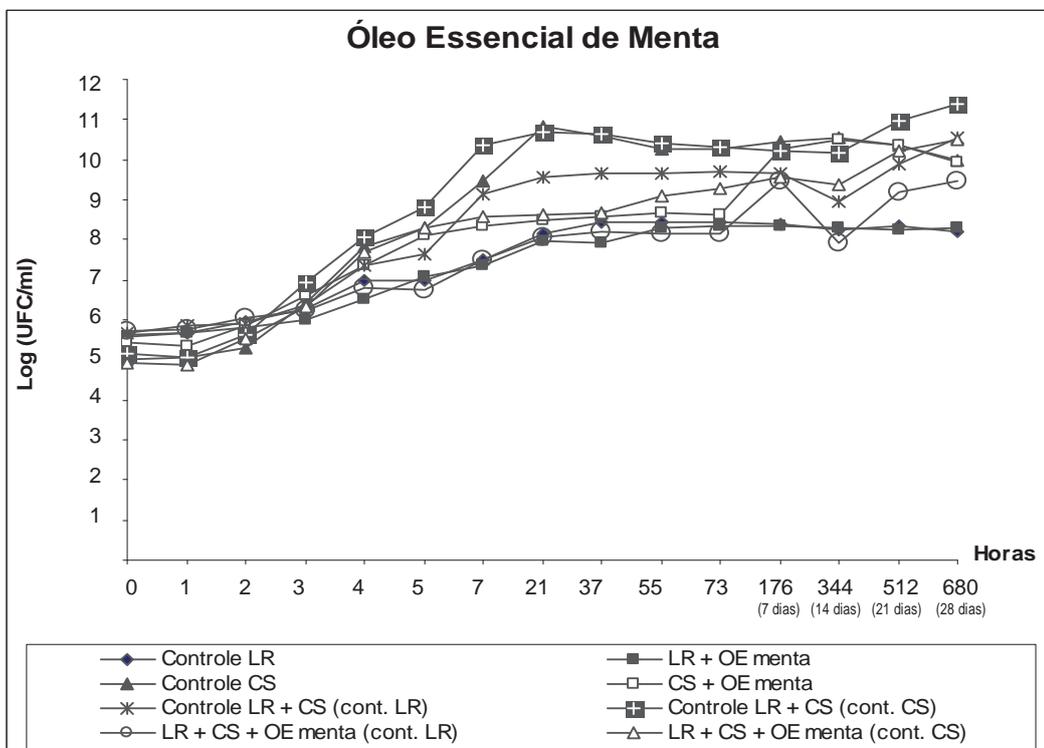


Figura 8. Contagem de células viáveis durante fermentação e estocagem de leite fermentado com cultura starter (CS) de iogurte e *L. rhamnosus* (LR). Tratamentos com adição de 0,04% de EO de menta.

Com exceção das contagens 6 (CS + OE de canela) e 12 (contagem da cultura *starter* em LR + CS + OE de canela), todas as contagens com adição 0,04% de OEs de canela, cravo e menta, apresentaram o aumento mínimo de 2 Log no final dos 28 dias da curva de sobrevivência. Hekmat *et al.* (14) observaram durante 28 dias, em iogurte adicionado desse probiótico, sendo a fermentação conduzida juntamente com *L. delbreukii* ssp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*. Após um dia de estocagem a 4°C verificaram contagem de 5×10^7 UFC/ml para *L. rhamnosus*, enquanto no final do estudo a contagem foi de 4×10^7 UFC/ml para a mesma bactéria.

Lacroix e Yildirim (16) reportaram que a melhoria na sobrevivência e funcionalidade dos probióticos é possível com o uso de novas tecnologias de fermentação, como por exemplo, a fermentação contínua, biorreatores de membranas, células imobilizadas, encapsulamento celular e aplicações de estresse subletal durante a produção celular, aumentando a resistência das células para condições de stress ambiental durante a produção, estocagem e digestão.

Desse modo, os OEs de cravo e menta podem ter proporcionado um estresse subletal para a produção celular, pois a porcentagem 0,04% desses OEs adicionados nos tratamentos foi inferior as respectivas CIM verificadas nos ensaios *in vitro* (0,2% e 0,4% para os OEs de cravo e menta, respectivamente), permitindo uma fase de adaptação verificada nas primeiras 3 horas em que houve estabilidade nas contagens de células viáveis, seguida de uma fase de propagação celular nas primeiras 24 horas, mantendo as contagens estáveis até o final de 28 dias.

Relatos mostraram também que há necessidade de concentrações mais elevadas de OEs em relação às CIM obtidas *in vitro* para exercerem ação antimicrobiana quando aplicados diretamente nos alimentos (3, 24). No entanto, o OE de canela apresentou maior atividade antimicrobiana na concentração 0,04% que OEs de cravo e menta, mesmo sendo uma concentração próxima a CIM obtida em condições *in vitro*, o que possibilitou ação significativa do OE de canela sobre a cultura *starter* quando aplicado no sistema alimentar e determinação da curva de sobrevivência. Entretanto, a contagem do *L. rhamnosus* isolado tratado com OE de canela apresentou redução de 1 Log, mantendo-se acima da contagem mínima de 10^6 UFC/ml que é preconizado como indispensável para que o produto seja considerado probiótico. Nesse caso, a aplicação do OE de canela em leite fermentado inviabiliza a fermentação da cultura *starter*, mas não desfavorece a aplicação do *L. rhamnosus* em leite fermentado probiótico.

4. Conclusões

A aplicação de OEs em alimentos deve considerar a ação antimicrobiana sobre bactérias probióticas e cultura *starter*, micro-organismos desejáveis tecnologicamente na obtenção dos produtos. A concentração máxima aceitável sensorialmente de OEs no iogurte neste estudo foi menor que as CIM verificadas para os OEs de cravo e menta. Assim, um efeito subletal foi observado desses OEs sobre *L. rhamnosus* e cultura *starter*, sendo que a utilização dos mesmos não prejudicou o processo fermentativo durante a elaboração do alimento lácteo e favoreceu a resistência desses micro-organismos. No entanto, a CIM do OE de canela foi inferior à concentração testada e teve efeito significativo na redução da contagem da cultura *starter*, interferindo em menor produção de ácido láctico. No entanto, o comportamento do *L. rhamnosus* foi o mesmo para os OEs de canela, cravo e menta.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Christian Hansen-Brasil pelo apoio através da doação da cultura *starter*.

6. Referências bibliográficas

1. Adams, R.P. (1989). *Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy*. Academic Press, INC., San Diego, California.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brazil). *Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos VIII - Lista dos Novos Alimentos aprovados*. 2008. Available on: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_alimentos.htm. Access on: Jan. 14, 2011.
3. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microb.* 94 (3), 223-253.

4. Case, R.A.; Bradley Jr., R.L.; Williams, R.R. (1992). Chemical and physical methods. In: *American Public Health Association. Standard methods for the examination of dairy products*. 15. ed. New York, 327-404.
5. Chiu, Y.-H.; Hsieh, Y.-J.; Liao, K.-W.; Peng, K.-C. (2010). Preferential promotion of apoptosis of monocytes by *Lactobacillus casei rhamnosus* soluble factors. *Clin. Nutr.*, 29 (1), 131-140.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute / National Comitee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS). (2005). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth information supplement. CLSI/NCCLS document M 100-S15*. Wayne, PA.
7. Cos, P.; Vlietinck, A.J.; Berghe, D.V.; Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.* 106 (3), 290-302.
8. Downes, F.P. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 2nd edition. Washington, DC: American Public Health Association.
9. Ferreira, C.L.L.F. (2001). *Produtos lácteos fermentados - aspectos bioquímicos e tecnológicos*. Editora UFV, Viçosa, MG.
10. Fonseca, P.; Librand, A.P.L. (2008). Evaluation of physico-chemical and phytochemical characteristics of different tinctures of barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Braz. J. Pharm. Sci.* 44 (2), 271-277.
11. Goñi, P.; López, P.; Sánchez, C.; Gómez-Luz, R.; Becerril, R.; Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.* 116 (4), 982-989.
12. Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. App. Microb.* 86 (6), 985-990.

