

**Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Ocimum basilicum* (manjeriçã) e sua aplicação em massa para embutido cárneo****Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* (oregano) and *Ocimum basilicum* (basil) and its application in meat sausage**

DOI:10.34117/bjdv6n8-587

Recebimento dos originais:08/07/2020

Aceitação para publicação:26/08/2020

**Patricia Gomes Vivian**

Formação acadêmica: Mestra em Nutrição e Alimentos.

Instituição: Universidade Federal de Pelotas - UFPEL.

Endereço: UFPEL. Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Campus Capão do Leão, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: patigvivian@yahoo.com

**Greyce Mello**

Formação acadêmica: Mestra em Ciências.

Instituição: Universidade Federal de Pelotas - UFPEL.

Endereço: UFPEL. Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Campus Capão do Leão, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: greycemello@gmail.com

**Rebeca Porto**

Formação acadêmica: Graduada em Química de Alimentos.

Instituição: Universidade Federal de Pelotas - UFPEL.

Endereço: UFPEL. Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Campus Capão do Leão, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: rebeca\_porto@outlook.com

**Cláudio Dias Timm**

Formação acadêmica: Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

Instituição: Universidade Federal de Pelotas - UFPEL.

Endereço: UFPEL. Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Campus Capão do Leão, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: timm@ufpel.tche.br

**Eliezer Avila Gandra**

Formação acadêmica: Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

Instituição: Universidade Federal de Pelotas - UFPEL.

Endereço: UFPEL. Laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular (LACABIM), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Campus Capão do Leão, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

E-mail: gandraea@hotmail.com

**Rogério Antonio Freitag**

Formação acadêmica: Doutor em Química

Instituição: Universidade Federal de Pelotas - UFPEL.

Endereço: UFPEL. Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Campus Capão do Leão, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

E-mail: freitag@ufpel.edu.br

**RESUMO**

A busca por aditivos naturais em alimentos tem aumentado devido à reação negativa dos consumidores em relação aos aditivos químicos adicionados intencionalmente em produtos industrializados com a finalidade de aumentar a vida útil dos mesmos. Na mesma proporção o interesse sobre óleos essenciais e suas aplicações em alimentos também tem crescido e isto se dá devido ao seu elevado potencial antimicrobiano e antioxidante, tornando-se uma alternativa e gerando uma nova perspectiva de uso. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi verificar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Ocimum basilicum* (manjeriço), e sua aplicação em um produto cárneo para controle de microrganismos indesejáveis. O efeito antimicrobiano foi analisado pelo teste de disco-difusão e pela determinação da concentração bactericida mínima (CBM) frente a *Salmonella enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Realizou-se avaliação microbiológica em massa para embutido cárneo experimentalmente contaminada com *Salmonella enterica* adicionada dos óleos essenciais nas concentrações 0,5%, 1,0% e 1,5%, após 0, 24, 48 e 72 horas de estocagem a 4°C. Nos testes de disco-difusão e CBM, o óleo essencial mais eficaz foi o de *O. vulgare*, seguido da mistura dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. basilicum*. O óleo essencial de *O. vulgare* e a mistura dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. basilicum* na concentração 0,5% e 1,0% não foram capazes de eliminar *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* da massa experimentalmente contaminada. Entretanto, na concentração de 1,5%, *S. Enteritidis* foi eliminada por ambos os tratamentos e *S. Typhimurium* somente pelo óleo essencial de *O. vulgare*. Quando avaliado sensorialmente, o embutido cárneo na concentração de 1,5% não obteve boa aceitação pelos consumidores. Apesar de ter apresentado efeito preventivo da contaminação da massa para embutido por *Salmonella*, o uso dos óleos essenciais estudados resultaram em alterações de sabor inaceitáveis pelos consumidores.

**Palavras-chave:** segurança alimentar, patógenos, avaliação sensorial, *Salmonella*.

**ABSTRACT:** Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* (oregano) and *Ocimum basilicum* (basil) and its application in meat sausage. The search for natural additives in food has recently increased due to the negative reaction of consumers to the chemical additives intentionally added in industrialized products in order to increase their useful life. The interest in essential oils and their application in food has been increasing and this is due to its high antimicrobial potential, becoming a new perspective of use. In this context, the objective of this study was to verify the antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* (Oregano) and *Ocimum basilicum* (basilicum), and its application in meat sausage to control undesirable microorganisms. The antimicrobial effect was analyzed by the disc-diffusion test and minimum bactericidal concentration (MBC) against *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium and Enteritidis, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. A microbiological mass evaluation was carried out for meat sausage, experimentally contaminated with *Salmonella enterica*, added to the essential oils at 0.5%, 1.0% and 1.5% concentrations after 0, 24, 48 and 72 hours of storage at 4°C. In the disk-diffusion and CBM tests, the most effective essential oil was *O. vulgare*, followed by mixing the essential oils of *O. vulgare* and *O. basilicum*. *O. vulgare* essential oil and the mixture of the essential oils of *O. vulgare* and *O. basilicum* at the concentration of 0.5% and 1.0% were not able

