

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SUL DE
MINAS GERAIS - IFSULDEMINAS**

Juliana Borges Reis

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
CONTRA PATÓGENOS ALIMENTARES**

**Machado/MG
2019**

R31a

Reis, Juliana Borges

Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares / Juliana Borges Reis. -- Machado: [s.n.], 2019. 55 p.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Maria Oliveira Morais Veiga.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Campus Machado.
Inclui bibliografia

1.Óleos essenciais. 2. Orégano. 3. Patógenos alimentares. I Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Machado. II.Título.

CDD: 664

Juliana Borges Reis

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
CONTRA PATÓGENOS ALIMENTARES**

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof.^a Sandra Maria Oliveira
Morais Veiga

**Machado/MG
2019**

Juliana Borges Reis

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
CONTRA PATÓGENOS ALIMENTARES**

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS,
como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do
título de Mestre.

APROVADA em 30 de julho de 2019

Prof. Dr. Eveline Monteiro Cordeiro de
Azeredo
Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Brígida Monteiro Vilas Boas
IFSULDEMINAS – Campus Machado

Prof. Dr. Prof.^a Sandra Maria Oliveira Morais Veiga
Universidade Federal de Alfenas

À minha mãe. Sua revisão fez muita falta.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Sandra Maria Oliveira Morais Veiga e a todos os funcionários do laboratório de Microbiologia de Alimentos da UNIFAL-MG, em especial Maria Vita.

Às graduandas Luana Amaral de Figueiredo e Giuliana Martina Castorani, pela preciosa colaboração.

À Elaine, Gerente da Qualidade no Laticínio Serrania – Coorples, que gentilmente nos cedeu uma amostra de nisina.

Ao técnico Gustavo Silveira, por permitir a utilização do espectrofotômetro presente em seu laboratório de trabalho.

Ao meu esposo, Thiago, por todo o apoio moral e logístico.

RESUMO

Os óleos essenciais (OE) são compostos presentes naturalmente em plantas e, conseqüentemente, nas especiarias, exercendo funções biológicas relacionadas aos seus mecanismos de defesa. Eles são amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos e, mais recentemente, estão sendo estudados como aromatizantes, flavorizantes e conservantes naturais pelas indústrias alimentícias. Os óleos essenciais são considerados antimicrobianos naturais, tendo potencial para ser usados como aditivos em substituição aos conservantes artificiais tradicionais; além disso, atendem ao consumidor moderno, que busca por produtos mais saudáveis e “naturais”. Nesse contexto, este estudo buscou estudar a ação dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), manjerona (*Origanum majorana*), tomilho (*Thymus vulgaris*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), gengibre (*Zingiber officinale*), manjericão (*Ocimum basilicum*) e de pimenta-preta (*Piper nigrum*) contra patógenos alimentares de importância epidemiológica: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*, por meio dos testes de sensibilidade de diluição em ágar e microdiluição. No teste de diluição em ágar, notadamente o óleo essencial de orégano mostrou-se efetivo contra todos os contaminantes utilizados, enquanto os óleos de manjerona, manjericão e tomilho apresentaram bom desempenho, apesar de não terem inibido todos os microrganismos. O óleo essencial de gengibre apresentou fraca atividade apenas contra *L.monocytogenes* nas concentrações mais altas, enquanto que os óleos de alecrim e de pimenta-preta não apresentaram atividade antimicrobiana. Pelo teste de microdiluição, os óleos essenciais de orégano, tomilho, manjerona e manjericão apresentaram elevada atividade antimicrobiana, especialmente o OE de manjerona. Entretanto, os óleos essenciais de alecrim, gengibre e pimenta-preta não obtiveram resultado satisfatório no segundo método executado. Os resultados obtidos demonstram que alguns óleos essenciais podem ser empregados na indústria de alimentos como uma alternativa natural isolada ou coadjuvante para o controle microbiológico.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Patógenos alimentares. Orégano.

ABSTRACT

Essential oils (EO) are compounds present naturally in plants and, therefore, in spices, performing biological functions related to their defense mechanisms. They are widely used in pharmaceutical and cosmetic industries and, more recently, they are being studied as flavorings and natural preservatives by food industries. Essential oils are considered natural antimicrobials, having the potential to be used as additives in place of traditional artificial preservatives. Besides, they serve the modern consumer, who is looking for healthier and “natural” products. In this context, this paper sought to study the action of the following essential oils: oregano (*Origanum vulgare*), marjoram (*Origanum majorana*), thyme (*Thymus vulgaris*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*), ginger (*Zingiber officinale*), basil (*Ocimum basilicum*) and black pepper (*Piper nigrum*) against food pathogens of epidemiological importance: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*, by using agar dilution and microdilution sensitivity tests. In the agar dilution test, notably, oregano essential oil was effective against all contaminants used, while marjoram, basil and thyme oils performed well, although they did not inhibit all microorganisms. The ginger essential oil showed poor activity only against *L.monocytogenes* at the highest concentrations, while rosemary and black pepper oils did not inhibit any of the studied food pathogens. In the microdilution test, oregano, thyme, marjoram and basil essential oils showed high antimicrobial activity, especially the marjoram EO, with MIC below 2.0%. However, essential oils of rosemary, ginger and black pepper did not obtain satisfactory results at concentrations of 0.5 to 4.0% in the second method performed. The results show that some essential oils can be used in food industry as an isolated or supporting natural alternative for microbiological control.

Keywords: Essential oils. Food pathogens. Oregano.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Faixas de concentração dos antibióticos utilizadas para controle positivo dos microrganismos estudados.....43
- Tabela 2 - Perfil de sensibilidade dos patógenos alimentares estudados em relação aos antibióticos empregados no controle positivo e padrão da CLSI (valores em mm).....44
- Tabela 3 – Média dos halos de inibição dos óleos essenciais (em milímetros) frente a patógenos alimentares e desvio padrão.....45
- Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima dos óleos essenciais estudados e controle positivo frente aos patógenos alimentares.....49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Óleos essenciais estudados com as respectivas famílias e composições.....	38
--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	10
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Óleos essenciais.....	11
2.1.1 Definição.....	11
2.1.2 Funções nas plantas.....	12
2.1.3 Usos na indústria.....	13
2.1.4 Orégano	16
2.1.5 Manjerona	17
2.1.6 Tomilho	18
2.1.7 Alecrim.....	19
2.1.8 Gengibre.....	20
2.1.9 Manjericão	21
2.1.10 Pimenta-preta	22
2.2 Patógenos alimentares	23
2.2.1 Coliformes a 45°C	24
2.2.2 <i>Estafilococos coagulase positiva</i>	25
2.2.3 <i>Salmonella sp.</i>	26
2.2.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	27
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
4 REFERÊNCIAS.....	30
CAPÍTULO 2	36
Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares....	36

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são compostos presentes naturalmente em plantas – notadamente em plantas usadas rotineiramente como temperos, as especiarias. O conceito de especiaria varia conforme o local, mas, acuradamente falando, as partes secas de uma planta, como raízes, folhas e sementes, são usadas para conferir sabor e efeito pungente aos alimentos, diferente das ervas, cujo termo tem conotação medicinal (IRASA; TOKEMASA, 1998).

A atividade antimicrobiana dos OEs geralmente está associada a compostos como eugenol, alicina, timol e carvacrol. Esses princípios ativos, graças à sua característica hidrofóbica, atuam rompendo a parede celular microbiana, fazendo-a perder sua funcionalidade (FORSYTHE, 2013).

Aliado à busca dos consumidores por produtos mais saudáveis, tem-se o apelo aos aditivos alimentares naturais. Assim, os óleos essenciais e suas respectivas especiarias têm se destacado como alternativas potenciais para a substituição ou redução de aditivos químicos em alimentos.

Considerando que a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias tem sido demonstrada por diferentes estudos, este trabalho tem como finalidade estudar a ação dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), manjerona (*Origanum majorana*), tomilho (*Thymus vulgaris*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), gengibre (*Zingiber officinale*), manjericão (*Ocimum basilicum*) e pimenta-preta (*Piper nigrum*) contra alguns patógenos alimentares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Óleos essenciais

2.1.1 Definição

Óleos essenciais (OE) são substâncias muito comuns em algumas famílias de plantas consideradas especiarias, como, por exemplo, *Labiatae* – hortelã, sálvia e alecrim; *Umbelliferae* – erva-doce, funcho, anis; *Lauraceae* – canela; *Zingiberaceae* – gengibre; *Myrtaceae* – cravo-da-Índia, entre outras. As especiarias são partes de vegetais tradicionalmente utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas (BRASIL, 2005). Os óleos essenciais são voláteis, odoríferos, imiscíveis ou muito pouco miscíveis com água, sendo arrastados pelo vapor d'água (CARRIJO et al., 2012; BAKKALI et al., 2008).

Os primeiros estudos científicos do potencial das especiarias como conservantes datam da década de 1880, em uma pesquisa sobre a atividade do óleo de canela contra esporos do bacilo de antraz. Como agentes antimicrobianos naturais derivados de especiarias, os óleos essenciais são reconhecidos e utilizados há séculos na conservação de alimentos, desde os Egito a países asiáticos como China e Índia. A produção de OE pode ser rastreada até há mais de 2000 anos, no Extremo Oriente, quando se incorporaram tecnologias mais modernas de extração, na Arábia no século IX. Foi também neste período que as aplicações médicas de OE se tornaram secundárias ao seu uso para dar sabor e aroma (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Quimicamente, os óleos essenciais apresentam-se como uma mistura de componentes voláteis de baixo peso molecular, tais como terpenóides, fenilpropanóides e compostos contendo enxofre e nitrogênio. A atividade antimicrobiana destes está relacionada a compostos fenólicos, tais como timol, eugenol, carvacrol e também a substâncias como o linalol, sabineno, mentol, mirceno e camphene, que são os constituintes encontrados em concentrações mais altas (MORO et al., 2015; HIRASA; TAKEMASA, 1998). Geralmente, os OE que possuem ação antibacteriana mais forte contra patógenos de origem alimentar contém uma alta porcentagem de compostos fenólicos, tais como carvacrol, eugenol e timol (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Deve-se levar em conta, no momento da extração do óleo, que ocorre variação sazonal na sua composição, assim como influência do ambiente de cultivo, idade da planta, clima, solo, disponibilidade de água e fatores genéticos (HUDAIB et al., 2002; HUSSAIN et al., 2008).

Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos OE, é mais provável que a sua atividade antibacteriana não seja atribuível a um mecanismo específico, mas a vários alvos na célula (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). No geral, os princípios ativos dos OE, graças à sua característica hidrofóbica, atuam rompendo a parede celular microbiana, fazendo-a perder sua funcionalidade (FORSYTHE, 2013). Também atuam danificando a força motriz de prótons, o fluxo de elétrons e o transporte ativo, coagulando o conteúdo das células. Ou, ainda, podem interromper vários sistemas de enzimas envolvidos na regulação da energia e síntese de componentes estruturais (BURT, 2004). Como a maioria dos componentes antimicrobianos dos OE são compostos fenólicos, seu mecanismo de ação é, portanto, similar a estes (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). No geral, as bactérias Gram-negativas são menos sensíveis aos óleos essenciais por causa da membrana externa de lipopolissacarídeo presente neste grupo, a qual restringe a difusão de compostos hidrofóbicos. No entanto, isso não significa que as bactérias Gram-positivas sejam sempre mais suscetíveis (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Os compostos nos OE tendem a ser mais eficazes contra microrganismos patogênicos em sua associação natural do que isolados, dada a sinergia entre eles. Um exemplo é a sinergia entre o carvacrol e o p-cimeno, presentes no óleo de orégano. O p-cimeno, apesar de ser um antimicrobiano fraco, pode facilitar o transporte do carvacrol para a célula ao enfraquecer a parede celular microbiana (BURT, 2004).

2.1.2 Funções nas plantas

Os OE são produzidos nos diferentes órgãos vegetais (raiz, broto, flor, folha, caule, galho, semente, fruto, madeira ou casca) durante o metabolismo secundário das plantas, estando contidos em estruturas especiais, em conjuntos celulares denominados aparelhos secretores, em cavidades, canais, células da epiderme ou nos tricomas glandulares (CARRIJO et al., 2012; BAKKALI et al., 2008). Eles atuam em funções biológicas importantes à sobrevivência dos vegetais, relacionadas aos mecanismos de defesa, como a proteção contra excesso de ultravioleta (UV), microrganismos, insetos e animais, tendo despertado o interesse de pesquisadores por terem potencial de utilização como aditivos antimicrobianos (MILLEZI et al., 2016; COSTA et al., 2015). Estudos apontam certo grau de especificidade entre os óleos essenciais e determinadas amostras de microrganismos (SANTURIO et al., 2007; INDUI et al., 2006).

2.1.3 Usos na indústria

Os óleos essenciais já são utilizados nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, sendo que, mais recentemente, estão sendo estudados como aromatizantes, flavorizantes e conservantes naturais pelas indústrias alimentícias (COSTA et al., 2015). Cerca de 3000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais aproximadamente 300 são comercialmente utilizados em diversos setores industriais (BAKKALI et al., 2008).

Na sua condição de antimicrobianos naturais, os óleos essenciais estão recebendo atenção em uma série de questões relacionadas ao controle de microrganismos, reduzindo a necessidade de antibióticos, controlando a contaminação microbiana em alimentos, melhorando as tecnologias de ampliação da vida de prateleira, para eliminar patógenos indesejáveis e retardar a deterioração microbiana, diminuindo o desenvolvimento de resistência a antibióticos por microrganismos patogênicos ou o fortalecimento do sistema imunológico (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Como a segurança dos aditivos químicos é constantemente questionada, o interesse por essas substâncias tem se renovado, dada a busca por alternativas naturais (TRAJANO et al., 2009).