13. Hatakka, K.; Holma, R.; El-Nezami, H.; Suomalainen, T.; Kuisma, M.; Saxelin, M.; Poussa, T.; Mykkänen, H.; Korpela, R. (2008). The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. *Int. J. Food Microb.*, 128 (2), 406-410.
14. Hekmat, S.; Soltani, H.; Reid, G. (2009). Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yogurt for use as a functional food. *Inn. Food Sci. Emerg. Techn.* 10 (2), 293-296.
15. Henryk, S.; Chmielarczyk, A.; Strus, M.; Pejcz, J.; Jawien, M.; Kochan, P.; Heczko, P.B. (2006). Colonisation of the gastrointestinal tract by probiotic *L. rhamnosus* strains in acute diarrhoea in children. *Dig. Liver Dis.*, 38 (Suppl. 2), S274-S276.
16. Lacroix, C.; Yildirim, S. (2007). Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Curr. Opin. Biotechn.* 18 (2), 176-183, 2007.
17. Lam, E.K.Y.; Yu, L.; Wong, H.P.S.; Wu, W.K.K.; Shin, V.Y.; Tai, E.K.K.; So, W.H.L.; Woo, P.C.Y.; Cho, C.H. (2007). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats. *Eur. J. Pharm.*, 565 (3), 171-179.
18. Lee, H.-Y.; Park, J.-H.; Seok, S.-H.; Baek, M.-W.; Kim, D.-J.; Lee, K.-E.; Paek, K.-S.; Lee, Y.; Park, J.-H. (2006). Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Bioch. Bioph. Acta*, 1761 (7), 736-744.
19. Oussalah, M.; Caillet, S.; Saucier, L.; Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 18 (5), 414-420.
20. Poste, L.M.; Mackie, D.A.; Butler, G.; Larmond, E. (1991). Laboratory methods for sensory analysis of food. Canada Communication Group, Ottawa, Canada.

21. Ranadheera, R.D.C.S.; Baines, S.K.; Adams, M.C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.* 43 (1), 1-7.
22. Shah, N.P. (2007). Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* 17 (11), 1262-1277, 2007.
23. Smith-Palmer, A.; Stewart, J.; Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. App. Microb.* 26 (2), 118-122.
24. Smith-Palmer, A.; Stewart, J.; Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microb.* 18 (4), 463-470.

CAPÍTULO 4

Artigo submetido em 01 de janeiro de 2011 ao periódico *Natural Products Research*, aceito em 15 de maio de 2011 e apresentado conforme as normas da revista.

Enumeração celular e visualização por microscopia eletrônica de transmissão do *Lactobacillus rhamnosus* tratado com óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

C.M. Feniman^{1*}, V.L.M. Rall², J.T. Doyama³, A. Fernandes Júnior²

¹*Departamento de Tecnologia, Campus Regional de Umuarama, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama-PR, Brasil*

²*Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil*

³*Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil*

(Received XX Month Year; final version received XX Month Year)

*Autor Correspondente: tel./fax +55 44 36219300 - E.mail: crisfeniman@yahoo.com.br; V. L. M. Rall: vlmr@ibb.unesp.br; J. T. Doyama: julio@ibb.unesp.br; A. Fernandes Júnior: ary@ibb.unesp.br

Enumeração celular e visualização por microscopia eletrônica de transmissão do *Lactobacillus rhamnosus* tratado com óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

Resumo

A aplicação de óleos essenciais (OEs) em alimentos funcionais que contenham micro-organismos probióticos deve considerar a atividade antimicrobiana que esses óleos exerceram contra bactérias benéficas, como o *Lactobacillus rhamnosus*. Este estudo objetivou avaliar a sensibilidade da cultura de *L. rhamnosus* quando tratada com OE de canela, através de contagem de células viáveis e visualização celular por microscopia eletrônica de transmissão. A concentração de 0,04% desse óleo exerceu atividade bacteriostática durante a incubação de 2 horas, apresentando alterações leves na estrutura celular, mas foi considerada bactericida por possibilitar uma redução significativa após 24 horas. Já a concentração de 1,00% reduziu 3 log após 2 horas de incubação e não foi detectada contagem de células viáveis após 24 horas. As observações por microscopia eletrônica de transmissão revelaram que as células tratadas com 1,00% de OE de canela foram drasticamente danificadas, apresentando rupturas da membrana celular e extravasamento citoplasmático. Essas observações revelam-se negativas para o uso de OEs em alimentos probióticos, já que é indesejável a ação bactericida contra o *L. rhamnosus*.

Palavras-chave: óleos essenciais; alimentos probióticos; *Lactobacillus rhamnosus*.

1. Introdução

Os óleos essenciais (OEs) são constituídos por um complexo de compostos voláteis caracterizados por um forte odor e são formados por plantas aromáticas como metabólitos secundários. São conhecidos por suas propriedades antisépticas, bactericidas, fungicidas, antivirais e propriedades medicinais (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008).

Os OEs também possuem aplicação em alimentos, como o OE de canela que é utilizado como flavorizante aromatizante e conservante natural. A ação antimicrobiana desse óleo foi verificada contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, apresentando Concentração Inibitória Mínima em 90% das amostras (CIM_{90%}) igual a 0,047% e 0,09% (v/v), respectivamente (Silva, Ushimaru, Barbosa, Cunha, & Fernandes Júnior, 2009).

Aplicações tecnológicas dos OEs como agentes antimicrobianos naturais para redução de micro-organismos patogênicos veiculados em alimentos requerem o estabelecimento das condições para a sua aplicação, como sensibilidade do patógeno ao OE, concentração ótima e tempo de contato entre o óleo e o patógeno (Moreira, Ponce, Del Valle, & Roura, 2005). A maior área de interesse da aplicação dos OEs é a inibição do crescimento e redução de importantes patógenos veiculados em alimentos, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* (Burt, 2004).

Entretanto, a aplicação dos OEs em alimentos funcionais deve considerar um efeito antimicrobiano indesejável contra as bactérias probióticas. Para realizar efeitos benéficos, as bactérias probióticas devem estar viáveis e em concentração mínima de 10⁸ UFC/g de produto (ANVISA, 2011).

Os principais gêneros bacterianos utilizados como probióticos são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo esses incorporados nos alimentos isoladamente ou associados (Shah, 2007), sendo diversas propriedades funcionais associadas com o lactobacilo Gram positivo *L. rhamnosus*.

O *L. rhamnosus* PL60 foi capaz de produzir ácido linoléico conjugado c12 em camundongos obesos por dieta induzida. Após 8 semanas de alimentação, o *L. rhamnosus* reduziu o peso corporal e causou uma redução significativa no tecido adiposo, produzindo um efeito anti-obesidade (Lee et al., 2006).

Um estudo para avaliar a colonização do trato gastrointestinal por *L. rhamnosus* em crianças entre 2 meses e 6 anos de vida, com diarreia aguda com duração de no máximo 5 dias, mostrou que as linhagens de *L. rhamnosus* foram detectadas em 37 de 46 crianças (80,43%) após 5 dias e em 19 crianças (41,3%) após 14 dias após o início do tratamento (Henryk et al., 2006).