to eliminate *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* from the experimentally contaminated mass. However, at the concentration of 1.5%, *S. Enteritidis* was eliminated by both treatments and *S. Typhimurium* only by *O. vulgare* essential oil. When evaluated sensorially, the meat inlay in the concentration of 1.5% did not obtain good acceptance by the consumers. Although it had a preventive effect on the contamination of the salmonella-based pasta, the use of the essential oils studied resulted in unacceptable taste changes.

**Keywords:** food safety, pathogens, sensory evaluation, *Salmonella*.

## 1 INTRODUÇÃO

Com o aumento do uso de aditivos químicos nos alimentos com o intuito de aumentar a vida útil dos mesmos, tem-se observado um crescente interesse por parte da população e da indústria em diminuir a utilização destes, devido principalmente aos possíveis efeitos negativos de substâncias presentes nestes aditivos para a saúde humana, aumentando também o interesse em compostos antimicrobianos alternativos presentes em plantas (Andrade, 2013).

Neste contexto, a utilização de óleos essenciais como uma alternativa para substituição aos aditivos químicos que são comumente utilizados em produtos cárneos tem ganhado mais atenção. A atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos possui muitas aplicações, incluindo conservação de alimentos crus e processados (Martucci et al., 2015).

O preparo de embutidos cárneos propicia o aumento da vida útil da carne através da aplicação de sais de cura, como nitrito e nitrato de sódio e de potássio que são amplamente utilizados pela indústria alimentícia. A adição de nitritos e nitratos no produto cárneo tem como principal objetivo inibir o crescimento de algumas espécies de microrganismos causadores de toxinfecções e intoxicações, como, por exemplo, *Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* spp. (Silveira, 2012).

Entretanto, ao aquecer a carne, os nitritos presentes no produto cru se transformam, reagindo com aminas secundárias e terciárias, podendo levar ao aparecimento de nitrosaminas (Ordóñez et al., 2005). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) alerta que as nitrosaminas podem ser consideradas agentes cancerígenos para humanos (Duarte, 2010). As nitrosaminas são as principais responsáveis pelo câncer de estômago, que tem alta prevalência em populações que consomem regularmente embutidos cárneos (Carnicer, 2007). A legislação brasileira vigente prevê limites máximos de 0,015 g/100 g e 0,03 g/100 g, respectivamente, para nitrito e nitrato de sódio em carnes e produtos cárneos (Brasil, 2003).

De acordo com estudos realizados por Ernandes (2007), Menezes et al. (2009), Caravic et al. (2010), Alves (2010), Pozzo et al. (2011), Probist (2012), Andrade (2013), Al Abbasy et al. (2015), Ansesio (2015) e Araujo e Longo (2016) os óleos essenciais de condimentos são eficientes

antimicrobianos, tendo potencial para serem usados como aditivos naturais em produtos alimentícios (Souza et al., 2003; Aleixo, 2013). Entretanto, esses estudos apresentam resultados referentes somente à atividade antimicrobiana dos óleos essenciais dos condimentos e não verificam a aceitação dos consumidores quando adicionados em alimentos. A concentração de aditivos químicos em embutidos cárneos poderia ser reduzida pela utilização de óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. basilicum*, que são temperos comumente utilizados no preparo de carnes. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação antibacteriana de óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. basilicum* em massa para embutido cárneo e verificar sua aceitação sensorial.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *O. VULGARE* E *O. BASILICUM*

As folhas secas de *O. vulgare* e *O. basilicum* foram adquiridas da indústria Luar Sul Indústria e Comércio, de Santa Cruz do Sul, Brasil.

Os óleos essenciais foram extraídos de acordo com a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010), por meio do processo de hidrodestilação por arraste a vapor com o auxílio do equipamento Clevenger durante 3 h. Após a extração, os óleos essenciais foram armazenados em frascos âmbar e mantidos a temperatura de -18°C.