Diversos estudos podem exemplificar a ação bactericida de óleos essenciais, tanto *in vitro* quanto aplicados diretamente em alimentos. Souza et al. (2016) avaliaram o efeito bactericida de dezesseis óleos essenciais (canela, limão tahiti, mandarina, funcho doce, anis estrelado, menta, noz moscada, pimenta-preta, alecrim, cravo da Índia, tomilho branco, capim-limão, manjerição comercial e extraído, orégano comercial e extraído), com composição química qualitativa e quantitativa distintas, sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). Dentre essas dezesseis amostras, os mais eficazes foram os óleos de *C. cassia* (canela) e *T. vulgaris* (tomilho), concluindo que há diferentes níveis de sensibilidade bacteriana, no caso da *E. coli*, dependendo da composição química do óleo.

Martinelli et al. (2017) testaram os óleos essenciais de oito tipos de pimentas, relatando atividade significativa dos óleos essenciais de *P. dioica* e *S. terebinthifolius* contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* e os fungos *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.*

Martins et al. (2010) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial do manjerição (*Ocimum basilicum* Linn.), extraído pelo processo de hidrodestilação com extrator de Clevenger, frente à *Escherichia coli* enteropatogênica isolada de alfaces, pelo Método de Difusão em Disco (MDD). O OE do manjerição, pertencente à família *Lamiaceae*, mesma de

orégano, manjerona e tomilho, apresentou efeito inibitório contra os sorogrupos de *E. coli* EPEC testados, com médias de halos de inibição variando entre 11,2 mm e 11,6 mm e de 11,0 mm a 12,0 mm. O efeito inibitório foi atribuído pelos autores à presença do metil chavicol e linalol, os constituintes majoritários do óleo.

Trajano et al. (2009) investigaram as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Coriandrum sativum* L., *Cuminum cyminum* L., *Mentha. piperita* L., *Ocimum basilicum* L., *Origanum majorana* L., *Pimpinella anisum* L., *Piper nigrum* L., *Rosmarinus officinalis* L. e *Zingiber officinalis* Rosc. frente à dez cepas bacterianas deteriorantes de alimentos. Os resultados mostraram que os óleos essenciais das folhas do cravo da Índia (*E. caryophyllata*) e de canela (*C. zeylanicum*) apresentaram eficiência na inibição de todas as cepas bacterianas ensaiadas. Os demais óleos pesquisados exerceram atividade antibacteriana, porém dentro de um menor espectro de ação.

Ernandes et al. (2007) determinaram a atividade antimicrobiana de oito óleos essenciais extraídos por arraste de vapor sob pressão reduzida (alho, canela, cebola, cravo do Brasil, cravo da Índia, gengibre, hortelã e orégano) e outros dois adquiridos no comércio varejista (hortelã e menta) sobre 26 microrganismos isolados do meio ambiente, mostrando que alguns óleos essenciais apresentaram melhor desempenho do que os antibióticos utilizados como padrão de comparação. Os óleos concentrados apresentaram maior efeito que as respectivas diluições, observando-se que o efeito inibitório aumentava com maiores concentrações dos óleos essenciais.

Duarte et al. (2007) pesquisaram óleos essenciais de folhas de plantas medicinais comumente usadas no Brasil, obtidos por destilação em água utilizando sistema Clevenger, que foram testados contra *E. coli*. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição. Dentre os pesquisados, o óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon martinii*) exibiu o mais amplo espectro de inibição contra diversos sorotipos de *Escherichia coli*. Outros óleos essenciais mostraram propriedades antimicrobianas, porém com ação mais restrita contra os sorotipos estudados. O OE do capim-limão, em análise química por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, mostrou a presença de compostos como geraniol, acetato de geranila e trans-cariofileno, que possuem atividade antimicrobiana, sendo o geraniol o composto antimicrobiano ativo.

Santurio et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*) e orégano (*Origanum vulgare*) através de microdiluição em caldo frente a amostras de *Salmonella enterica* isoladas de carcaças de aves. Concluíram que o óleo

essencial de orégano evidenciou forte atividade antibacteriana, seguido do tomilho, com atividade moderada. O estudo mostra a possibilidade do uso dos óleos essenciais de temperos e condimentos como alternativa em substituição aos antibacterianos utilizados como promotores de crescimento na ração de aves de produção.

Kruger (2006) testou o OE de orégano adicionado em linguiça frescal, com e sem associação à nisina, um peptídeo produzido pelas bactérias comuns do leite, chegando à conclusão de que o mesmo, isolado, não é efetivo para inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* ao ser misturado na linguiça, apesar de o efeito inibitório ser observado *in vitro*. A associação entre os dois compostos (OE de orégano e nisina), na proporção adequada, exerceu um efeito sinérgico que inibiu a multiplicação de *L. monocytogenes in vitro* – efeito que também se observa ao utilizar a associação em linguiça frescal, mas o efeito se perdeu em refrigeração mais prolongada. Porém, a associação dos compostos na concentração estudada compromete as características sensoriais do produto, limitando seu uso. Essa diferença entre o resultado obtido *in vitro* e no produto adicionado ao alimento deve ser levada em consideração, assim como a alteração sensorial produzida pelo óleo.

Entretanto, alguns entraves aparecem quando se tenta aplicar na prática os efeitos dos óleos essenciais: resultados obtidos *in vitro* não podem ser extrapolados exatamente para alimentos devido à complexidade da matriz alimentar (GAMMARIELLO et al., 2008; MORO et al., 2015). Smith-Palmer, Stewart, Fyfe (2001) mostraram que, por exemplo, a composição do queijo pode ser um fator importante na determinação da eficácia dos óleos essenciais da planta. O teor de gordura, bem como o teor de proteína do queijo, pode influenciar positiva ou negativamente na eficácia do OE, conforme o tipo e a espécie de contaminante. A gordura formaria um revestimento ativo contra agentes antimicrobianos em torno das bactérias. A fração lipídica do alimento pode também absorver o agente antimicrobiano, diminuindo, assim, a concentração na fase aquosa e, portanto, sua ação bactericida. Quanto às proteínas, suspeita-se que formem um complexo com os compostos fenólicos presentes no óleo, prevenindo formações complexas similares entre compostos fenólicos e proteínas ou outros componentes do envelope celular microbiano – um dos principais sítios para ação dos óleos essenciais. Além disso, o teor reduzido de água nos alimentos em comparação com os meios laboratoriais poderia dificultar a transferência de agentes antimicrobianos para o sítio ativo na célula microbiana.

Moro et al. (2015) também afirmam que há limitações no uso de extratos de plantas e óleos essenciais por causa da sua interação com a matriz alimentar (proteína, gordura etc.),

sendo necessárias altas concentrações de óleos essenciais para alcançar suficiente atividade antimicrobiana. Apesar da crença geral na segurança dos OEs, o efeito de altas concentrações desses materiais na saúde humana deve ser considerado. Outra observação é que o intenso aroma resultante desses óleos, mesmo em baixas concentrações, pode causar efeitos organolépticos negativos. Isso poderia ser contornado ao incorporá-los a biofilmes comestíveis, por exemplo.

Além disso, alimentos que contenham todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento microbiano, como laticínios, aliados ao alto teor de água, permitem uma recuperação mais rápida das células danificadas por antimicrobianos naturais. Por outro lado, a estabilidade dos óleos essenciais também deve ser levada em conta ao serem adicionados aos alimentos, pois eles podem ser perdidos durante o processamento devido a uma provável sensibilidade ao oxigênio, luz, temperatura e pH (GAMMARIELLO et al., 2008).

Em estudos com alimentos contaminados artificialmente, é usado mais inóculo do que deveria ser encontrado em produtos naturalmente contaminados. Assim, menores concentrações de óleos podem ser suficientes para produtos naturalmente contaminados. Entretanto, o uso de concentrações insuficientes pode permitir a recuperação das colônias (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 2001).

2.1.4 Orégano

Orégano (*Origanum vulgare L.*) é uma planta aromática pertencente à família das *Lamiaceae*, sendo ereta e perene e chegando a uma altura entre 20 e 80 cm. Seu cultivo se dá majoritariamente na região do Mediterrâneo e outras áreas de climas temperados da Europa, como Ásia, Norte da África e América (VERMA et al., 2010), sendo uma erva nativa da Europa, África e sudoeste da Ásia (BORGES et al., 2012).

Verma et al. (2010) analisaram a composição de OE de várias populações de *O. vulgare* e encontraram principalmente γ -terpineno, timol, (E)- β -ocimeno, ρ -cimeno, E(Z)- β -ocimeno, além de carvacrol, linalool, germacrene D, α -terpineol, borneol e β -cariofileno. A variação encontrada entre as populações dessa planta sugere que ela tenha grande complexidade na sua composição de OE.

Borges et al. (2012) obtiveram do óleo essencial do orégano fresco quatro picos cromatográficos, correspondentes ao γ -terpineno (33,4%), 4-terpineol (25,59%), timol (14,21%) e carvacrol (2,30%), sendo o γ -terpineno o pico de maior relevância e o carvacrol o

de menor.

Ao se compilar os relatos na literatura científica abordando o estudo do potencial antimicrobiano de especiarias e seus óleos essenciais, nota-se que o orégano tem sempre apresentado resultados de destaque como agente de inibição de bactérias e fungos contaminantes de alimentos. O OE de orégano, em teste contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa*, pelo método de microdiluição em Caldo Tripticaseína de Soja (TSB) para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), e posterior semeadura em Ágar Tripticase de Soja (TSA) para definir a Concentração Bactericida Mínima (CBM), mostrou atividade antimicrobiana contra os dois microrganismos em diferentes concentrações (SANTOS; PICCOLI; TEBALDI, 2017).

Hafemann et al. (2015) realizaram um trabalho com ricota adicionada de óleo essencial de orégano em que amostras deste produto foram analisadas microbiologicamente para *Staphylococcus* coagulase positiva, aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes e *Salmonella* nos tempos 0,5, 10 e 15 dias após a fabricação, obtendo amostras dentro dos limites estabelecidos pela legislação. Não foi usada contaminação artificial e, no último tempo analisado, a amostra controle não adicionada de óleo apresentou contagens mais altas. Isso mostra que o OE de orégano tem efeito antimicrobiano e conservante. Ao mesmo tempo, foi feita a análise sensorial das ricotas, assegurando que a adição de óleo de orégano nas concentrações estudadas não causa alteração nas suas características sensoriais.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano também foi avaliada por Santurio et al. (2007) por meio de microdiluição em caldo frente a amostras de *Salmonella enterica* isoladas de carcaças de aves, concluindo que o óleo essencial de orégano apresenta forte atividade antibacteriana.

2.1.5 Manjerona

Manjerona (*Origanum majorana* L.), planta da família *Lamiaceae*, é uma herbácea perene nativa de Chipre e do Oriente Mediterrâneo, de grande importância econômica e industrial, usada como especiaria e condimento (BAĞCI et al., 2017).

Os principais princípios bioativos do óleo essencial de manjerona são o terpinen-4-ol e o hidrato de cis-sabineno, responsáveis pela característica aromática, além do sabineno, acetato de linalol, terpineno e linalol (VALERIANO et al., 2012; VÁGI et al., 2005; CASTORANI; FIGUEIREDO, 2018).

Por outro lado, Bağcı et al. (2017) analisaram a composição de OE de *O. majorana* e os resultados mostraram que a maior porcentagem neste óleo foi do composto carvacrol, tanto em planta secas quanto frescas, sendo que a secagem da planta aumenta a taxa de carvacrol. O linalol foi o segundo mais predominante.

Castorani e Figueiredo (2018) mostraram a ação antimicrobiana do OE de manjerona contra diversos microrganismos, no sistema de difusão em ágar e também em microdiluição, quando esse mostrou a maior atividade em relação aos demais óleos avaliados contra os patógenos alimentares: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *L. monocytogenes* e não foi ativo contra *Salmonella*.

2.1.6 Tomilho

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é uma planta da família *Lamiaceae*, que compreende 150 gêneros, com cerca de 2.800 espécies distribuídas em todo o mundo (BORGES et al., 2012). É uma planta baixa, nativa da região do Mediterrâneo (Espanha, Itália, França, Grécia) com caules parcialmente rastejantes (IETSWAART, 1980; JAKIEMIU, 2008).

Borges et al. (2012) obtiveram, no cromatograma do óleo essencial de tomilho fresco, como constituinte majoritário o borneol (66,66%), maior que o teor de timol (13,41%) e do linalol (3,24%) – este último em quantidade muito baixa. No cromatograma do óleo essencial de tomilho desidratado, o borneol foi o composto majoritário (37,90%), seguido do timol (20,61%) e finalmente o linalol (10,34%). Isso mostra que a dessecação interfere na composição dos OE.

Jakiemiu (2008) quantificou o óleo essencial de folhas frescas de tomilho e encontrou compostos majoritários como o timol, com 50 a 55%, o p-cimeno com 17 a 21%, e o γ -terpineno teve concentração de 5 a 7%. Valores semelhantes de borneol foram encontrados avaliando-se plantas secas de tomilho, onde detectou-se 32 a 35% de borneol, 15,24 a 20,62% de carvacrol e 10,5 a 12,33% de γ -terpineol.

Um estudo de Hudaib et al. (2002) mostra que a variação sazonal deve ser levada em consideração ao avaliar a composição do OE dessa planta. Em análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa observou-se que o óleo se mostra mais ou menos rico em fenóis monoterpenos ativos (timol e carvacrol) e seus correspondentes precursores de hidrocarboneto (HC) monoterpênico (p-cimeno e γ -terpineno), conforme a estação do ano. Óleos extraídos de plantas mais velhas, em torno de cinco anos, apresentam níveis mais

baixos de HCs monoterpênicos (principalmente γ -terpineno) e mais altos de monoterpenos oxigenados (linalol e borneol), fenois monoterpenos (principalmente timol) e seus derivados (principalmente éter metílico de carvacrol), sesquiterpenos (principalmente β -cariofileno) e seus derivados oxigenados (por exemplo, óxido de cariofileno) em comparação às plantas mais jovens, de dois anos. Por outro lado, a planta jovem, coletada em junho ou julho, verão no mediterrâneo, pouco antes do final do ciclo vegetativo, proporcionou o melhor rendimento de óleo (1,2%) e também o maior teor de fenois monoterpenos (timol: 51,2% e carvacrol: 4%). Este último período de crescimento pode representar o melhor tempo de colheita de plantas de tomilho jovens, a fim de obter um óleo essencial com melhor qualidade e quantidade.