A doença inflamatória intestinal (DII) é caracterizada por densas infiltrações e deficiente apoptose das células da mucosa. *Lactobacillus rhamnosus* produziu proteínas solúveis de 5-30kDa que promoveram apoptose de células imunes sem afetar as células epiteliais intestinais, sugerindo a prevenção da IBD através de dieta suplementada com probióticos (Chiu, Hsieh, Liao, & Peng, 2010).

O *L. rhamnosus* GG foi associado com a intensificação de células secretoras de anticorpos específicos de IGA para rotavírus e foi reportado por ser mais efetivo no tratamento da diarreia por esse vírus do que preparações contendo apenas a cultura starter de iogurte (Shah, 2007).

As enzimas bacterianas β -glucosidase, β -glucuronidase e urease podem contribuir no desenvolvimento do câncer de colo por gerar carcinógenos. Uma redução na atividade dessas enzimas por bactérias lácticas é considerada um efeito benéfico. Durante a administração de *L. rhamnosus* LC705 juntamente com *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS em homens saudáveis durante quatro semanas, houve redução na atividade da β -glucosidase em 10% e na atividade da urease em 13%, em relação ao placebo. As contagens fecais dessas bactérias aumentaram significativamente no final do estudo (Hatakka et al., 2008).

Diante dos efeitos benéficos verificados pela ação do *L. rhamnosus*, salienta-se a importância de preservar a integridade celular dessa bactéria em produtos funcionais que sejam de interesse para a aplicação de OEs como conservantes. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a sensibilidade da cultura de *L. rhamnosus* quando tratada com OE de canela, através de enumeração de células viáveis e visualização celular por microscopia eletrônica de transmissão.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção do OE de canela e análise química por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM)

O OE de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) foi extraído por arraste de vapor em destilador para produção de OEs (modelo MA480 - Marconi). Foi determinada a densidade do óleo pesando-se o volume de 1ml (Fonseca & Librandi, 2008). A caracterização química foi realizada em espectrômetro de massas acoplado em cromatógrafo gasoso (CGMS) (modelo QP5050A - Shimadzu), no qual foi utilizada uma coluna capilar CBP-5 de 50m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25mm e 0,25 μ m de espessura do filme. A temperatura do injetor foi de 250°C, a temperatura da interface foi de 250°C, o detector foi

operado em modo electron impact (EI) a 70eV e utilizou-se He como gás de arraste. As condições cromatográficas para o OE de canela foram temperatura inicial de 60°C, aquecimento até 160°C, com taxa de 3°C.min⁻¹, aquecimento até 220°C a uma taxa de 15°C.min⁻¹ e manutenção dessa temperatura por 20min. A identificação dos componentes do óleo essencial foi feita com base na biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology, MD,USA) para análise dos espectros de massas e também nos dados da literatura (Adams, 1989).

2.2. Preparação das culturas

Para o tratamento da cultura de *L. rhamnosus* com o OE de canela foi realizada uma adaptação do método descrito por Moosavy et al. (2008).

A linhagem de *L. rhamnosus* ATCC 9595 foi obtida da coleção de micro-organismos de referência da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro – Brasil). Foi previamente inoculada em meio de *Tryptic Soy Broth* (TSB-Difco) e placas de *Tryptic Soy Agar* (TSA-Difco) e incubada a 35°C/48h para verificação de pureza e viabilidade. Após este período, uma alçada da cultura foi inoculada em 3ml de meio BHI e incubado novamente a 35°C/48h. A escolha dos meios foi baseada nos dados submetidos por Bujalance, Jiménez-Valera, Moreno & Ruiz-Bravo (2006), no quais linhagens isoladas de *L. plantarum*, *L. casei* e *L. fermentum* e outras bactérias selecionadas mostraram maior quantidade de células viáveis em meio TSA enriquecido quando comparado com MRS ágar.

Após incubação, a cultura obtida foi adicionada de OE de canela em duas concentrações extremas, além do tratamento controle. A menor concentração foi de 0,04%, estipulada pela metodologia da microdiluição em microplacas de ELISA dos óleos em meio *Brain Heart Infusion* (BHI-Difco) mais 0,5% de Tween 80, tendo sido preparadas as concentrações 0,025, 0,04, 0,06, 0,08, 0,10, 0,20, 0,40, 0,80, 1,00, 1,50 e 2,00 (%v/v) em volumes finais de 200µl. Foram realizados ensaios controles positivos (bactéria mais meio de cultura) e negativos (meio de cultura) e controle da esterilidade dos OEs (meio mais óleos). O inóculo bacteriano foi padronizado em solução salina 0,85% estéril na escala 0,5 de MacFarland, obtendo suspensão bacteriana ao redor de 1,5x10⁸UFC/mL, a partir de cultura obtida após 37°C/48horas. Foram inoculados volumes de 2µL da suspensão bacteriana padronizada, obtendo assim no volume de 200µL um contagem inicial ao redor de 10⁵ UFC/ml. Após incubação a 35°C/24h, procedeu-se a leitura dos ensaios com adição de indicador redox (resazurina 0,01%), sendo que a coloração azul final em cada concentração indicava resultado negativo e a coloração rosa resultado positivo para o crescimento

bacteriano. Nesse caso, a CIM foi considerada aquela em que não houve crescimento bacteriano após o período de incubação (CSLI/NCCLS, 2005).

Como maior concentração estabeleceu-se 1,00%, por ser necessária uma concentração acima do CIM para exercer efeito antimicrobiano em modelos alimentares, conforme observações de Smith-Palmer, Stewart, & Fyfe (2001), em que concentrações de 0,50 a 1,00% dos OEs estudados foram necessárias para inibir com êxito a contaminação de alimentos.

As culturas tratadas com o OE de canela e o tratamento controle permaneceram em temperatura ambiente, (aproximadamente 25°C) por duas horas. Foram realizadas três replicatas destinadas à contagem de células viáveis e uma replicata para a análise de microscopia eletrônica.

2.3. Contagem de células viáveis

Foram preparadas diluições seriadas a partir de 10^{-2} de cada tratamento e controle, sendo a primeira diluição preparada com alíquotas de 0,1ml retiradas antes do momento de adição do OE, após as 2h de contato com o óleo e quando finalizou 24h de contato com o óleo.

A partir das diluições procederam-se as sementeiras em superfície para contagens de células viáveis em placas de Petri com meio de cultura TSA (Difco) enriquecido com 1% de extrato de levedura. No tratamento com 1,00% de OE de canela procedeu-se a sementeira com 0,1ml de cultura diretamente nas placas com meio de cultura para efeito de contagem em função da atividade antimicrobiana intensa desse óleo relatada na literatura.

As placas foram incubadas a 35°C/48h e realizada a contagem de unidades formadoras de colônia, expressas como Log (UFC/ml) (Downes, 2001).

Os valores obtidos na contagem de células viáveis foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tuckey utilizando o software SAS.

2.4. Microscopia eletrônica de transmissão

Após as duas horas em que a cultura permaneceu em contato com o OE de canela, para as replicatas das análises de microscopia eletrônica procedeu-se o preparo das amostras a partir da adaptação do método apresentado por Moosavy et al. (2008). Foi realizado um pré-fixamento pela adição de 3ml de fixador glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M (PBS, pH 7,2) durante 24h. As culturas foram então centrifugadas a 1500g por 20 minutos para formação de *pellets*. O sobrenadante obtido foi descartado e sobre os *pellets* formados foram adicionados mais 3ml de fixador preparado com solução de glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3), permanecendo por 24 horas a 4°C. O material recebeu tratamento de

pós-fixação em solução de tetróxido de osmium 1% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3), permanecendo 2 horas, sendo então desidratado em série crescente de acetona e embebido em Araldite®. Seções ultrafinas foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram analisadas e fotografadas com microscópio eletrônico de transmissão (CM 100, Philips).

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização química do OE de canela

O OE de canela apresentou densidade 1,0049g/ml e sua composição química por CG-EM é mostrada na Figura 1, sendo que 89,58% dos compostos foram identificadas, destacando-se o cinamaldeído como componente majoritário (67,58%), seguido pelo acetato de cinamila (6,49%).

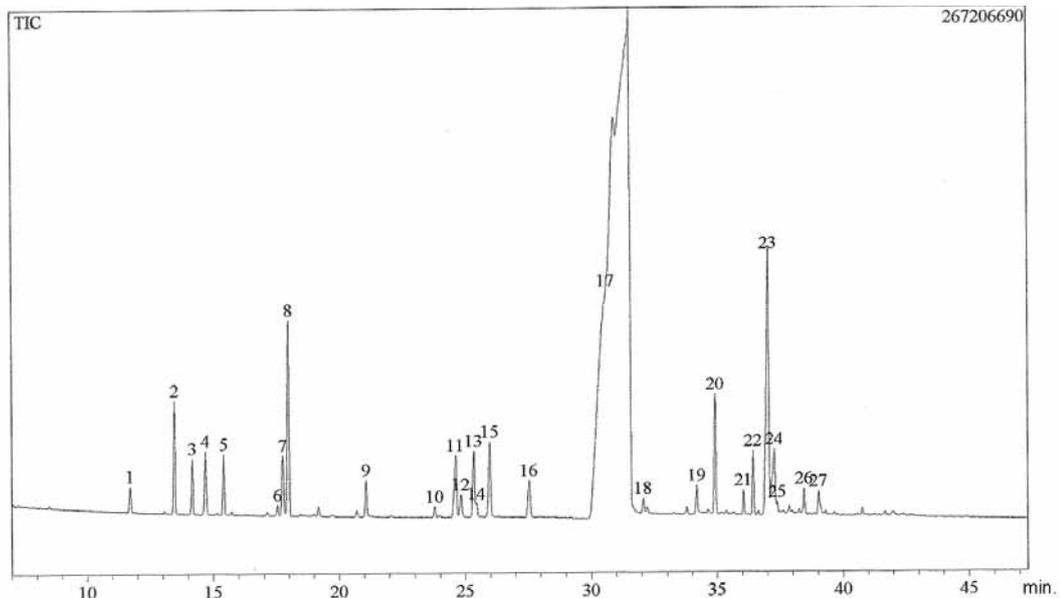


Figura 1. Cromatograma obtido para o OE de canela utilizado na identificação de compostos através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM); 88,59% dos compostos foram identificados. 2: α -pineno (1,62%); 3: camphene (0,79%); 5: β -pineno (0,93%); 6: cymeno (0,17%); 7: limoneno (1,11%); 8: cineol (3,31%); 9: linalool (0,55%); 12: borneol (0,50%); 13: terpineno-4-ol (1,22%); 15: α -terpineno (1,43%); 17: cinamaldeído (67,58%); 19: eugenol (1,82%); 22: caryophylleno (0,88%); 23: acetado de cinamila (6,49%); 25: α -humuleno (0,19%).

O perfil químico dos óleos essenciais mostrou-se como uma complexa mistura de componentes que pode variar quantitativamente e qualitativamente de acordo com o clima, composição do solo, idade e ciclo vegetativo da planta. São caracterizados por dois ou três compostos considerados como majoritários, quando apresentam porcentagens entre 20 e 70%

(Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008). Prabuseenivasan, Jayakumar, & Ignacimuthu (2006) encontraram 52,4% de cinamaldeído no OE de canela e Chang et al. (2001) determinaram 76% de cinamaldeído em OE de canela extraído de folhas, mas apenas 0,51% de acetato de cinamila.

3.2. Contagem de células viáveis

As contagens realizadas nos tempos 0, 2 e 24 horas após o contato do óleo com a cultura de *L. rhamnosus* apresentam-se na Tabela 1.

Inicialmente a cultura controle apresentou a contagem de células viáveis menor que as contagens dos tratamentos com 0,04% e 1,00% de OE de canela. Após 2 horas houve aumento de aproximadamente 3 log, enquanto que o tratamento com 0,04% de OE de canela praticamente se manteve estável e o tratamento com 1,00% de óleo apresentou redução de 3 log.

Tabela 1. Contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* após o tratamento da cultura com óleo essencial (OE) de canela.

Tempo (h)	Descrição	Log
0	Controle	8,67 ^d ± 0,33
	Tratado com 0,04% de OE	9,38 ^{bc} ± 0,16
	Tratado com 1,00% de OE	9,84 ^b ± 0,06
2	Controle	11,48 ^a ± 0,28
	Tratado com 0,04% de OE	9,27 ^c ± 0,09
	Tratado com 1,00% de OE	6,88 ^e ± 0,06
24	Controle	9,29 ^c ± 0,21
	Tratado com 0,04% de OE	4,32 ^f ± 0,09
	Tratado com 1,00% de OE	<1,00 ^g ± 0,00

letras iguais na mesma coluna indicam que as medianas são estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Após 24 horas a cultura controle teve um decréscimo na contagem, aproximando-se do valor referente ao tempo 0. Já o tratamento com 0,04% de OE de canela observou-se uma redução significativa de 5 log em relação aos tempos 0 e 2 horas. Mesmo apresentando apenas ação bacteriostática após 2 horas de contato, o OE de canela em concentração referente ao CIM demonstrou ser bactericida após 24 horas, demonstrando que o tempo de contato entre

bactéria e o OE é um dos fatores para a efetividade da atividade antimicrobiana dos OE, de acordo com os apontamentos de Moreira, Ponce, Del Valle, & Roura (2005).

Quando considerado o tratamento de 1,00% de OE de canela, após as 24 horas de incubação não foi visualizada a formação de colônias nas placas semeadas com as diluições e com 0,1ml da própria cultura, sendo considerada a contagem como menor que 10 UFC/ml. Essa concentração de OE foi apontada por Smith-Palmer, Stewart, & Fyfe (2001) e Burt (2004) como necessária para a aplicação de OEs como antimicrobianos em sistemas complexos da matriz alimentar. Entretanto, essas observações revelam-se negativas para o uso de OEs em alimentos probióticos, já que é indesejável a ação bactericida contra o *L. rhamnosus*.

3.3. Microscopia eletrônica de transmissão

Neste estudo, as células de *L. rhamnosus* apresentaram-se com estrutura típica de bactérias Gram positivas quando visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 2), com parede celular uniforme. As células do tratamento com 0,04% de OE de canela exibiram certa perda de uniformidade da parede celular e pequenos pontos de extravasamento de conteúdo citoplasmático (Figura 3).