Oliveira et al. (2011) elaboraram um revestimento à base de gelatina comestível em pó contendo 2% (v/v) de OE de folhas *T. vulgaris* (RT). O revestimento foi usado em carne bovina crua (*Quadriceps femoris*), submergida em Caldo Triptona de Soja (TSB) contendo *L. monocytogenes* por 10 minutos e secos suspensos por um suporte. Esse experimento constatou que os revestimentos contendo OE de *T. vulgaris* foram efetivos contra *L. monocytogenes* inoculada em carne bovina crua, já que suas contagens médias se apresentaram inferiores às dos tratamentos controle.

Freire et al. (2014) testaram a ação antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de tomilho, entre outros, contra cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), mostrando que este óleo apresentou bom desempenho ao se avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), por meio da técnica da microdiluição e pela determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), através da semeadura em placas de petri. A CBM do óleo essencial de tomilho foi 0,25%.

2.1.7 Alecrim

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é um subarbusto, pertencente à família *Lamiaceae*, muito ramificado, sempre verde, com hastes lenhosas, folhas pequenas, sésseis, finas, opostas e lanceoladas, com a parte inferior de cor verde acinzentada e a superior prateada. Tem sabor picante e agridoce e aroma forte e agradável, sendo muito utilizada, atualmente, para fins culinários, medicinais e aromáticos, sendo o óleo essencial aplicado em cosméticos e perfumaria (MAY et al., 2010). É nativo do Mediterrâneo, mas é cultivado também na Ásia

Central, Índia, Sudeste Asiático, África do Sul, Austrália, Estados Unidos e na região sul do Brasil (CARVALHO JÚNIOR, 2004).

O óleo essencial de alecrim apresenta como principais constituintes α -pineno (25%), β -pineno, cineol (15-30%) e cânfora (10-25%). Possui álcoois monoterpênicos, como o borneol e ésteres, como o acetato de bornila (MARANGONI; MOURA, 2015).

Wang et al. (2008) realizaram análise por cromatografia gasosa do OE de alecrim, identificando 19 compostos, representando 97,97% do óleo, sendo os seus principais constituintes: 1,8-cineol (27,23%), α -pineno (19,43%), cânfora (14,26%), canfeno (11,52%) e β -pineno (6,71%).

A atividade antimicrobiana do alecrim foi testada contra 13 cepas bacterianas e seis fungos, incluindo *Candida albicans* e dermatomicetos. A atividade antibacteriana mais destacada foi expressa em *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *S. enteritidis* e *Shigella sonnei*, além de significativa atividade antifúngica. Também foi avaliada a atividade antioxidante como a capacidade de eliminação de radicais livres, juntamente com o efeito sobre a peroxidação lipídica. O OE de alecrim foi capaz de reduzir fortemente a formação de radicais de maneira dose-dependente (BOZIN et al., 2007).

2.1.8 Gengibre

O gengibre (*Zingiber officinale*) é uma planta herbácea perene, originário da China, Índia e Malásia, pertencente à família *Zingiberaceae*, de rizoma tuberoso, aromático e com sabor picante (BALME, 1978; ELPO; NEGRELLE, 2004; GRANDI, 2014).

O óleo essencial de gengibre apresenta como principal constituinte hidrocarbonetos como o zingibereno (principal), b-bisaboleno, sesquiterpenos, como zingiberol e zingiberenol, vários hidrocarbonetos monoterpênicos, além de álcoois e aldeídos (NEWALL, 2002).

Majolo et al. (2014) identificaram no óleo essencial de gengibre, em cromatografia a gás com coluna capilar, 20 componentes, representando 98,3% do óleo essencial, sendo o geranial (23,9%), neral (17,2%), 1,8-cineol (16,0%) e canfeno (11,4%) os compostos majoritários.

Esses mesmos autores supracitados avaliaram o óleo essencial de gengibre frente a 14 salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. Este óleo se mostrou eficiente tanto em termos de ação bacteriostática (concentração inibitória mínima de 2500 a 5000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) quanto bactericida (concentração bactericida mínima de 5000 a 10000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), mesmo que

em duas das amostras houvesse resistência, representando uma alternativa para o controle de *Salmonella* entérica, apesar de serem recomendados mais estudos abordando o sinergismo com alimentos (MAJOLO et al., 2014).

2.1.9 Manjericão

O manjericão (*Ocimum basilicum*) é um subarbusto aromático, ereto, sendo uma planta herbácea anual ou perene, pertencente à família *Lamiaceae*, de altura média de 40 a 50 centímetros, podendo atingir ou ultrapassar um metro de altura em boas condições de solo, clima e espécie (GRANDI, 2014; MACHADO et al., 2012; VON HERTWIG, 1991).

Possui muitas ramificações, com folhas carnudas, pecioladas, opostas, ovadas inteiras ou dentadas e glabras, que variam na coloração de verde, violácea ou levemente avermelhada. A planta exala diferentes aromas, a depender da espécie e cultivo, apresentando aroma doce, canforáceo ou de hortelã-pimenta, com sabor picante característico (VON HERTWIG, 1991). *O. basilicum* é um condimento de grande valor econômico, com uso nas áreas ornamental, condimentar, medicinal, aromático, na indústria de perfumaria e cosméticos (DIAS, 2011).

Por apresentar polinização cruzada possui uma gama de subespécies, variedades e formas (VON HERTWIG, 1991). É relatado que esta planta apresenta entre 50 e 150 espécies na Ásia Tropical, África, América Central e América do Sul (MACHADO et al., 2012).

Os óleos essenciais do manjericão consistem de linalol como o componente mais abundante (56,7-60,6%), seguido por epi- α -cadinol (8,6-11,4%), α -bergamoteno (7,4-9,2%) e γ -cadineno (3,2-5,4%). Há uma variação sazonal, já que amostras coletadas no inverno se mostraram mais ricas em monoterpenos oxigenados (68,9%), enquanto as do verão foram maiores nos hidrocarbonetos sesquiterpênicos (24,3%) (HUSSAIN et al., 2008).

Ao se investigar a atividade antioxidante medida pela capacidade de eliminação de radicais livres, o branqueamento de β -caroteno no sistema de ácido linoleico e a inibição da oxidação do ácido linoleico, o OE de manjericão apresentou bom desempenho, assim como atividade antimicrobiana efetiva contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pasteurella multocida*, e fungos patogênicos *Aspergillus niger*, *Mucor muco*, *Fusarium solani*, *Botryodiplodia theobromae* (HUSSAIN et al., 2008).

Martins et al. (2010) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial do manjericão (*Ocimum basilicum* Linn.), extraído pelo processo de hidrodestilação com extrator de Clevenger, frente à *Escherichia coli* enteropatogênica isolada de alfaces, pelo Método de

Difusão em Disco (MDD). O OE do manjeriço apresentou efeito inibitório contra os sorogrupos de *E. coli* EPEC testados. O efeito inibitório foi atribuído pelos autores à presença do metil chavicol e linalol, os constituintes majoritários do óleo.

Machado et al. (2012) testaram duas espécies de manjeriço em amostras de bactérias ligadas à deterioração e segurança microbiológica de alimentos: *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*. Os métodos utilizados foram difusão em ágar e microdiluição em caldo para determinar a atividade antimicrobiana e a concentração inibitória mínima (CIM) de cada óleo para cada espécie microbiana. Ambas as espécies de *Ocimum* apresentam atividade contra todas as cepas microbianas testadas. O *S. aureus* foi a espécie microbiana mais sensível, apresentando os maiores halos de inibição e os menores valores da CIM.

2.1.10 Pimenta-preta

A pimenta-preta, também chamada de pimenta-do-reino ou pimenta da Índia (*Piper nigrum*), é uma planta nativa da Índia Oriental, pertencente à família *Piperaceae* (ALMEIDA, 1993). É considerada a mais importante especiaria consumida no mundo e um dos principais produtos agrícolas, sendo que seus frutos são exportados mundialmente, dado o seu uso como condimento (DUARTE et al., 2006). Os frutos colhidos antes da maturação completa e dessecados dão origem à pimenta-preta. Os frutos maduros, livres da camada exterior e carnosa do pericarpo, dão origem à pimenta-branca (ALMEIDA, 1993).

Segundo estudos por meio de análise cromatográfica de Lima et al. (2009), o óleo essencial de pimenta negra tem como composto majoritário o safrol (82,0%) e, em baixas concentrações, o α -pineno (0,6%), δ -3-careno (1,4%) e α -terpinoleno (13,5%).

Ismail e Pierson (1988) testaram o efeito de diversos óleos essenciais, dentre eles de pimenta preta, na germinação, desenvolvimento pós-germinação e produção de toxina de *Clostridium botulinum*. O óleo de pimenta preta se mostrou ativo contra a bactéria, porém com atividade menor em relação a outros óleos na inibição da germinação, sendo um inibidor mais potente do desenvolvimento vegetativo.

Martinelli et al. (2016) testaram os óleos essenciais de oito tipos de pimentas, relatando atividade significativa dos óleos essenciais. Os melhores resultados para as bactérias estudadas (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Bacillus*

cereus ATCC 11778) foram de *P. nigrum*, porém na sua variedade branca, com as sementes maduras.

2.2 Patógenos alimentares

A Doença de Origem Alimentar ocorre após a ingestão de alimentos contaminados com microrganismos ou toxinas (FORSYTHE, 2013). A ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) vem emergindo mundialmente devido a fatores como o aumento populacional e a urbanização desordenada, a presença de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, a necessidade de produção de alimentos em grande escala, além do controle deficiente dos órgãos públicos e privados em relação à qualidade dos alimentos ofertados à população, o surgimento de novas modalidades de produção, o aumento no uso de aditivos e as mudanças de hábitos alimentares, mudanças ambientais e a facilidade atual de deslocamento da população (BRASIL, 2010).

Os critérios para a caracterização da importância epidemiológica de uma agente infectante e seu estabelecimento como padrão microbiológico em um alimento, isolado ou em conjunto, são baseados no interesse sanitário, na descrição dos microrganismos e/ou suas toxinas, na classificação dos alimentos segundo o risco epidemiológico, nos métodos de análise disponíveis, nos planos de amostragem para a determinação dos números e tamanho de unidades amostrais a serem analisadas e nas normas e padrões de organismos internacionalmente reconhecidos (como o *Codex Alimentarius*), não excluindo outros critérios, justificados por evidências científicas (BRASIL, 2001).

Os sintomas mais comuns de DTA incluem dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e, por vezes, febre – sintomas que podem durar de poucas horas até dias. Alguns agentes etiológicos são capazes de causar quadros mais graves e prolongados, apresentando desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda e insuficiência respiratória, até sequelas permanentes e óbito. Poucos casos são registrados, gerando um grande problema de subnotificação (BRASIL, 2010).

As DTA resultam em diversos prejuízos que têm grande impacto na economia. Os prejuízos são relacionados à perda de renda dos indivíduos afetados, custos com cuidados médicos, perda de produtividade, custos de investigação de surtos, perda de renda por fechamento de negócios, perda de vendas quando os consumidores evitam certo produto (FORSYTHE, 2013).

Dada a frequência e/ou, por vezes, a gravidade das doenças transmitidas por alimentos, elas são responsáveis por sérios problemas de saúde pública e expressivas perdas econômicas (OLIVEIRA et al., 2010).

2.2.1 Coliformes a 45°C

O grupo dos coliformes a 45°C é restrito aos microrganismos que vivem no trato gastrointestinal de humanos e de animais de sangue quente e que inclui, pelo menos, quatro gêneros: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*. A *Escherichia coli* é a mais conhecida e a mais facilmente distinguível dos microrganismos não fecais, sendo o melhor indicador de contaminação fecal (SANGALETTI et al., 2009). É uma bactéria Gram-negativa, não formadora de esporos e anaeróbia facultativa (FORSYTHE, 2013). Apesar de ser uma bactéria presente na microbiota normal do intestino de animais e de humanos e, como parte da flora normal, podendo proporcionar benefícios para a saúde do hospedeiro, como, por exemplo, impedir a colonização do intestino por patógenos nocivos, existem cepas de *E. coli* reconhecidamente patogênicas que podem causar gastroenterites, diarreia, vômito, cólica abdominal, febre e até complicações sérias, levando à sequelas ou óbito (EDUARDO et al., 2009; FDA, 2012).

As *E. coli* patogênicas são geralmente agrupadas com base em suas propriedades de virulência ou fatores que elas carregam. No entanto, alguns grupos podem compartilhar características semelhantes de virulência. Atualmente, há seis cepas patogênicas reconhecidas: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC), sendo que os quatro primeiros grupos (ETEC, EPEC, EHEC e EIEC) são bem conhecidos como causadores de doenças transmitidas por alimentos ou água (FDA, 2012).

A ETEC (enterotoxigênica) causa gastroenterite em humanos e é mais conhecida como o agente causador da diarreia dos viajantes, geralmente autolimitada e leve. No entanto, há formas severas, similares à cólera, que resultam em desidratação grave. É também uma causa importante de diarreia em bebês, em países menos desenvolvidos. A *E. coli* EPEC (enteropatogênica) possui fatores de aderência à células epiteliais intestinais. As infecções por essa cepa continuam a ser uma causa comum de diarreia infantil nos países em desenvolvimento, mas surtos são esporádicos. A EHEC (enterohemorrágica), cuja variedade

mais conhecida é a *E. coli* O157:H7, produz a toxina *Shiga*, que pode causar doenças graves, incluindo colite hemorrágica, problemas de coagulação sanguínea, insuficiência renal e morte. A EIEC (enteroinvasora) causa uma forma leve de disenteria bacilar, sendo seres humanos infectados seus únicos reservatórios conhecidos (FDA, 2012).