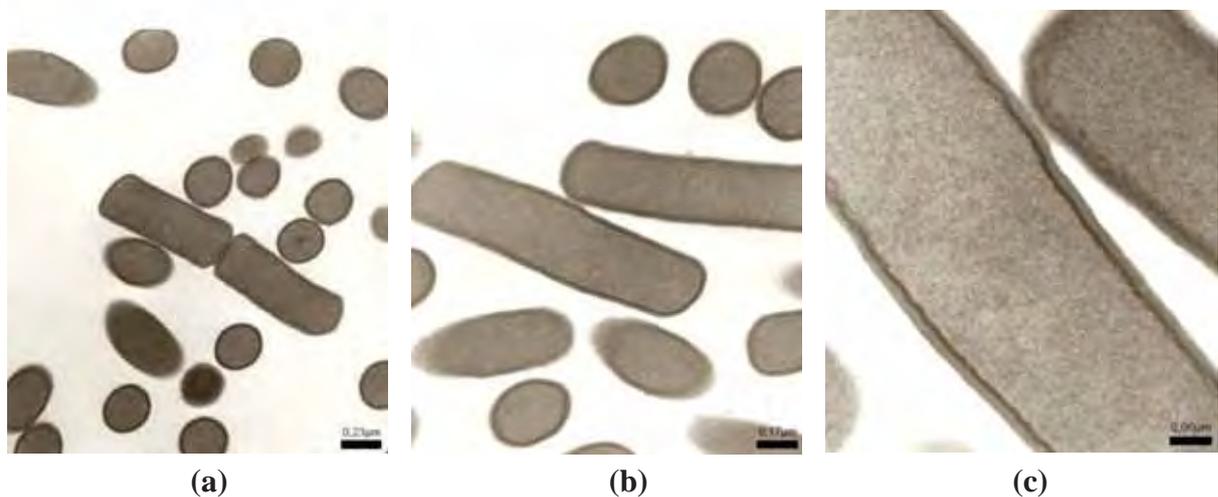


Figura 2. Células de *L. rhamnosus* fotografadas por microscopia eletrônica. (a) aumento de 8400x. (b) aumento de 11500x. (c) aumento de 31000x.



(a) (b) (c)

Figura 3. Células de *L. rhamnosus* tratadas com 0,04% de OE de canela fotografadas por microscopia eletrônica. (a) aumento de 11500x. (b) aumento de 15500x. (c) aumento de 15500x.

Alterações mais severas foram observadas nas células tratadas com 1,00% de OE de canela (Figura 4). Importantes pontos de ruptura da membrana citoplasmática foram observados, sendo mais pronunciado esse efeito nas regiões polares. Conseqüentemente houve extravasamento citoplasmático, como o observado por Rasooli, Rezae, & Allameh (2006) quando trataram células de *Listeria monocytogenes* com OE de tomilho a 125ppm.

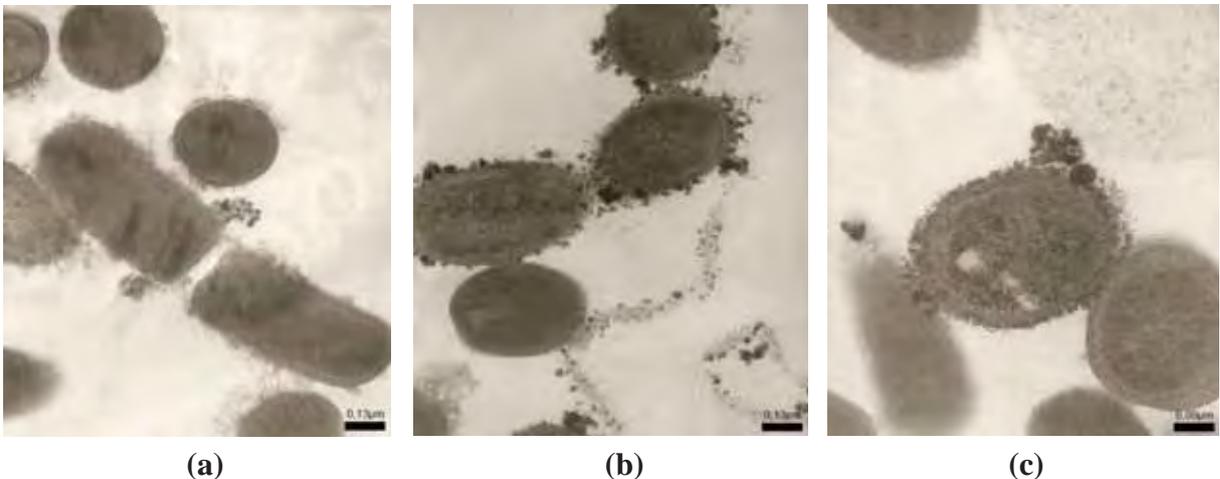


Figura 4. Células de *L. rhamnosus* tratadas com 1,00% de OE de canela fotografadas por microscopia eletrônica. (a) aumento de 15500x. (b) aumento de 15500x. (c) aumento de 21500x.

Ao redor das células foi possível visualizar pontos em que possivelmente houve aumento da permeabilidade da membrana celular, com aglomerados externos de constituintes celulares nas proximidades, efeitos observados por Moosavy et al. (2008) em células de *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus* tratadas com 3 μ L/ml de OE de *Zataria multiflora* B., uma planta típica do Irã.

4. Conclusões

O OE de canela exerceu atividade antimicrobiana em cultura de *L. rhamnosus*, com decréscimo nas células viáveis tanto em concentração relativa ao valor de CIM quanto em concentração necessária para ter efeito quando aplicado em alimentos, a qual apresentou efeitos relevantes de perda de uniformidade da parede celular com provável ruptura da membrana citoplasmática, com extravasamento celular. Por se tratar de uma bactéria probiótica, esses efeitos verificados *in vitro* são considerados indesejáveis no caso da aplicação de OE de canela como conservante em alimentos funcionais que contenham o *L. rhamnosus*.

5. Agradecimentos

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do IBB/UNESP – Botucatu pela contribuição na análise de microscopia eletrônica de transmissão.

6. Referências bibliográficas

- Adams, R. P. (1989). Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy, Academic Press, INC., San Diego, California.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos VIII - Lista dos Novos Alimentos aprovados*. 2008. Available on: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_alimentos.htm. Access on: Jan. 14, 2011.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- Bujalance, C., Jiménez-Valera, M., Moreno, E., & Ruiz-Bravo, A. (2006). A selective differential médium for *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 572-575.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Chang, S.-T., Chen, P.-F., & Chang, S.-C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 123-127.

- Chiu, Y.-H., Hsieh, Y.-J., Liao, K.-W., & Peng, K.-C. (2010). Preferential promotion of apoptosis of monocytes by *Lactobacillus casei rhamnosus* soluble factors. *Clinical Nutrition*, 29, 131-140.
- Clinical and Laboratory Standards Institute / National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS). (2005). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth information supplement. CLSI/NCCLS document M 100-S15*. Wayne, PA.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N. M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4863-4870.
- Downes, F. P., 2001. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 2nd edition. Washington, DC: American Public Health Association.
- Fonseca, P., & Librand, A. P. L. (2008). Evaluation of physico-chemical and phytochemical characteristics of different tinctures of barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Brazilian Journal of Pharmacology Science*, 44, 271-277.
- Hatakka, K., Holma, R., El-Nezami, H., Suomalainen, T., Kuisma, M., Saxelin, M., Poussa, T., Mykkänen, H., & Korpela, R. (2008). The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 406-410.
- Henryk, S., Chmielarczyk, A., Strus, M., Pejcz, J., Jawien, M., Kochan, P., & Heczko, P. B. (2006). Colonisation of the gastrointestinal tract by probiotic *L. rhamnosus* strains in acute diarrhoea in children. *Digestive and Liver Disease*, 38, S274-S276.
- Lee, H.-Y., Park, J.-H., Seok, S.-H., Baek, M.-W., Kim, D.-J., Lee, K.-E., Paek, K.-S., Lee, Y., & Park, J.-H. (2006). Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761, 736-744.
- Moosavy, M. H., Basti, A. A., Misahi, A., Salehi, T. Z., Abbasifar, R., Mousavi, H. A. E., Alipour, M., Razavi, N. E., Gandomi, H., & Noori, N. (2008). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Research International*, 41, 1050-1057.
- Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT – Food Science and Technology*, 38, 565-570.

- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. and Ignacimuthu, S., 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Comp. Altern. Med.* 6, 39.
- Rasooli, I., Rezae, M. B., & Allameh, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Infectious Diseases*, 10, 236-241.
- Silva, M. T. N., Ushimaru, P. I., Barbosa, L. N., Cunha, M. L. R. S., & Fernandes Júnior, A. (2009). Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11, 257-262.
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, 1262-1277.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463-470.

APÊNDICE I

SHORT COMMUNICATION

Cell enumeration and visualization by transmission electron microscopy of *Lactobacillus rhamnosus* treated with cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* B.) essential oil

C.M. Feniman^{1*}, V.L.M. Rall², J.T. Doyama³, A. Fernandes Júnior²

¹*Department of Technology, Regional Campus of Umuarama, State University of Maringá, Umuarama-PR, Brazil*

²*Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu-SP, Brazil*

³*Department of Chemistry and Biochemistry, Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu-SP, Brazil*

(Received XX Month Year; final version received XX Month Year)

*Corresponding author: tel./fax +55 44 36219300 - E.mail address: crisfeniman@yahoo.com.br; V. L. M. Rall: vlmr@ibb.unesp.br; J. T. Doyama: julio@ibb.unesp.br; A. Fernandes Júnior: ary@ibb.unesp.br

Cell enumeration and visualization by transmission electron microscopy of *Lactobacillus rhamnosus* treated with cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* B.) essential oil

Abstract

The use of essential oils (EOs) in functional foods containing probiotic microorganisms must consider the antimicrobial activity of these oils against beneficial bacteria such as *Lactobacillus rhamnosus*. This study aimed to evaluate the sensitivity of *L. rhamnosus* cultures treated with cinnamon EO through viable cell counts and visualization by transmission electron microscopy. Cinnamon EO at a concentration of 0.04% had a bacteriostatic activity after 2 h of incubation. Although slight alterations were detected in the cell structure, this concentration was considered to be bactericidal since it led to a significant reduction in cell numbers after 24 h. On the other hand, cinnamon EO at a 1.00% concentration decreased cell counts by 3 log units after 2 h incubation and no viable cell count was detected after 24 h. Transmission electron microscopy indicated that cells treated with 1.00% cinnamon EO were severely damaged and presented cell membrane disruption and cytoplasmic leakage.

Keywords: essential oils; probiotic foods; *Lactobacillus rhamnosus*.

1. Introduction

Essential oils (EOs) are complex volatile compounds characterized by a strong flavour. They are formed as secondary metabolites in aromatic plants and are known for their antiseptic, bactericidal, fungicidal, antiviral and medicinal properties (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008).

Essential oils have also been used in foods and they have been employed as flavourings and natural preservatives. Cinnamom EO has shown antimicrobial actions against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with Minimum Inhibitory Concentrations for 90% samples (MIC_{90%}) equal to 0.047% and 0.09% (v/v), respectively (Silva, Ushimaru, Barbosa, Cunha, & Fernandes Júnior, 2009).

However, the application of EOs in functional foods must consider any undesirable antimicrobial effects against probiotic bacteria. In order to have beneficial effects, probiotic bacteria must be viable and at high concentrations of at least 10⁶ CFU/g product (Szymański et al., 2006).

The main microorganisms that are considered to be probiotic are *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, which can be incorporated into foods alone or combined (Shah, 2007). Several functional properties are associated with *L. rhamnosus*.

The beneficial effects of *L. rhamnosus* emphasize the importance of maintaining the cell integrity of this bacterium in functional products of interest when considering the application of EOs as preservatives. Thus, the aim of this study was to investigate the sensitivity of *L. rhamnosus* cultures treated with cinnamon EO based on viable cell enumeration and visualization by transmission electron microscopy.

2. Results and Discussion

Cinnamon EO presented a density of 1.0049 g/ml and its chemical composition, obtained by gas chromatography-mass spectrometry, showed that 89.58% of the compounds were identifiable: cinnamaldehyde was the major component (67.58%), followed by cinnamyl acetate (6.49%). Prabuseenivasan, Jayakumar, & Ignacimuthu (2006) found 52.4% cinnamaldehyde in cinnamon EO, while Chang, Chen, & Chang (2001) detected 76% cinnamaldehyde in the EO extracted from cinnamon leaves.

Cell counts were performed at 0, 2, and 24 h after contact between the EO and *L. rhamnosus* cultures. Initially, the control culture had a lower viable cell count than the treatments with 0.04% and 1.00% cinnamon EO. After 2 h, there was an increase in the control cell count of around 3 log units, whereas the treatment with 0.04% cinnamon EO

remained almost stable and the treatment with 1.00% cinnamon EO showed a decrease of 3 log units.

After 24 h, the control culture showed a decrease in the cell count, which was close to the value obtained at 0 h. The treatment with 0.04% cinnamon EO led to a significant decrease of 5 log units relative to times 0 and 2 h. Although the cinnamon EO only had a bacteriostatic action after 2 h of contact, it was bactericidal at the concentration corresponding to the MIC after 24 h, demonstrating that the length of contact between the bacterium and the EO is a factor for the effectiveness of the antimicrobial activity of the EO, as stated by Moreira, Ponce, Del Valle, and Roura (2005).

Regarding the treatment with 1.00% cinnamon EO, no colony formation was observed on the plates sown with this dilution and with 0.1 ml of the culture itself after 24 h of incubation, and the cell count was considered as being lower than 10 CFU/ml. This concentration of the EO was reported by Burt (2004) as being necessary for an antimicrobial action in complex food systems. However, these findings are negative for the use of EOs in probiotic foods, since bactericidal action against *L. rhamnosus* is undesirable.

In the present study, the structure of *L. rhamnosus* cells treated with 0.04% cinnamon EO showed a certain loss of cell wall uniformity and small areas of cytoplasmic leakage when observed by transmission electron microscopy. More severe alterations were observed in cells treated with 1.00% cinnamon EO. Important areas of cytoplasmic membrane disruption were detected, especially in the polar regions. Consequently, cytoplasmic leakage occurred, as observed by Rasooli, Rezae, and Allameh (2006) in *Listeria monocytogenes* cells treated with thyme EO at 125 ppm.

Areas that were most likely to have increased membrane permeability were observed around the cells, including in nearby outer clusters of cell components, as observed by Moosavy et al. (2008) in *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* cells treated with 3 µl/ml of *Zataria multiflora* B. EO, a typical plant in Iran.

3. Conclusions

Cinnamon EO had antimicrobial activity on *L. rhamnosus* cultures, causing decreased numbers of viable cells both at the concentration relative to the MIC value and at the concentration required to have an effect when applied in foods. The 1.00% concentration had damaging effects, i.e. a loss of cell wall uniformity with probable cytoplasmic membrane disruption and cell leakage. Because *L. rhamnosus* is a probiotic bacteria, these *in vitro* effects

are undesirable in the case of cinnamon EO being used as a preservative in functional foods containing *L. rhamnosus*.

References

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Chang, S.-T., Chen, P.-F., & Chang, S.-C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 123-127.
- Moosavy, M.H., Basti, A.A., Misahi, A., Salehi, T.Z., Abbasifar, R., Mousavi, H.A. E., Alipour, M., Razavi, N.E., Gandomi, H., & Noori, N. (2008). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Research International*, 41, 1050-1057.
- Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., & Roura, S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT – Food Science and Technology*, 38, 565-570.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S., 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Comp. Altern. Med.* 6, 39.
- Rasooli, I., Rezae, M.B., & Allameh, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Infectious Diseases*, 10, 236-241.
- Silva, M.T.N., Ushimaru, P.I., Barbosa, L.N., Cunha, M.L.R.S., & Fernandes Júnior, A. (2009). Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11, 257-262.
- Shah, N.P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, 1262-1277.
- Szymański, H., Chmielarczyk, A., Strus, M., Pejcz, J., Jawien, M., Kochan, P., & Heczko, P.B. (2006). Colonisation of the gastrointestinal tract by probiotic *L. rhamnosus* strains in acute diarrhoea in children. *Digestive and Liver Disease*, 38, S274-S276.