As infecções por *E. coli* geralmente estão ligadas ao consumo de alimentos contaminados através de manipuladores infectados, pelo uso de água contaminada durante a preparação ou pelo consumo direto de água contaminada. Humanos são a fonte mais provável, pois essas bactérias são frequentemente encontradas em fezes de portadores assintomáticos (FDA, 2012).

Exemplos de alimentos implicados em surtos de ETEC incluem queijo *Brie*, peru, maionese, carne de caranguejo, comida pronta e saladas. Surtos de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) já foram atribuídos a muitos tipos de alimentos, como carnes moídas, leite não pasteurizado, suco de fruta não pasteurizado, alface, espinafre, brotos e massas congeladas (FDA, 2012).

2.2.2 Estafilococos coagulase positiva

Os *Staphylococcus* sp. encontram-se amplamente disseminados no ambiente, sendo que seu reservatório principal são humanos e outros animais (EDUARDO et al., 2009). São cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, que se agrupam em pares ou cachos (FORSYTHE, 2013). Eles são patógenos humanos versáteis, capazes de causar intoxicação alimentar, síndrome de choque tóxico, pneumonia, infecções hospitalares e bacteremia nosocomial (FDA, 2012).

Essas bactérias causam intoxicação alimentar pela produção de enterotoxinas proteicas altamente termoestáveis e resistentes a enzimas proteolíticas, como tripsina e pepsina, o que lhes permite transitar intactas pelo trato digestivo. Os dados de surtos por esses microrganismos são subestimados, mas, provavelmente, estão entre os mais prevalentes. O quadro clínico de intoxicação geralmente tem início abrupto, com sinais como náusea, vômito e cólicas, prostração e pressão baixa. Os seres humanos, na maioria das vezes, são os reservatórios e a transmissão ocorre devido a ferimentos nas mãos, lesões purulentas ou secreções que contaminam os alimentos durante sua manipulação e conservação. Cerca de 25% das pessoas são portadores nasais (FRANCO; LANDGRAF, 2008; EDUARDO et al., 2009). Apesar de manipuladores de alimentos serem frequentemente a fonte de contaminação

de alimentos em surtos de estafilococos, equipamentos e superfícies ambientais também podem ser fontes (FDA, 2012).

Alimentos frequentemente implicados em intoxicação alimentar estafilocócica incluem carne e produtos cárneos, produtos de aves e ovos, saladas (principalmente as com ovo, atum, frango, batata e macarrão), produtos de padaria, tais como bolos e tortas recheados com creme, recheios de sanduíche e leite e produtos lácteos. Alimentos que requerem maior manuseio durante a preparação e que são mantidos acima das temperaturas de refrigeração adequadas por um longo período após a preparação estão frequentemente envolvidos. A menos que processos de calor sejam aplicados, espera-se que existam estafilococos em todo e qualquer alimento manipulado diretamente por humanos ou de origem animal. *S. aureus* é um dos patógenos não formadores de esporos mais resistentes e, além disso, a destruição de células viáveis pelo calor não elimina a atividade biológica das enterotoxinas termoestáveis pré-formadas, que podem permanecer biologicamente ativas. Evitar o abuso de tempo e temperatura de produtos alimentícios que apresentam alto risco de conter *S. aureus* é essencial na prevenção da proliferação da bactéria e subsequente produção de enterotoxina (FDA, 2012).

2.2.3 *Salmonella* sp.

As *Salmonella* sp. pertencem à família *Enterobacteriaceae*, sendo comumente encontradas em derivados lácteos (GRANDI; ROSSI, 2006). São bastonetes curtos, Gram-negativos, anaeróbios facultativos, com flagelos peritríquios. Não formam esporos como forma de resistência ao meio. São consideradas um dos agentes transmissores de doenças transmitidas por alimentos mais prevalentes no mundo. Estão amplamente distribuídas na natureza, sendo o trato gastrointestinal de humanos e animais, principalmente de aves, seu reservatório (ASSIS, 2014).

As salmonelas de diferentes espécies causam diferentes infecções a partir da invasão da mucosa intestinal. *S. typhi* causa febre tifoide, *S. paratyphi* febres entéricas e as demais causam enterocolites (ASSIS, 2014). Nas toxinfecções em humanos, os sintomas são: febre, cólicas abdominais e diarreia, com duração média de 4 a 7 dias e geralmente autolimitada. Em pacientes idosos, crianças, gestantes e pessoas imunodeprimidas, a doença pode tornar-se sistêmica, com casos graves que podem levar ao óbito (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Sua distribuição é mundial, sendo os alimentos os principais veículos de sua transmissão. São responsáveis por significantes índices de morbidade e mortalidade, tanto em

países emergentes quanto em desenvolvidos, causando surtos geralmente envolvendo alimentos de origem animal, como ovos, aves, carnes e produtos lácteos e também produtos agrícolas não processados. A contaminação de origem fecal é geralmente a fonte para os produtos agrícolas, pela exposição à água contaminada; para o leite e os ovos, por meio da exposição direta; e para a carne, usualmente durante as operações de abate. É eliminada em grande número nas fezes, contaminando o solo e a água, sendo ainda encontrada em efluentes de água de esgoto, como resultado de contaminação fecal (BRASIL, 2011).

O período de incubação é de 12 a 36 horas, podendo chegar a 72 horas. São sensíveis a pHs superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 e temperaturas abaixo de 5°C e acima de 47°C (ASSIS, 2014). Pode sobreviver no meio ambiente por muito tempo, em particular na matéria orgânica e material fecal, onde pode permanecer viável por longo período, chegando a meses e anos (BRASIL, 2011).

Este microrganismo é altamente resistente a antibióticos (FRANCO; LANDGRAF, 2008; EDUARDO et al., 2009) e essa emergência de resistência de *Salmonella* aos antimicrobianos torna-se uma ameaça tanto à saúde humana quanto à animal e é ocasionada pelo uso massivo dessas drogas na medicina humana e veterinária (SANTURIO et al., 2007; SU et al., 2004; LEVINE; SIMON, 2018).

2.2.4 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva e móvel por meio de flagelos. É causadora de uma infecção de origem alimentar denominada listeriose. Tem distribuição ubíqua, sendo encontrada no solo, água, vegetais e animais, incluindo aqueles portadores do microrganismo (FORSYTHE, 2013; LADO; YOUSEF, 2006).

Este microrganismo merece destaque na área da Ciência e Tecnologia de Alimentos por sua elevada patogenicidade, capacidade de formação de biofilmes em ambientes de processamento de alimentos, característica psicrotrófica e sobrevivência em condições adversas, como baixos valores de pH e atividade de água (LADO; YOUSEF, 2006).

Segundo Eduardo et al. (2009), a bactéria é resistente aos efeitos do congelamento, secagem e calor, ainda que não forme esporos. Ela tem a capacidade de se multiplicar em temperatura de refrigeração e em ambientes com baixa atividade de água, suporta ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, pode se multiplicar em presença de até 10% de cloreto de sódio e, também, em ampla faixa de pH (4,4 – 9,0). Suas células vegetativas são as de maior resistência térmica dentre os microrganismos patogênicos (FORSYTHE, 2013;

SILVA et al., 2011).

Essa bactéria pode causar um quadro de diarreia e vômito, seguidos de sintomas mais graves como dores de cabeça, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões, sendo uma das principais causas de meningite aguda infecciosa (PERESI et al., 2001). Outros danos podem ocorrer, como endocardite, lesões granulomatosas no fígado e outros órgãos, abscessos internos ou externos e lesão cutânea papular ou pustular. Essas desordens comumente são precedidas por sintomas semelhantes aos da gripe, com febre persistente. Infecções assintomáticas ocorrem em todas as idades, embora sejam de maior preocupação aquelas que acontecem na gravidez (EDUARDO et al., 2009).

Nos casos de infecção perinatal, listeriose materna, há a possibilidade de aborto, principalmente no final do terceiro trimestre da gravidez, apesar de terem sido encontrados casos tanto no primeiro quanto no segundo trimestres (FARBER; PETERKIN, 1991).

Queijos em processo de maturação, sorvetes, água, vegetais crus, patês de carnes, molhos de carne crua fermentada, aves cruas ou cozidas, peixes (inclusive defumados) e frutos do mar podem constituir meio para o seu crescimento e estão frequentemente associados aos surtos (EDUARDO et al., 2009).

No Brasil, a listeriose é subdiagnosticada e subnotificada (SILVA et al., 2011). Porém, os baixos índices devem ser interpretados com cuidado, já que a intensa flora competitiva contaminante e a presença de inseticidas e resíduos antimicrobianos no leite usado como matéria-prima podem interferir na eficiência dos procedimentos de isolamento ou detecção de patógenos. Além disso, microrganismos produtores de bacteriocina (peptídeos antimicrobianos) também podem inibir o crescimento da *L. monocytogenes* (NERO et al., 2004).

Embora seja rara entre as doenças transmitidas por alimentos, é uma importante causa de mortes e hospitalizações. Dados dos EUA mostram que, de 1998 até 2005, a incidência de doenças causadas por patógenos de origem alimentar diminuiu, como, por exemplo, pelos sorotipos de *Salmonella* e pela *Escherichia coli* O157:H7. O mesmo não foi observado para *L. monocytogenes*, pois, a partir de 2002, a incidência de infecções causadas por esse patógeno voltou a aumentar. Apesar de ser exigida ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g de alimento, não há evidência epidemiológica de que haja maior proteção ao consumidor com essa medida (SILVA et al., 2011; FRANCO; LANDGRAF, 2008; FORSYTHE, 2013).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os óleos essenciais vegetais podem ser uma alternativa aos aditivos artificiais, exercendo ação inibitória em microrganismos patogênicos e deteriorantes relacionados aos alimentos, como mostram diversas pesquisas. Eles demonstram eficiência na conservação dos produtos e na prevenção de toxinfecções.

São necessários mais estudos, tanto na atividade *in vitro* quanto em testes com alimentos, aliando a capacidade antimicrobiana às análises sensoriais, além da avaliação do custo-benefício, para verificar o potencial do uso dos óleos essenciais nas indústrias de alimentos.

4 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, 1993. 341p.
- ASSIS, L. **Alimentos seguros**: ferramentas para gestão e controle da produção e distribuição. 2.ed.2 reimp. Rio de Janeiro: Senac Nacional, 2014, 376p.
- BAĞCI, Y. et al. The Essential Oil Compositions of *Origanum majorana* L. cultivated in Konya and Collected from Mersin-Turkey. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**. V.51, n.3., p. 463-469, Jul-Set, 2017 (edição especial).
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BALME, F. **Plantas medicinais**. São Paulo: Hemus, 1978. 398p.
- BORGES, A. M. et al. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, n.4, p.656-665, 2012.
- BOZIN, B. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** .v. 55,n.19,p.7879-7885, 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o “Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos”.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o “Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos”.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.**: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella* / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 60 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.158 p.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods – a review. **Internation Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.
- CARRIJO, K. F. et al. Condimentos e especiarias empregados no processamento de alimentos: considerações a respeito de seu controle físico-químico. **PUBVET**, Londrina, V. 6, N. 26, Ed. 213, Art. 1419, 2012.

CASTORANI; G. M.; FIGUEIREDO; L. A. **Atividade antimicrobiana in vitro de óleos essenciais contra patógenos alimentares**. 2018. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para colação de grau no curso de Farmácia da Universidade Federal de Alfenas – MG. Área de concentração: Microbiologia de Alimentos, Alfenas-MG, 2018

CARVALHO JUNIOR, R. N. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica**: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo. 2004. 165f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

COSTA, D. C. et al. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, vol.18, n.1 Botucatu. Jan./Mar. 2015.

DIAS, N. A. A. **Avaliações microbiológica e físico-química de mortadelas elaboradas com óleos essenciais e inoculados com *Clostridium perfringens* tipo b A**. 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

DUARTE, M.C.T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, n.111(2007), p. 197–201, maio. 2007.

DUARTE, M. L. R. *et al.* **A cultura da-pimenta-do-reino**. 2. ed. rev. amp. – Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 73 p.

EDUARDO, M. B. P. et al. **Principais doenças emergentes e reemergentes – atualização e perspectivas**. Documento que embasou o tema central do III Simpósio Internacional de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, Centro de Convenções Rebouças, São Paulo-SP, 21 de Novembro de 2005. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/3simpo_princdoencas.pdf> Acesso em: 18/04/2016.

ELPO, E. R. S.; NEGRELLE, R. R. B. *Zingiber officinale* ROSCOE: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 27-32, Jan.- Jun./2004.

ERNANDES, F. M. P.G. et al. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em micro-organismos isolados do meio ambiente. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 193-206, jul./dez., 2007.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. **Microbiological reviews**, Ottawa, v. 55, n. 3, p. 476-511, set. 1991.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*

FREIRE, I.C.M. et al. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Campinas, v.16,

n.2, supl. I, p.372-377, 2014.

FDA-FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**. Second Edition, 2012, 292p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª Ed., Artmed, 2013, 607 p.

GAMMARIELLO, D. et al. Effects of natural compounds on microbial safety and sensory quality of Fior di Latte cheese, a typical Italian cheese. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.4138- 4146, 2008.

GRANDI, A. Z; ROSSI, D. A., **Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado na cidade de Uberlândia – MG**. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/viewFile/3825/2830>> Acesso em: 11/03/2016.

GRANDI, T. S. M. **Tratado das plantas medicinais: mineiras, nativas e cultivadas**. 1ed. Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, 2014. 1204 p.

HAFEMANN, S. P. G et al. Ricota com adição de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* linneus): avaliação físico-química, sensorial e microbiológica. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.17, n.3, p.317-323, 2015.

HIRASA, K.; TAKEMASA, M. **Spice Science and Technology**, Marcel Decker, New York, 1998, 221p.

HUDAIB, M. et al. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 4, 20, p. 691-700, jul. 2002.

HUSSAIN, A. I, et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v.108, n.3, p. 986-995, 2008.

IETSWAART, J. H. A Taxonomie Revision of the Genus *Origanum* (*Labiatae*). Leiden University Press (**Leiden Botanical Series**, vol. 4). The Hague/Boston/London, 1980. 153 p.

INDUI, M. et al. Atividade antimicrobiana de condimentos do sul da Índia sobre *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Aeromonas hydrophila*. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 37, n. 2, abr./jun. 2006.

ISMAIEL, A.; PIERSON, M. D. Inhibition of growth and germination of *Clostridium botulinum* 33A, 40B and 1623E by essential oils of spices. **Journal of Food Science**, v.5, p.1676-1678, 1990.

JAKIEMIU, E.A.R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2008. 89 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal refrigerada através do uso do óleo essencial de orégano e nisina**. 2006.106 f. Dissertação para obtenção do grau de mestre (pós-graduação em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LADO, B. H.; YOUSEF, A. E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors. In: RYSER, E.; MARTH, E.H. (Eds.). **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 157-213

LEVINE, M. M.; SIMON, R. The Gathering Storm: Is Untreatable Typhoid Fever on the Way? **Bio-American Society for Microbiology**, v. 9, n.2, março/abril 2018.

LIMA, R. K. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-docartucho do milho *Spodoptera rugiperda* (J. E. 50Smith,1797) (*Lepidoptera: Noctuidae*). **Acta Amazonica**, Manaus, v.39, n. 2, p. 377 –382, 2009.

MACHADO, T. F. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjeriço contra patógenos e deterioradores de alimentos. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012. 16 p.

MAJOLO, C. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 505-512, Sept. 2014.

MARANGONI, C.; MOURA, N. F. Atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Rosmarinus officinalis* L. em salame tipo italiano. **Revista Científica Tecnológica**, v. 2, n. 1, p. 109-118, 2015.

MARTINELLI, L. et al. Antimicrobial activity and chemical constituents of essential oils and oleoresins extracted from eight pepper species. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 5, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000500451&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 30/11/2017.

MARTINS, A. G. L. A. Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica isolados de alfaces. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.40, n.8, p.1791-1796, agosto de 2010.

MAY, A. et al. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 195-200, 2010.

MILLEZZI, A. F. et al. Sensibilidade de bactérias patogênicas em alimentos a óleos essenciais de plantas medicinais e condimentares. **Higiene Alimentar**, São Paulo-SP, v. 30, n. 254/255, p. 117-122, março/abril de 2016.

MOREIRA, S. P; OKURA, M. H. Qualidade microbiológica de ricotas comercializadas na região do Triângulo Mineiro e do Interior de São Paulo. **Higiene Alimentar**, São Paulo-SP, v. 31, n. 266/267, p. 96-101, março/abril de 2017.

MORO, A. et al. Dairy matrix effect on the transference of rosemary essential oil compounds during cheese making. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.95, p.1507-1513, 2015. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.6853/epdf>>. Acesso em 17/06/2018.

NERO, L. A. et al. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 211-215, Setembro de 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S15173822004000200007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 07 de junho de 2018.

NEWALL, C. A. **Plantas medicinais: guia para profissional de saúde**. São Paulo: Editorial Premier, 2002. 308 p.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I. L., Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes microbianos. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, nº83, p 63-70, abril. 2001.

SANGALETTI, N. et al. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 262-269, junho, 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612009000200004&lng=en&nrm=iso> Acesso em: 18/02/2016.

SANTOS, C.H.S, PICCOLI R.H, TEBALDI V.M.R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 2017; 76:e1719

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

SEGREDOS e virtudes das plantas medicinais. Lisboa: Seleções do Reader's Digest,1983. 463 p.

SILVA, Á. S. et al. *Listeria monocytogenes* em Leite e Produtos Lácteos no Brasil: Uma Revisão. **Ciência, Biologia e Saúde**, v.13, n.1, p.:59-67, 2011.

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

SOUZA, A. A. et al. Determination of minimum bactericidal concentration of sixteen essential oils on enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. vol.18, n.1 Botucatu Jan./Mar. 2016.

SU, L. et al. Antimicrobial Resistance in Nontyphoid *Salmonella* Serotypes: A Global Challenge. **Clinical Infectious Diseases**. v. 39, n.4, p.546–551, Aug 2004.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice

compounds in food. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1199–1218, Set., 2010.

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

OLIVEIRA, A. B. et al. Doenças Transmitidas por Alimentos: Principais Agentes Etiológicos, Alimentos Envolvidos e Fatores Predisponentes. **Clinical and Biomedical Research**, v. 30, n.3, p.279-285, 2010.

VÁGI, E. et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. **Food Research International**, v. 38, p. 51-57, 2005.

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.1, p.57-67, 2012.

VERMA, R. S. et al. Chemical Diversity in Indian Oregano (*Origanum vulgare* L.). **Chemistry & Biodiversity** – V.7, p.2054-2064, 2010.

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

WANG, W. et al. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components, **Food Chemistry**, V.108, n. 3, p.1019-1022, 2008. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.046>> Acesso em 23/07/2019.

CAPÍTULO 2

Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares

REIS, J. B.

Núcleo de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais (IFSULDEMINAS) – campus Machado, CEP: 3770-000, Machado/MG, Brasil

Resumo

Os óleos essenciais (OE) são compostos presentes naturalmente em plantas e conseqüentemente, nas especiarias, exercendo funções biológicas relacionadas aos seus mecanismos de defesa. Os óleos essenciais, antimicrobianos naturais, tem potencial para ser usados como aditivos em substituição aos conservantes artificiais tradicionais. Nesse contexto, este estudo buscou estudar a ação dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), manjerona (*Origanum majorana*), tomilho (*Thymus vulgaris*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), gengibre (*Zingiber officinale*), manjericão (*Ocimum basilicum*) e de pimenta-preta (*Piper nigrum*) contra patógenos alimentares de importância epidemiológica por meio dos testes de sensibilidade de diluição em ágar e microdiluição. No teste de diluição em ágar, notadamente, o óleo essencial de orégano mostrou-se efetivo contra todos os contaminantes utilizados, enquanto os óleos de manjerona, manjericão e tomilho apresentaram bom desempenho, apesar de não terem inibido todos os microrganismos. O óleo essencial de gengibre apresentou fraca atividade, enquanto que os óleos de alecrim e de pimenta preta não apresentaram atividade antimicrobiana. Pelo teste de microdiluição, os óleos essenciais de orégano, tomilho, manjerona e manjericão apresentaram elevada atividade antimicrobiana, especialmente o OE de manjerona. Entretanto, os óleos essenciais de alecrim, gengibre e pimenta-preta não obtiveram resultado satisfatório no segundo método executado. Os resultados obtidos demonstram que alguns óleos essenciais podem ser empregados na indústria de alimentos como uma alternativa para o controle microbiológico.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Patógenos alimentares. Orégano.

Introdução

Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são compostos presentes naturalmente em plantas, notadamente nas plantas usadas como temperos na rotina, as especiarias, que são as partes secas de uma planta usadas para conferir sabor e efeito pungente aos alimentos (Hirasa & Tokemasa, 1998). São voláteis, odoríferos e imiscíveis, ou muito pouco miscíveis em água, e são produzidos nos diferentes órgãos vegetais, estando contidos em estruturas especiais ou conjuntos celulares denominados aparelhos secretores (Carrijo et al., 2012). Atuam em funções biológicas importantes à sobrevivência das plantas relacionadas aos mecanismos de defesa, como a proteção contra excesso de ultravioleta, microrganismos, insetos e animais (Millezzi et al., 2016; Costa et al., 2015).

Quimicamente, os OEs apresentam-se como uma mistura de componentes voláteis de baixo peso molecular, tais como terpenóides, fenilpropanóides e compostos contendo enxofre e nitrogênio. A atividade antimicrobiana dos OEs geralmente está associada a compostos como eugenol, alicina, timol e carvacrol e a substâncias como o linalol, sabineno, mentol, mirceno e camphene. Esses princípios ativos, graças à sua característica hidrofóbica, atuam rompendo a parede celular microbiana, fazendo-a perder sua funcionalidade (Forsythe, 2013; Hirasa & Takemasa, 1998; Moro et al., 2015).

Os OEs são utilizados há várias décadas nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos e, mais recentemente, estão sendo estudados como aromatizantes, flavorizantes e conservantes naturais pelas indústrias alimentícias (Costa et al., 2015). Na sua condição de antimicrobianos naturais têm potencial para serem usados no controle de microrganismos, reduzindo a necessidade de aditivos antimicrobianos, controlando a contaminação em alimentos e melhorando as tecnologias de extensão da vida de prateleira, para eliminar patógenos indesejáveis e retardar a deterioração dos produtos (Tajkarimi; Ibrahim; Cliver, 2010).

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias tem sido demonstrada em alimentos por diferentes estudos (Castorani & Figueiredo, 2018; Ernandes et al., 2007; Freire et al., 2014; Indui et al., 2006; Kruger, 2006; Martinelli et al., 2017; Oliveira et al., 2011; Santurio et al., 2007; Souza et al., 2016; Trajano et al., 2009) e, aliados à busca atual dos consumidores por produtos mais saudáveis e “naturais”, eles surgem como uma alternativa aos conservantes tradicionais.

Neste contexto, este estudo tem como finalidade estudar a ação dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), manjerona (*Origanum majorana*), tomilho (*Thymus vulgaris*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), gengibre (*Zingiber officinale*), manjericão (*Ocimum basilicum*) e de pimenta-preta (*Piper nigrum*) contra patógenos alimentares de importância epidemiológica: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*.

As informações sobre os óleos estudados seguem no quadro abaixo.

Quadro 1.

Óleos essenciais estudados com as respectivas famílias e composições.

Especiaria	Família	Composição (FERQUIMA®)
Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	<i>Lamiaceae</i>	Carvacrol- 72%, Timol-2%, γ -terpineno-4,5%, p-cimeno-4%, linalol- 4%.
Manjerona (<i>Origanum majorana</i>)	<i>Lamiaceae</i>	Terpineno-4-ol- 22%, sabineno- 16% e γ -terpineno -13%.
Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	<i>Lamiaceae</i>	Timol- 50%, p-cimeno- 30%, γ -terpineno- 6%, linalol-5% carvacrol-5% α -pineno-2%, mirceno-2%.
Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	<i>Lamiaceae</i>	1,8 cineol- 40%, cânfora-15%, alfa pineno-13%, beta pineno- 7% e limoneno -3%.
Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	<i>Zingiberaceae</i>	Alfa-zingibereno- 33%, beta-sesquifelandreno 13%.
Manjericão (<i>Ocimum basilicum</i>)	<i>Lamiaceae</i>	Metilchavicol-85%, eucaliptol-3%, bergamoteno (2,7%), transo cimento- 2%, linalol-0,8% e eugenol, (0,6%).
Pimenta preta (<i>Piper nigrum</i>)	<i>Piperaceae</i>	Safrol- 82,0%), α -pineno- 0,6%, δ -3-careno 1,4% e α -terpinoleno-13,5%.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano foi avaliada por Santurio et al. (2007) através de microdiluição em caldo frente a amostras de *Salmonella enterica* isoladas de carcaças de aves, concluindo que o óleo essencial de orégano apresenta forte atividade antibacteriana.

Castorani & Figueiredo (2018) mostraram a ação antimicrobiana do OE de manjerona contra diversos microrganismos no sistema de difusão em ágar e também em microdiluição, quando esse mostrou a maior atividade em relação aos demais óleos avaliados contra os patógenos alimentares *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *L. monocytogenes* e não foi ativo contra *Salmonella*.

Freire et al. (2014) testaram a ação antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de tomilho, entre outros, contra cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), mostrando que este óleo apresentou bom desempenho ao se avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio da técnica da microdiluição e pela determinação da Concentração Bactericida Mínima, através da semeadura em placas de petri. A CBM do óleo essencial de tomilho foi 0,25%.

Majolo et al. (2014) avaliaram o óleo essencial de gengibre frente a 14 salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado, e este se mostrou eficiente tanto em termos de ação bacteriostática quanto bactericida.

Ao se investigar a atividade antioxidante do OE de manjericão, este apresentou bom desempenho, assim como atividade antimicrobiana efetiva contra as bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pasteurella multocida*, e fungos patogênicos *Aspergillus niger*, *Mucor muco*, *Fusarium solani*, *Botryodiplodia theobromae* (Hussain et al., 2008).

Martins et al. (2010) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial do manjericão (*Ocimum basilicum* Linn.), extraído pelo processo de hidrodestilação com extrator de Clevenger, frente à *Escherichia coli* enteropatogênica isolada de alfaces, pelo Método de Difusão em Disco (MDD). O OE do manjericão apresentou efeito inibitório contra os sorogrupos de *E. coli* EPEC testados. O efeito inibitório foi atribuído pelos autores à presença do metil chavicol e linalol, os constituintes majoritários do óleo.

Ismail & Pierson (1988) testaram o efeito de diversos óleos essenciais sobre a germinação, desenvolvimento pós-germinação e produção de toxina de *Clostridium botulinum*, detectando que o óleo de pimenta-preta se mostrou ativo contra a bactéria, sendo um inibidor mais potente do desenvolvimento vegetativo.