SUPPLEMENTARY MATERIAL**Cell enumeration and visualization by transmission electron microscopy of *Lactobacillus rhamnosus* treated with cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* B.) essential oil**

C.M. Feniman^{1*}, V.L.M. Rall², J.T. Doyama³, A. Fernandes Júnior²

¹*Department of Technology, Regional Campus of Umuarama, State University of Maringá, Umuarama-PR, Brazil*

²*Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu-SP, Brazil*

³*Department of Chemistry and Biochemistry, Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu-SP, Brazil*

(Received XX Month Year; final version received XX Month Year)

*Corresponding author: tel./fax +55 44 36219300 - E.mail address: crisfeniman@yahoo.com.br; V. L. M. Rall: vlmr@ibb.unesp.br; J. T. Doyama: julio@ibb.unesp.br; A. Fernandes Júnior: ary@ibb.unesp.br

Cell enumeration and visualization by transmission electron microscopy of *Lactobacillus rhamnosus* treated with cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* B.) essential oil

Abstract

The use of essential oils (EOs) in functional foods containing probiotic microorganisms must consider the antimicrobial activity of these oils against beneficial bacteria such as *Lactobacillus rhamnosus*. This study aimed to evaluate the sensitivity of *L. rhamnosus* cultures treated with cinnamon EO through viable cell counts and visualization by transmission electron microscopy. Cinnamon EO at a concentration of 0.04% had a bacteriostatic activity after 2 h of incubation. Although slight alterations were detected in the cell structure, this concentration was considered to be bactericidal since it led to a significant reduction in cell numbers after 24 h. On the other hand, cinnamon EO at a 1.00% concentration decreased cell counts by 3 log units after 2 h incubation and no viable cell count was detected after 24 h. Transmission electron microscopy indicated that cells treated with 1.00% cinnamon EO were severely damaged and presented cell membrane disruption and cytoplasmic leakage.

Keywords: essential oils; probiotic foods; *Lactobacillus rhamnosus*.

1. Experimental

1.1. Cinnamon EO extraction and chemical analysis using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* B.) bark was obtained from local plants, planted for commercial purposes, and a voucher was deposited in the Botany Department of the Bioscience Institute (BOTU-3442). The EO was extracted via hydro-distillation in a modified Clevenger-type apparatus (model MA480 Marconi - Brazil). The density of the oil was determined by weighing the volume of 1 ml (Fonseca & Librandi, 2008). The chemical composition was analysed in a mass spectrometer attached to a Shimadzu - Japan model QP5050A gas chromatograph (GC-MS) with a CBP-5 (50 m × 0.25 mm × 0.25 µm) capillary column. The temperature of both the injector and the interface was 250 °C, the detector was operated in the electron impact (EI) ionization mode at 70 eV, and He was used as the carrier gas. The chromatographic conditions for the cinnamon EO were 60 °C initial temperature, heating up to 160 °C (at a rate of 3 °C min⁻¹), heating up to 220 °C (15 °C min⁻¹), and maintenance of 220 °C for 20 min. The components of the EO were identified (Figure 1) based on the NIST (National Institute of Standards and Technology, MD, USA) library for mass spectrum analysis and also on the data available in the literature (Adams, 1989).

1.2. Culture preparation

The treatment of *L. rhamnosus* cultures with cinnamon EO was based on an adaptation of the method described by Moosavy et al. (2008).

The *L. rhamnosus* strain ATCC 9595 was obtained from the collection of reference microorganisms at Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil). It was first inoculated in Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) and Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) and then incubated at 37 °C for 48 h to assess its purity and viability. The choice of these media was based on the data submitted by Bujalance, Jiménez-Valera, Moreno & Ruiz-Bravo (2006), in which *L. plantarum*, *L. casei* and *L. fermentum* isolated strains and other selected bacteria showed a higher number of viable cells in enriched TSA medium compared with MRS agar.

Then, a loopful was inoculated in 3 ml Brain Heart Infusion medium (BHI, Difco) and again incubated at 37 °C for 48 h to achieve the high cellular concentration necessary for preparing the sample for electron microscopy, according to the method described by Moosavy et al. (2008).

Following incubation, and besides the control, two extreme concentrations of cinnamon EO were added to the culture. The lowest concentration was set at 0.04%, relative to the MIC determined by the microdilution method on ELISA microplates (CSLI/NCCLS, 2005) using BHI medium plus 0.5% Tween 80; the concentrations of 0.025, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.00, 1.50 and 2.00% (v/v) were prepared in final volumes of 200 μ l. Positive (bacteria plus culture medium) and negative (culture medium only) control assays were carried out, as well as control assays for EO sterility (medium plus oils). The bacterial inoculum was standardized in 0.85% sterile saline solution according to 0.5 on McFarland's scale, resulting in a bacterial suspension of around 1.5×10^8 CFU/ml from the culture obtained after incubation at 37 °C for 48 h. The standardized bacterial suspension was inoculated in 2 μ l volumes, producing an initial count of around 10^5 CFU/ml in a volume of 200 μ l. After incubation at 35 °C for 24 h, a redox indicator (0.01% resazurin) was added for the reading; a blue colouration indicated a negative result for bacterial growth, whereas a pink colouration indicated a positive result. In this case, the MIC was considered as the concentration that resulted in no bacterial growth after the incubation period.

The highest concentration was set at 1.00% because a concentration higher than the MIC is required for antimicrobial effects in foods, as reported by Smith-Palmer, Stewart, & Fyfe (2001), who observed that concentrations between 0.50 and 1.00% of the studied EO were needed to successfully inhibit microbial food contaminants.

The cultures treated with cinnamon EO and the control were kept at room temperature (around 25 °C) for 2 h. Three replicates were used for the viable cell count and one replicate was used for electron microscopy.

1.3. Viable cell count

Serial dilutions were prepared from 10^{-2} of each treatment and the control. The first dilution was prepared with 0.1 ml aliquots removed before the addition of EO, after 2 h of contact with the oil and at the end of 24 h of contact with the oil.

The dilutions were used for viable cell counts by means of surface sowing on Petri plates containing TSA (Difco) medium enriched with 1% yeast extract. For the treatment with 1.00% cinnamon EO, 0.1 ml of the culture was directly sown onto plates containing a culture medium for cell counts based on the intense antimicrobial activity of this oil reported in the literature.

The plates were incubated at 35 °C for 48 h and the colony-forming units were counted and expressed as log units (CFU/ml) (Downes, 2001).

The values obtained in the viable cell count were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test in SAS software; they are shown in Table 1.

1.4. Transmission electron microscopy

After 2 h of contact between the culture and cinnamon EO, the samples were prepared for transmission electron microscopy based on an adaptation of the method described by Moosavy et al. (2008). Prefixation was performed by adding 3 ml 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer 0.1M (PBS, pH 7.2) for 24 h. Then, the cultures were centrifuged at 1500 × g for 20 min to obtain pellets. The supernatant was discarded and the pellets were added to 3 ml of fixative prepared with a solution of 2% glutaraldehyde in phosphate buffer 0.1M (pH 7.3), and kept at 4 °C for 24 h. The material was subjected to post-fixation in a solution of 1% osmium tetroxide in phosphate buffer 0.1M (pH 7.3) for 2 h; then, this material was dehydrated in an increasing series of acetone and embedded in Araldite[®]. Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. The samples were analysed and photographed under a transmission electron microscope (CM 100, Philips).