Patógenos alimentares

Enfermidades de origem alimentar aparecem quando o indivíduo, após ingerir um alimento contaminado com um microrganismo ou sua toxina, contrai uma doença, cujos sintomas geralmente incluem náuseas, cólicas abdominais, vômitos, diarreia e febre. Apenas um pequeno número de casos é notificado. As doenças de origem alimentar geram uma série de impactos econômicos, como perda de renda dos afetados, perda de produtividade, custos médicos, custos de investigação de surtos e perda de vendas (Forsythe, 2013).

Dentre os microrganismos causadores de DTA, a *Escherichia coli* é a mais conhecida. Pertence ao grupo dos coliformes a 45°C, sendo o melhor indicador de contaminação fecal (Sangaletti et al., 2009). É uma bactéria Gram-negativa, não formadora de esporos e anaeróbia facultativa (Forsythe, 2013). Apesar de estar presente na microbiota normal do intestino de animais como parte da flora normal, existem cepas de *E. coli* patogênicas, que podem causar gastroenterites, diarreia, vômito, cólica abdominal, febre e até complicações sérias, levando à sequelas ou óbito (Eduardo et al., 2009; FDA, 2012).

As infecções por *E. coli* geralmente estão ligadas ao consumo de alimentos contaminados através de manipuladores infectados pelo uso de água contaminada durante a preparação ou pelo consumo direto de água contaminada. Exemplos de alimentos implicados em surtos incluem queijos, leite não pasteurizado, comida pronta, vegetais, carnes moídas (FDA, 2012).

Os *Staphylococcus* sp. encontram-se amplamente disseminados no ambiente, sendo que seu reservatório principal são humanos e outros animais (Eduardo et al., 2009). São cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, que se agrupam em pares ou cachos (Forsythe, 2013). Causam intoxicação alimentar, síndrome de choque tóxico, pneumonia e infecções hospitalares pela produção de enterotoxinas proteicas altamente termoestáveis e resistentes a enzimas proteolíticas, como tripsina e pepsina. É um dos microrganismos mais prevalentes nas doenças transmitidas por alimentos. O quadro clínico de intoxicação tem sinais como náusea, vômito e cólicas, prostração e pressão baixa. Os seres humanos normalmente são os reservatórios e a transmissão ocorre devido a lesões nas mãos ou secreções que contaminam os alimentos durante sua manipulação (Franco & Landgraf, 2008; Eduardo et al., 2009; FDA, 2012).

Equipamentos e superfícies ambientais também podem ser fontes de contaminação. Os alimentos frequentemente implicados em intoxicação alimentar estafilocócica geralmente são aqueles que requerem

maior manuseio durante a preparação e/ou são mantidos acima das temperaturas de refrigeração por longos períodos. Exemplos são produtos cárneos, produtos de aves e ovos, saladas, produtos de padaria, recheados com creme, recheios de sanduíche e leite e produtos lácteos (FDA, 2012).

As *Salmonella* sp. pertencem à família *Enterobacteriaceae*, sendo bastonetes curtos, Gram-negativos, anaeróbios facultativos, com flagelos peritríquios e que não formam esporos. São consideradas umas das doenças transmitidas por alimentos mais prevalentes no mundo, amplamente distribuídas na natureza, sendo o trato gastrointestinal de humanos e animais, principalmente de aves, seu reservatório (Assis, 2014). Nas toxinfecções em humanos, os sintomas são: febre, cólicas abdominais e diarreia, geralmente autolimitada. Em pacientes idosos, crianças, gestantes e pessoas imunodeprimidas, a doença pode tornar-se sistêmica e levar ao óbito (Franco & Landgraf, 2008).

Esta bactéria tem distribuição mundial, sendo os alimentos os principais veículos, com surtos geralmente envolvendo produtos de origem animal, como ovos, aves, carnes e produtos lácteos e também produtos agrícolas não processados. Pode sobreviver no meio ambiente por muito tempo, em particular na matéria orgânica e material fecal, onde pode permanecer viável por longo período (Brasil, 2011). Este microrganismo é altamente resistente a antibióticos devido ao uso massivo dessas drogas na medicina humana e veterinária (Franco & Landgraf, 2008; Eduardo et al., 2009; Santurio et al., 2007; Su et al., 2004; Levine & Simon, 2018).

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, móvel por meio de flagelos e encontrada no solo, água, vegetais e animais (Forsythe, 2013; Lado & Yousef, 2006). Tem elevada patogenicidade, capacidade de formação de biofilmes, é psicrotrófica e, ainda que não forme esporos, é capaz de sobreviver em condições adversas, como baixos valores de pH e atividade de água, secagem e calor (Lado & Yousef, 2006; Eduardo et al., 2009).

A bactéria pode causar um quadro de diarreia e vômito, seguidos de sintomas mais graves como dores de cabeça, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões, sendo uma das principais causas de meningite aguda infecciosa (Peresi et al., 2001). Essas desordens comumente são precedidas por sintomas semelhantes aos da gripe. Infecções assintomáticas podem ocorrer e as mais preocupantes são aquelas que acontecem na gravidez, quando há possibilidade de aborto (Eduardo et al., 2009; Farber & Peterkin, 1991). Queijos, sorvetes, água, vegetais crus, patês de carnes, molhos de carne, aves, peixes (inclusive defumados) e frutos do mar podem constituir meio para o seu crescimento e estão frequentemente associados aos surtos. Embora seja rara entre as doenças transmitidas por alimentos, é importante causa de mortes e hospitalizações (Silva et al., 2011; Franco & Landgraf, 2008; Forsythe, 2013).

Testes de susceptibilidade

Testes de susceptibilidade como o de diluição em ágar e o de microdiluição com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) são importantes em estudos de novos agentes antimicrobianos. Estes testes são usados para medir quantitativamente a atividade

in vitro de um agente antimicrobiano contra um dado isolado bacteriano (CLSI, 2012).

Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Medicamentos da Universidade Federal de Alfenas – MG (UNIFAL), onde se realizou a avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre patógenos alimentares.

Os óleos essenciais

Os óleos essenciais foram adquiridos comercialmente da empresa FERQUIMA® Indústria e Comércio Ltda., envasados em frascos âmbar lacrados, com volumes de 5 ml. Foram escolhidos os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), manjerona (*Origanum majorana*), tomilho (*Thymus vulgaris*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), gengibre (*Zingiber officinale*), manjeriço (*Ocimum basilicum*) e pimenta-preta (*Piper nigrum*).

Microrganismos padrões

Utilizaram-se cepas padrões de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* 14028 e *Listeria monocytogenes* 1/2a, todas pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UNIFAL-MG. Essas cepas foram escolhidas devido à sua prevalência em doenças transmitidas por alimentos e pela sua disponibilidade na bacterioteca.

Recuperação das cepas

Para recuperar as cepas, foi realizada a inoculação dos microrganismos estudados em superfície inclinada de TSA (ágar tripton de soja) e caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), sendo os mesmos incubados a 37° C por 24 horas (Caixeta et al., 2010).

Padronização do inóculo

Para a padronização da densidade do inóculo para o teste de sensibilidade, foi utilizado o método de suspensão direta de colônias, considerado o método mais conveniente para a preparação de inóculos nesse tipo de experimento, podendo ser usado para a maioria dos microrganismos (CLSI, 2012). Para cada microrganismo obteve-se uma suspensão em 9 ml de solução salina esterilizada, com turvação semelhante ao tubo 0,5 da escala padrão de McFarland (concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ bactérias/ml) (CLSI, 2012). A transmitância desejada da suspensão formada foi confirmada em espectrofotômetro, com leitura no comprimento de onda de 660 nm, sendo necessários 75% de transmitância para obter turbidez equivalente à solução padrão do tubo 0,5 da escala de McFarland.

Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar – técnica do poço

Para realizar esta técnica, as placas testes foram preparadas com ágar Mueller-Hinton. Este meio foi

escolhido por ser utilizado para patógenos aeróbicos de crescimento rápido e considerado o melhor para testes de susceptibilidade de rotina, tendo boa reprodutibilidade, baixo teor de inibidores que possam afetar os resultados e grande disponibilidade de dados de experiências, sendo padrão para este tipo de experimento (CLSI, 2012). O ágar foi preparado conforme instruções do fabricante e autoclavado a 121°C por 15 minutos (Soares; Oliveira; Veiga, 2015).

Foram inoculadas, com uma micropipeta, 100 µl da suspensão microbiana em solução salina, nas placas de Petri com o referido ágar. A suspensão foi espalhada uniformemente pela placa com uma alça de Drigalsky esterilizada (CLSI, 2015). Em cada placa foram feitos quatro poços de 4 mm de diâmetro para que o óleo essencial fosse inserido. O controle positivo, com discos de antibióticos, foi realizado em placas à parte com as mesmas amostras de bactérias (Soares, Oliveira; Veiga, 2015; Castorani & Figueiredo, 2018).

Cada óleo essencial estudado foi diluído em solução salina estéril adicionada de 1% de Tween 80, para melhor solubilização do óleo e favorecimento de sua difusão, seguindo as proporções de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5% e 4,0% (Soares; Oliveira; Veiga, 2015; Castorani & Figueiredo, 2018). Foram dispensados em cada poço, devidamente identificado, 50 µl dos respectivos óleos diluídos. Cada teste foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas em estufa, a 37° C durante 24 horas. Para o controle negativo, foi inoculado em um poço apenas a solução salina estéril com Tween 80, sem nenhum óleo essencial.

Após o período de incubação, o halo de inibição de crescimento bacteriano foi medido em milímetros, com um paquímetro, para avaliar a sensibilidade ou resistência da bactéria estudada ao óleo essencial ensaiado.

Em placas à parte, inoculadas da mesma forma, foi feito o controle positivo, com discos de antibiótico com atividade comprovada contra o microrganismo avaliado (*S. aureus*: oxaciclina; *E.coli*: norfloxacina; *Salmonella*: Ciprofloxacina; *L. monocytogenes*: gentamicina). A média dos halos de inibição contra os antibióticos utilizados foi avaliada frente ao perfil de sensibilidade preconizado pela CLSI (2015).

Teste de diluição em caldo – microdiluição

A microdiluição foi feita dispensando-se 0,1 ml de caldo Mueller-Hinton em bandejas de microdiluição de plástico estéreis que possuem poços de fundo redondo ou cônico (CLSI, 2012). O caldo Mueller-Hinton foi preparado conforme recomendado pelo fabricante e, em seguida, autoclavado a 121°C por 15 minutos. Utilizou-se o Caldo Mueller-Hinton nas microdiluições, em microplaca, para avaliação da CIM e o Ágar Mueller-Hinton nos cultivos para avaliação da CBM.

Preparação e padronização do inóculo

Para a obtenção do inóculo na concentração de $1,5 \times 10^8$ bactérias/ml, cada cepa foi inoculada em 5 ml de solução salina estéril a 0,85%, partindo do inóculo em caldo BHI, até alcançar uma turbidez semelhante à solução padrão do tubo 0,5 da escala de McFarland (CLSI, 2012).

O procedimento de diluição para obter o inóculo final foi calculado de modo que o volume final aplicado aos poços fosse de 20 μL , em um volume total de 200 μL . A turvação ideal foi equivalente à solução padrão do tubo 0,5 da escala de McFarland.

Com o inóculo padronizado, este foi diluído até concentração de 3×10^5 UFC/ml. Para isso, foi retirada uma alíquota de 1 ml do inóculo padronizado e adicionou-se em 9 ml de solução salina estéril a 0,85%, obtendo uma concentração final de inóculo de $1,5 \times 10^7$ UFC/ml de suspensão. A partir desta suspensão, retirou-se uma alíquota de 2 ml e adicionou-se em 10 ml de caldo Mueller-Hinton, obtendo uma concentração de $2,5 \times 10^6$ UFC/ml. E, ao adicionar 20 μL dessa suspensão já contendo 180 μl do óleo essencial diluído e o caldo Mueller-Hinton, obteve-se uma concentração final de $2,5 \times 10^5$ UFC/ml.

Para a realização do teste de microdiluição, foi preparada uma solução mãe de cada óleo essencial, cuja concentração baseou-se nos resultados obtidos na técnica de difusão em ágar. O preparo desta solução foi realizado em caldo Mueller Hinton e Tween 80 a 1%. Sendo que em cada poço havia uma concentração que variava em intervalos de 0,1%, a partir da menor concentração em que se obteve resultado na difusão em ágar, por exemplo: 3,0%; 2,9%; 2,8%; 2,7% e assim sucessivamente até 0,1%.

Controles de qualidade

Para o controle positivo, foi empregado um antibiótico em solução com atividade comprovada contra o microrganismo avaliado - controle positivo 1, de acordo com a Tabela 1 abaixo.

Tabela 1.

Faixas de concentração dos antibióticos utilizadas para controle positivo dos microrganismos estudados.

Controles positivos		
Microrganismo	Antibiótico	Faixa de concentração avaliada
<i>S. aureus</i>	Amoxicilina	10 $\mu\text{/ml}$ - 5×10^{-3} $\mu\text{/ml}$
<i>E.coli</i>	Estreptomicina	10 $\mu\text{/ml}$ - 5×10^{-3} $\mu\text{/ml}$
<i>Salmonella</i>	Ciprofloxacina	$2,5 \times 10^3$ $\mu\text{/ml}$ - 2×10^{-3} $\mu\text{/ml}$
<i>L. monocytogenes</i>	Ciprofloxacina	$2,5 \times 10^3$ $\mu\text{/ml}$ - 2×10^{-3} $\mu\text{/ml}$

As placas foram incubadas a 37 °C, +/- 0,5 °C por 24 horas. A concentração inibitória mínima foi considerada a menor concentração de óleo essencial na qual não foi visualizado crescimento microbiano. Esta visualização foi realizada com auxílio da resazurina, um revelador de viabilidade celular para células bacterianas. Adicionou-se 20 μL deste revelador após 22 horas de incubação e, em seguida, a microplaca permaneceu incubada por mais 2 horas para completar 24 horas de incubação a 37° C. A resazurina é um corante azul, fracamente fluorescente que, na presença de células viáveis, apresenta coloração rósea, por se reduzir formando resorufina, que apresenta esta coloração. Não havendo crescimento bacteriano, o revelador permanece azul, o que indica inibição do microrganismo pelo OE estudado (Martins, 2008).

Concentração bactericida mínima

Aos poços que permaneceram na coloração azul, ou seja, em que não houve crescimento microbiano, foram inoculados 20 µL em placas estéreis, contendo ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37° C, por 24 horas. O crescimento em placa indica que, na concentração avaliada, houve a inibição do crescimento; contudo, o OE estudado não foi capaz de matar o microrganismo. O não crescimento em placa caracteriza a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Resultados e Discussão

Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar – técnica do poço

Controles

Para controle negativo, foi empregada a solução salina 0,85% com Tween 80, para a qual não houve formação de halos de inibição em nenhuma das placas.

Todos os microrganismos avaliados no controle positivo, com discos de antibiótico com atividade comprovada contra o microrganismo avaliado, demonstraram-se sensíveis ao antimicrobiano usado, com halos de inibição superiores ao mínimo indicado para sensibilidade ao composto, conforme Tabela 2. Com isso, as cepas usadas no estudo se evidenciaram como adequadas para utilização nos testes realizados.

Tabela 2.

Perfil de sensibilidade dos patógenos alimentares estudados em relação aos antibióticos empregados no controle positivo e padrão da CLSI (valores em mm).

Controles				
Microrganismo	Antibiótico	Fornecedor	Média halos	CLSI
<i>S. aureus</i>	Oxaciclina	Sensifar	30	13
<i>E.coli</i>	Norfloxacina	Sensibiodisc	19	>17
<i>Salmonella</i>	Ciprofloxacina	Sensifar	29	>21
<i>L. monocytogenes</i>	Gentamicina	Laborclin	23,5	15

Efeito dos óleos essenciais sobre os patógenos alimentares estudados

As médias dos halos de inibição, medidos em milímetros, foram anotadas e calculados os respectivos desvios padrão. A tabela a seguir apresentada mostra os resultados encontrados.

Tabela 3.

Média dos halos de inibição dos óleos essenciais (em milímetros) frente a patógenos alimentares e desvio padrão.

	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>
OE: Orégano				
Concentração	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP
0,5			0	17 ± 3,5
1	13 ± 0	9 ± 0,7	1 ± 1	20 ± 0,7
1,5	20 ± 6,3	10 ± 0,6	10 ± 0,6	16 ± 6,4
2	21 ± 4	12 ± 4,9	11 ± 1,5	20 ± 0
2,5	22 ± 4,2	13 ± 2,3	12 ± 1,7	16 ± 3,6
3	23 ± 6,6	14 ± 3,5	11,7 ± 1,5	16,7 ± 6,1
3,5	11 ± 7,9	17,7 ± 3,2	12 ± 1,5	15,7 ± 1,2
4	31 ± 8,9	19 ± 3,1	13 ± 0,6	11 ± 13,9
OE: Manjerona				
Concentração	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP
0,5	NA	NA	NA	14 ± 0
1	NA	NA	NA	11 ± 0
1,5	NA	10 ± 0	NA	12 ± 0
2	NA	9 ± 1	NA	15 ± 0
2,5	NA	14 ± 3,2	9,7 ± 1,2	15 ± 0
3	NA	11 ± 1	9 ± 0,6	13 ± 4,2
3,5	NA	16 ± 2,5	11 ± 0,6	13 ± 1,4
4	NA	16 ± 3,2	11,7 ± 1,5	20 ± 4,2
OE: Tomilho				
Concentração	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP
0,5	NA	NA	10 ± 0,6	NA
1	NA	NA	0,00	NA
1,5	NA	18 ± 9,9	10 ± 0,6	NA
2	NA	20,5 ± 13,44	10 ± 0	NA
2,5	NA	9 ± 2,8	10 ± 0	15 ± 1,4
3	NA	9,5 ± 2,1	10 ± 0,6	13 ± 2,8
3,5	NA	12 ± 0	10 ± 0,6	13 ± 2,8
4	14	12,5 ± 3,5	12 ± 0,6	13 ± 0
OE: Alecrim				
Concentração	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP
0,5	NA	NA	NA	NA
1	NA	NA	NA	NA
1,5	NA	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA
2,5	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA
3,5	NA	NA	NA	NA
4	NA	NA	NA	NA

NA= não ativo/não formou halo.

Tabela 3. (continuação)

Média dos halos de inibição dos óleos essenciais (em milímetros) frente a patógenos alimentares e desvio padrão.

	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>
OE: Gengibre				
Concentração (%)	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP
0,5	NA	NA	NA	NA
1	-	-	-	-
1,5	-	-	-	-
2	-	-	-	-
2,5	-	-	-	-
3	-	-	-	9 ± 7,5
3,5	-	-	-	12 ± 7,37
4	-	-	-	14 ± 3,21
OE: Manjeriço				
Concentração (%)	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP
0,5	NA	NA	NA	NA
1	-	9 ± 14	-	-
1,5	-	13,5 ± 9,2	-	-
2	-	13 ± 07	-	-
2,5	-	12 ± 1,0	13 ± 4,9	-
3	-	12 ± 1,0	13 ± 1,4	-
3,5	13 ± 2,1	15 ± 4,2	16 ± 0,5	-
4	14 ± 4,2	16 ± 1,5	16 ± 0,7	-
OE: Pimenta preta				
Concentração (%)	Diâmetro e DP	Diâmetro e DP	Média	Diâmetro e DP
0,5	NA	NA	NA	NA
1	-	-	-	-
1,5	-	-	-	-
2	-	-	-	-
2,5	-	-	-	-
3	-	-	-	-
3,5	-	-	-	-
4	-	-	-	-

NA= não ativo/não formou halo.

Como pode ser visto na Tabela 3, os óleos essenciais de alecrim e pimenta-preta não foram efetivos contra nenhum dos microrganismos testados. O óleo essencial de gengibre foi efetivo apenas contra *L. monocytogenes*, e somente nas três concentrações mais altas.

A tabela mostra que o OE de orégano inibiu o *S. aureus* nas concentrações de 1,0% a 4,0%. O óleo essencial de manjerona não se mostrou ativo contra *S. aureus* em nenhuma concentração. O óleo essencial de tomilho não foi ativo com *S. aureus*, à exceção de uma amostra na concentração de 4%.

E. coli foi inibida pelo OE de orégano na faixa de concentração de 1,0% a 4,0%, enquanto os óleos

essenciais de tomilho e manjerona foram ativos a partir das concentrações de 1,5%. Porém, a média dos diâmetros dos halos de inibição foram maiores na manjerona em relação ao tomilho na maioria das concentrações. O orégano teve os diâmetros superiores aos dois.

As placas contendo *S. typhimurium* mostraram halos de inibição frente ao óleo essencial de orégano em torno majoritariamente das concentrações de 1,0% a 4,0%, este óleo formando os halos de inibição com maior diâmetro em todas as concentrações. O óleo essencial de manjerona foi ativo contra *Salmonella* a partir da concentração de 2,5%. O óleo de tomilho mostrou um perfil de atividade similar em todas as concentrações, com todos os halos de inibição em diâmetros similares, apesar de não ter registrado atividade na concentração de 1%. Isso pode se dever a irregularidades na diluição do óleo. O óleo de manjericão também foi ativo a partir da concentração de 2,5%.

O óleo essencial de manjericão não foi ativo contra *Listeria*.

L. monocytogenes foi inibida pelo OE de orégano em todas as concentrações. O OE de manjerona também atuou contra *Listeria* em todas as concentrações, porém com halos menores, à exceção da amostra de 4,0%.

O OE de tomilho formou halo de inibição contra *Listeria* a partir da concentração de 2,5%, com média de halos similares à manjerona, à exceção da amostra de 4,0%.

Indui et al. (2006) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato de *Piper nigrum* e, neste estudo, este também não mostrou qualquer atividade antibacteriana contra os organismos testados: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Aeromonas hydrophila*.

Machado et al. (2012) testaram duas espécies de manjericão por difusão em ágar e microdiluição em caldo, em amostras de bactérias ligadas à deterioração e segurança microbiológica de alimentos, concluindo que *S. aureus* foi a espécie microbiana mais sensível, apresentando os maiores halos de inibição e os menores valores da CIM, corroborando esse resultado da pesquisa, apesar de a inibição ter ocorrido apenas na concentração mais alta.

Ernandes et al. (2007) fizeram um experimento com diversos óleos essenciais contra bactérias isoladas do meio ambiente. O óleo essencial de orégano revelou a melhor ação sobre os microrganismos testados, assim como nesse experimento.

Ao contrário do observado neste trabalho, Indui et al. (2006) observaram atividade antibacteriana de extratos de gengibre contra dois sorogrupos de *E. coli*.

Martins et al. (2010) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial do manjericão (*Ocimum basilicum* Linn.) frente à *Escherichia coli* enteropatogênica isolada de alfaces, pelo Método de Difusão em Disco (MDD). O OE do manjericão apresentou efeito inibitório contra os sorogrupos de *E. coli* EPEC testados, com médias de halos de inibição variando entre 11,2 mm e 11,6 mm e de 11,0 mm a 12,0 mm, similares aos obtidos nos testes efetuados.

Santurio et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano frente a amostras, entre 20 sorovares, de *Salmonella enterica* isoladas de carcaça de aves. A Concentração Inibitória

Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram determinadas para cada um isolado, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo. Nesse estudo, o óleo essencial de orégano mostrou forte atividade antibacteriana. O mesmo estudo com microdiluição em caldo indicou que o óleo essencial de tomilho tem moderada atividade sobre os isolados estudados. Nenhuma amostra em particular pôde ser classificada como totalmente sensível ou resistente aos óleos. Todavia, a comparação dos resultados não é tão exata, já que o estudo foi feito em microdiluição em caldo, em que os resultados são mostrados em faixas por $\mu\text{g/ml}$, enquanto a técnica de difusão em ágar fornece resultados referentes ao diâmetro de inibição em milímetros.

Majolo et al. (2014) avaliaram o óleo essencial de gengibre frente a 14 salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. Ao contrário do observado neste experimento, este óleo se mostrou eficiente tanto em termos de ação bacteriostática quanto bactericida. Apesar disso, em duas das amostras testadas por esses autores houve resistência ao OE.

Machado et al. (2012) testaram a atividade antimicrobiana de duas espécies de manjerição em *Salmonella choleraesuis*, por difusão em ágar e microdiluição em caldo. As amostras mostraram atividade contra esse patógeno. Também foram testadas duas espécies de manjerição em amostras *Listeria monocytogenes* e *L. innocua*. Ao contrário do observado nesse estudo, ambas as espécies de *Ocimum* apresentaram atividade contra as cepas microbianas testadas. Os métodos utilizados foram difusão em ágar e microdiluição em caldo, para determinar a atividade antimicrobiana e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada óleo para cada espécie microbiana (Machado et al., 2012).

Como observado em estudos anteriores (Castorani & Figueiredo, 2018), os halos de inibição formados nem sempre foram proporcionais ao aumento da concentração do óleo. Uma hipótese para isso seria a volatilização do óleo no poço, reduzindo sua concentração. Outra possibilidade seria a interferência do ágar na difusão do óleo essencial diluído na placa de Petri (Castorani & Figueiredo, 2018). Embora o ágar Muller-Hinton seja geralmente confiável para testes de susceptibilidade, os resultados obtidos com alguns lotes ocasionalmente podem variar significativamente (CLSI, 2012).

Microdiluição

Na técnica de difusão em ágar, a partir dos halos de inibição obtidos, foi possível determinar a menor concentração em que o óleo inibiu cada microrganismo. Nos resultados obtidos observou-se que todos os óleos essenciais analisados, quais sejam: orégano, manjerição, tomilho, manjerona, pimenta-preta e gengibre, com exceção do OE de alecrim, tiveram alguma atividade antimicrobiana nas concentrações estudadas.

Assim, a partir da menor concentração efetiva no teste de difusão em ágar, foi realizada a microdiluição. Com o resultado do teste de microdiluição foi possível determinar, para cada microrganismo, a Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, a menor concentração de óleo essencial na qual não foi visualizado crescimento microbiano, e a Concentração Bactericida Mínima (CBM), isto é, a menor concentração em que há morte de todas as bactérias, visualizado por não crescimento em placa.

Tabela 4.

Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima dos óleos essenciais estudados e controle positivo frente aos patógenos alimentares.

Óleo essencial	<i>S. aureus</i>		<i>E.coli</i>	
	CIM	CMB	CIM	CMB
Orégano	1,3-1,4%	1,5%	1,0-1,1%	1,0-1,1%
Manjerona	0,9-1,0%	>3,0%	0,2-0,3%	0,4-0,5%
Tomilho	ND	ND	2,8-2,9%	3,0%
Alecrim	ND	ND	ND	ND
Gengibre	ND	ND	ND	ND
Manjericão	1,5-1,6%	> 2,5%	0,6-0,7%	1,6-1,7%
Pimenta-preta	ND	ND	ND	ND
Controles				
Amoxicilina	0,32 -1,6 µ/ml	ND	ND	ND
Estreptomicina	ND	ND	10 - 05 µ/ml	ND
Ciprofloxacina	ND	ND	ND	ND
Óleo essencial	<i>Salmonella</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	CIM	CMB	CIM	CMB
Orégano	0,9-1%	0,9%	2,5-2,6%	2,7%
Manjerona	ND	ND	1,6-1,7%	>4,0%
Tomilho	0,7-0,8%	0,7%	2,5-2,6%	2,5%
Alecrim	ND	ND	ND	ND
Gengibre	ND	ND	NA	NA
Manjericão	1,0-1,1%	>4,0%	ND	ND
Pimenta-Preta	ND	ND	ND	ND
Controles				
Amoxicilina	ND	ND	ND	ND
Estreptomicina	ND	ND	ND	ND
Ciprofloxacina	<2 x 10 ³ µ/ml	ND	0,078 -0,04µ/ml	ND

NA= não ativo ND=não definido.