References

- Adams, R. P. (1989). Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy, Academic Press, INC., San Diego, California.
- Bujalance, C., Jiménez-Valera, M., Moreno, E., & Ruiz-Bravo, A. (2006). A selective differential médium for *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 572-575.
- Clinical and Laboratory Standards Institute / National Comitee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS). (2005). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth information supplement. CLSI/NCCLS document M 100-S15. Wayne, PA.
- Downes, F.P., 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 2nd edition. Washington, DC: American Public Health Association.
- Fonseca, P., & Librandi, A.P.L. (2008). Evaluation of physico-chemical and phytochemical characteristics of different tinctures of barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Brazilian Journal of Pharmacology Science*, 44, 271-277.

Moosavy, M.H., Basti, A.A., Misahi, A., Salehi, T.Z., Abbasifar, R., Mousavi, H.A. E., Alipour, M., Razavi, N.E., Gandomi, H., & Noori, N. (2008). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Research International*, 41, 1050-1057.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463-470.

Table S1. Viable cell count for *L. rhamnosus* cultures treated with cinnamon essential oil (EO) after a period of contact with the EO.

Time (h)	Description	Log units
0	Control	$8.67^d \pm 0.33$
	Treated with 0.04% EO	$9.38^{bc} \pm 0.16$
	Treated with 1.00% EO	$9.84^b \pm 0.06$
2	Control	$11.48^a \pm 0.28$
	Treated with 0.04% EO	$9.27^c \pm 0.09$
	Treated with 1.00% EO	$6.88^e \pm 0.06$
24	Control	$9.29^c \pm 0.21$
	Treated with 0.04% EO	$4.32^f \pm 0.09$
	Treated with 1.00% EO	$<1.00^g \pm 0.00$

same letters in the same column indicate statistically equal medians ($p < 0.05$).

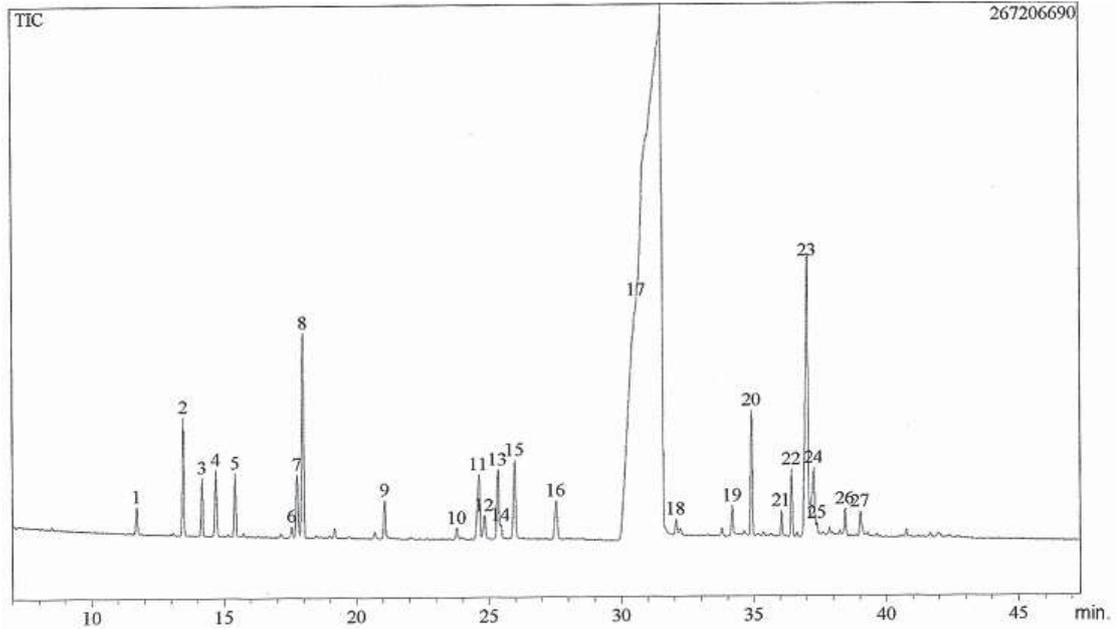


Figure S1. The GC-MS chromatogram obtained for cinnamon EO that was used to identify its compounds; 88.59% of the compounds were identified. Peak 2: α -pinene (1.62%); 3: camphene (0.79%); 5: β -pinene (0.93%); 6: cymene (0.17%); 7: limonene (1.11%); 8: cineol (3.31%); 9: linalool (0.55%); 12: borneol (0.50%); 13: terpinen-4-ol (1.22%); 15: α -terpinene (1.43%); 17: cinnamaldehyde (67.58%); 19: eugenol (1.82%); 22: caryophyllene (0.88%); 23: cinnamyl acetate (6.49%); 25: α -humulene (0.19%).

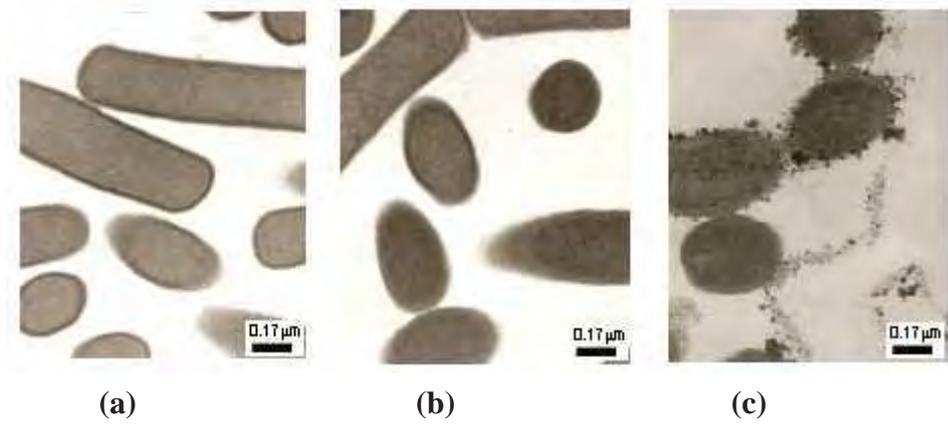


Figure S2. *Lactobacillus rhamnosus* cells photographed by electron microscopy - $\times 11500$ magnification: (a) control, (b) treated with 0.04% cinnamon EO, (c) treated with 1.00% cinnamon EO.

APÊNDICE II

ScholarOne Manuscripts

Page 1 of 1

Preview

From: armandodoriano.bianco@uniroma1.it

To: crisfeniman@yahoo.com.br

CC:

Subject: Natural Product Research - Decision on Manuscript ID GNPL-2011-0212.R2

Body: @@date to be populated upon sending@@

Dear Dr Feniman:

Ref: Cell enumeration and visualization by transmission electron microscopy of *Lactobacillus rhamnosus* treated with cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* B.) essential oil

Our referees have now considered your paper and have recommended publication in *Natural Product Research*. We are pleased to accept your paper in its current form which will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting. The reviewer comments are included at the bottom of this letter.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course.

The publisher also requests that proofs are checked and returned through the publisher's Central Article Tracking System.

Thank you for your contribution to *Natural Product Research* and we look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,
Professor Bianco
Editor-in-Chief, *Natural Product Research*
armandodoriano.bianco@uniroma1.it

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1
Comments to the Author
Manuscript is suitable for publication.

There are now over 1050 Taylor & Francis titles available on our free table of contents alerting service! To register for this free service visit: www.informaworld.com/alerting.

Date Sent: 15-May-2011

 Close Window