Em relação à *S. aureus*, os óleos essenciais de orégano, manjerona e manjericão apresentaram atividade. Orégano teve a CIM nas concentrações entre 1,3-1,4% e CBM de 1,5%, enquanto o OE de manjericão apresentou CIM a 1,6% e CBM nas concentrações maiores que 2,5%. O OE de manjerona apresentou CIM a 1,0% e CBM maior que 3,0%.

Para *E. coli*, o de orégano mostrou CIM de 1,0-1,1% e CMD na concentração de 1,0%, o tomilho mostrou CIM de 2,8-2,9% e CMD na média da concentração de 3%. O OE de manjericão apresentou uma CIM de 0,7% e CBM de 1,7% e, em relação ao OE de manjerona, a CIM apresentou-se em 0,3% e CBM de 0,5%.

Salmonella sp. foi inibida somente pelos OE de orégano (CIM 0,9-1% e CBM 0,9%), tomilho (CIM 0,7-0,8% e CBM 0,7%) e manjericão, com CIM na concentração de 1,1% e CBM maior que 4,0%.

Por último, *L. monocytogenes* foi inibida somente pelos OE de orégano, tomilho e manjerona, com CIM 2,5-2,6% e CBM de 2,7% para o orégano, CIM de 2,5-2,6% e CBM de 2,5% para o tomilho e CIM de 1,7% e CBM maior que 4,0 % para manjerona.

Em estudo realizado por Santurio et al. (2011), por meio do método de difusão em ágar e microdiluição, os OEs de gengibre e alecrim não evidenciaram atividade antibacteriana frente a duas cepas de *E. coli*; contudo, o OE de manjerona também não obteve atividade, ao contrário do resultado encontrado no presente trabalho.

Segundo Silva et al. (2015), o OE de alecrim não apresentou atividade antimicrobiana para *S. aureus* e *E. coli*, em seu estudo. Assim como a avaliação de Seydim & Sarikus (2006), que estudaram a atividade antimicrobiana do OE de alecrim frente aos patógenos: *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* – estudo que indicou que o OE não obteve nenhuma atividade antimicrobiana sobre estes microrganismos. Aquino et al. (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjerição frente a bactérias de carnes bovinas e obtiveram resultados que indicaram que o óleo essencial de manjerição tem apresentado forte atividade antimicrobiana frente a *Salmonella* sp, *S. aureus* e *E. coli*, assim como no presente estudo. E outros estudos indicam sua atividade antibacteriana contra *L. monocytogenes* (Gutierrez; Barry-Ryan; Bourke, 2008; Carovic-Stanko et al., 2010), por meio da utilização das duas metodologias apresentadas ou por uma delas. Com isso, o óleo essencial de manjerição mostra um elevado potencial para o uso como agente antimicrobiano natural para emprego em alimentos.

Trajano et al. (2009) estudaram a propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos, como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P.aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. enterica*, *Serratia mercencens* e *Yersinia enterocolitica* e mostraram que os óleos de *R. officinalis*, *O. basilicum* e *Z.officinalis* apresentaram um baixo espectro de ação, sendo efetivos apenas contra poucas das bactérias estudadas. Em relação ao óleo essencial de gengibre, a atividade foi observada somente contra *S. aureus*, o óleo essencial de alecrim não teve efetividade e o óleo essencial de manjerição foi efetivo contra *E.coli*. O OE de manjerona apresentou-se inibitório contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*. O óleo de *P. nigrum*, por sua vez, não apresentou nenhuma ação bacteriostática sobre as cepas testadas. Da mesma forma como no presente trabalho, o óleo essencial de gengibre apresentou inibição para somente um microrganismo pelo método de difusão em ágar, e o óleo essencial de alecrim não apresentou atividade antibacteriana.

Entretanto, o óleo essencial de manjerição apresentou maior atividade em relação aos OEs de gengibre e alecrim. Por meio dos resultados obtidos pelo método de microdiluição, observou-se elevada atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de manjerona e manjerição sobre quatro patógenos alimentares: *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp e *L. monocytogenes*.

Conclusão

Demonstrou-se, com este estudo, a efetividade de óleos essenciais das especiarias contra patógenos

alimentares.

Pelo método de difusão em ágar, o óleo essencial de orégano mostrou-se efetivo contra todos os microrganismos estudados. Os óleos essenciais de manjerona, manjerição e tomilho também apresentaram bom desempenho, apesar de não terem inibido todos os microrganismos. O óleo essencial de gengibre apresentou fraca atividade, atuando apenas contra *L. monocytogenes* nas concentrações mais altas, enquanto os óleos de alecrim e de pimenta-preta não mostraram inibição em nenhuma amostra de patógeno alimentar.

Pelo teste de microdiluição, os óleos essenciais de manjerona, manjerição, orégano e tomilho apresentaram elevada atividade antimicrobiana, especialmente os OE de orégano e manjerona. Entretanto, os óleos essenciais de alecrim, gengibre e pimenta-preta não obtiveram resultado tão satisfatório.

Os resultados obtidos demonstram que alguns óleos essenciais poderiam ser empregados na indústria de alimentos, como uma alternativa natural para o controle microbiológico em substituição a aditivos químicos artificiais.

São necessários mais estudos, aliando a capacidade antimicrobiana e conservante às análises sensoriais, suas interferências na aceitação do produto e possibilidade de toxicidade. Além desses, é preciso avaliar o sinergismo ou antagonismo dos óleos com a matriz alimentar, bem como do custo-benefício do seu uso e, assim, verificar o potencial do emprego industrial dos óleos essenciais de especiarias em produtos alimentícios.

Referências Bibliográficas

- Almeida, E. R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, 1993. 341p.
- Assis, L. **Alimentos seguros**: ferramentas para gestão e controle da produção e distribuição. 2.ed.2 reimp. Rio de Janeiro: Senac Nacional, 2014, 376p.
- Bağcı, Y. et al. The Essential Oil Compositions of *Origanum majorana* L. cultivated in Konya and Collected from Mersin-Turkey. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**.V.51, n.3., p. 463-469, Jul-Set, 2017 (edição especial).
- Balme, F. **Plantas medicinais**. São Paulo: Hemus, 1978. 398p.
- Borges, A. M. et al. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, n.4, p.656-665, 2012.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o “Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos”.
- Brasil. Ministério da Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.**: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. - Brasília: Ministério da Saúde, 2011.60 p.

- Carrijo, K. F. et al. Condimentos e especiarias empregados no processamento de alimentos: considerações a respeito de seu controle físico-químico. **PUBVET**, Londrina, V. 6, N. 26, Ed. 213, Art. 1419, 2012.
- Castorani; G. M.; Figueiredo; L. A. **Atividade antimicrobiana in vitro de óleos essenciais contra patógenos alimentares**. 2018. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para colação de grau no curso de Farmácia da Universidade Federal de Alfenas – MG. Área de concentração: Microbiologia de Alimentos, Alfenas-MG, 2018
- Caixeta, D. S.; Piccoli, R. H.; Alves, E.; Cardoso, M. G. **Ação de óleos essenciais de *Curcuma longa* L. e *Bixa orellana* L. sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes* plânctônicas e sésseis em polipropileno**. 2010. 127f. Tese (Doutorado em Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved Standard**. 12. ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard—Ninth Edition**. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- Costa, D. C. et al. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol.18, n.1 Botucatu. Jan./Mar. 2015.
- Dias, N. A. A. **Avaliações microbiológica e físico-química de mortadelas elaboradas com óleos essenciais e inoculados com *Clostridium perfringens* tipo b A**. 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- Duarte, M. L. R. et al. **A cultura da-pimenta-do-reino**. 2. ed. rev. amp. – Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 73 p.
- Eduardo, M. B. P. et al. **Principais doenças emergentes e reemergentes – atualização e perspectivas**. Documento que embasou o tema central do III Simpósio Internacional de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, Centro de Convenções Rebouças, São Paulo-SP, 21 de Novembro de 2005. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc _tec/hidrica/doc/3simpo_princdoencas.pdf> Acesso em: 18/04/2016.
- Elpo, E. R. S.; Negrelle, R. R. B. *Zingiber officinale* ROSCOE: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 27-32, Jan.- Jun./2004.
- Ernandes, F. M. P.G. et al. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em micro-organismos isolados do meio ambiente. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 193-206, jul./dez., 2007.
- Farber, J. M.; Peterkin, P. I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. **Microbiological reviews**, Ottawa, v. 55, n. 3, p. 476-511, set. 1991.
- Franco, B. D. G. M.; Landgraf, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*.
- Freire, I. C. M. et al. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.372-377, 2014.
- FDA - Food and Drug Administration. **Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and**

Natural Toxins. Second Edition, 2012, 292p.

Forsythe, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª Ed., Artmed, 2013, 607 p.

Grandi, T. S. M. **Tratado das plantas medicinais: mineiras, nativas e cultivadas**. 1ed. Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, 2014. 1204 p.

Hirasa, K.; Takemasa, M. **Spice Science and Technology**, Marcel Decker, New York, 1998, 221p.

Hussain, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v.108, n.3, p. 986-995, 2008.

Indui, M. et al. Atividade antimicrobiana de condimentos do sul da Índia sobre *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Aeromonas hydrophila*. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 37, n. 2, abr./jun. 2006.

Ismail, A.; Pierson, M. D. Inhibition of growth and germination of *Clostridium botulinum* 33A, 40B and 1623E by essential oils of spices. **Journal of Food Science**, v.5, p.1676-1678, 1990.

Jakiemiu, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2008. 89 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Lado, B. H.; Yousef, A. E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors. In: Ryser, E.; Marth, E. H. (Eds.). **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 157-213

Levine, M. M.; Simon, R. The Gathering Storm: Is Untreatable Typhoid Fever on the Way? **Bio-American Society for Microbiology**, v. 9, n.2, março/abril 2018.

Lima, R. K. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-docartucho do milho *Spodoptera rugiperda* (J. E. 50Smith,1797) (*Lepidoptera: Noctuidae*). **Acta Amazonica**, Manaus, v.39, n. 2, p. 377 –382, 2009.

Machado, T. F. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjericão contra patógenos e deterioradores de alimentos. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012. 16 p.

Majolo, C. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 505-512, Sept. 2014.

Marangoni, C.; Moura, N. F. Atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Rosmarinus officinalis* L. em salame tipo italiano. **Revista Científica Tecnológica**, v. 2, n. 1, p. 109-118, 2015.

Martins, M. E. **Aplicação de bioensaios de toxicidade para avaliação da eficiência do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (rahlf) na destoxificação do aldicarbe**. Monografia – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

Martins, A. G. L. A. Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjericão frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica isolados de alfaces. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.40, n.8, p.1791-1796, agosto de 2010.

May, A. et al. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da

- altura e intervalo entre cortes. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 195-200, 2010.
- Millezzi, A. F. et al. Sensibilidade de bactérias patogênicas em alimentos a óleos essenciais de plantas medicinais e condimentares. **Higiene Alimentar**, São Paulo-SP, v. 30, n. 254/255, p. 117-122, março/abril de 2016.
- Moro, A. et al. Dairy matrix effect on the transference of rosemary essential oil compounds during cheese making. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.95, p.1507-1513, 2015. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.6853/epdf>>. Acesso em 17/06/2018.
- Newall, C. A. **Plantas medicinais: guia para profissional de saúde**. São Paulo: Editorial Premier, 2002. 308 p.
- Peresi, J. T. M.; Graciano, R. A. S.; Almeida, I. A. Z. C.; Lima, S. I. L. Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes microbianos. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, nº83, p 63-70, abril. 2001.
- Sangaletti, N. et al. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 262-269, junho, 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612009000200004&lng=en&nrm=iso> Acesso em: 18/02/2016.
- Santurio, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente as sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 803-808, maio/jun. 2007.
- Segredos e Virtudes das plantas medicinais**. Lisboa: Seleções do Reader's Digest, 1983. 463 p.
- Seydim, A. C.; Sarikus, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible ms incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, v. 39, p. 639–644, 2006.
- Silva, Á. S. et al. *Listeria monocytogenes* em Leite e Produtos Lácteos no Brasil: Uma Revisão. **Ciência, Biologia e Saúde**, v.13, n.1, p.:59-67, 2011.
- Silva, A. A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 33, n. 1, p. 111-117, jan./jun. 2015.
- Soares, A. K. A.; Oliveira, T. P.; Veiga, S. M. O. M. **Utilização do óleo da semente de *Moringa oleifera* como conservante em emulsões cosméticas**. 2015. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2015.
- Su, L. et al. Antimicrobial Resistance in Nontyphoid Salmonella Serotypes: A Global Challenge. **Clinical Infectious Diseases**. v. 39, n.4, p.546–551, Aug 2004.
- Tajkarimi, M. M.; Ibrahim, S. A.; Cliver, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1199–1218, Set., 2010.
- Trajano, V. N.; Lima, E. O.; Souza, E. L.; Travassos, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-545, jul.-set. 2009.
- Vági, E. et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts

obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. **Food Research International**, v. 38, p. 51-57, 2005.

Valeriano, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.1, p.57-67, 2012.

Verma, R. S. et al. Chemical Diversity in Indian Oregano (*Origanum vulgare* L.). **Chemistry & Biodiversity** – V.7, p.2054-2064, 2010.

Von Hertwig, I. F. **Plantas aromáticas e medicinais**: plantio, colheita, secagem, comercialização. 2. ed. rev. atual. São Paulo: Icone, 1991. 414 p.