### 2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi testada frente aos seguintes microrganismos: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Typhimurium (ATCC 13311) e Enteritidis (ATCC 13076), *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644). Culturas *overnight* a 37°C em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia, Lansing, Michigan, USA).

Para a avaliação do efeito antimicrobiano foi utilizado o método de disco-difusão, de acordo com Caravic et al. (2009). Também foi determinada a CBM, conforme preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), com pequenas modificações.

No método de disco-difusão, 0,1 mL de cultura em BHI de cada isolado com aproximadamente 10<sup>7</sup> UFC/mL foi semeado na superfície de ágar Mueller-Hinton (Acumedia) em placas de Petri com 90 mm de diâmetro. Discos de papel filtro estéreis impregnados com os óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. basilicum* e a mistura em partes iguais de *O. vulgare* e *O. basilicum* (5 µL por disco com 6 mm de diâmetro) foram depositados sobre o meio inoculado, que foi incubado a 37°C por 24 h. O diâmetro da zona de inibição, incluindo o diâmetro do disco, foi medido em milímetros.

A determinação da CBM foi realizada utilizando microplacas com 96 poços. Em cada poço, foram dispensados 50  $\mu\text{L}$  de BHI com 1% de Tween 80, utilizado para diminuir a tensão superficial no contato do óleo (apolar) com o meio de cultura (polar). No primeiro poço, foram dispensados 50  $\mu\text{L}$  do óleo essencial em teste. Retirando-se 50  $\mu\text{L}$  do poço de maior concentração, foram feitas oito diluições seriadas nos poços consecutivos até a concentração final, após a adição da cultura bacteriana, de 1,95  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . No final, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  da cultura bacteriana com aproximadamente  $5,0 \times 10^3$  células bacterianas em cada um dos poços. Poços sem adição do óleo e sem adição do inóculo foram utilizados para controles de multiplicação e de esterilidade, respectivamente. As placas foram incubadas a  $36^\circ\text{C}$  durante 48 h. Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  de cada uma das cavidades e repicadas em placas de ágar padrão para contagem (PCA) que foram incubadas a temperatura de  $36^\circ\text{C}$  por 48h. A ausência de crescimento bacteriano no meio de cultivo foi indício de que o óleo essencial testado apresentou atividade bactericida. A CBM foi considerada como a menor concentração de óleo na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 2.3 PREPARO DA MASSA PARA EMBUTIDO CÁRNEO

Para o preparo da massa cárnea para o embutido, foram utilizadas partes iguais de carne de coxão bovino e de copa-lombo suíno adquiridas no comércio local, as quais foram moídas em moedor manual previamente limpo e sanitizado, adicionadas de 0,5% de cloreto de sódio e homogeneizadas. Alíquotas de 25 g foram adicionadas dos óleos (*O. vulgare* e mistura em quantidades iguais de *O. vulgare* e *O. basilicum*) nas concentrações 0,5%, 1,0% e 1,5%. Como controles, alíquotas sem adição de óleo também foram analisadas.

### 2.4 CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL

A massa dos embutidos foi experimentalmente contaminada com *Salmonella* sorotipos Typhimurium (ATCC 13311) e Enteritidis (ATCC 13076). Inóculos de diluições seriadas das culturas bacterianas foram preparados e adicionados na massa cárnea de forma a se obter a concentração final de  $10^2$  células bacterianas por grama de massa. Como controle, a massa não contaminada experimentalmente também foi analisada (Barbosa, 2016).

### 2.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As alíquotas de massa cárnea contaminadas experimentalmente e os controles foram armazenados a  $4^\circ\text{C}$  e analisados após 0, 24, 48 e 72 horas. A pesquisa de *Salmonella* foi realizada de acordo com *U.S. Food and Drug Administration – FDA* (Andrews et al., 2016).

## 2.6 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial foi realizada de acordo com Silveira (2012), com algumas modificações. Alíquotas de 150 g da massa com e sem a adição dos óleos essenciais na concentração de 1,5% foram assadas e avaliadas por 60 avaliadores não treinados com faixa etária acima de dez anos de idade. Após assinatura do termo de consentimento, foram aplicadas as fichas de intenção de compra, ficha hedônica e a ficha de pesquisa de mercado.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias dos halos obtidos no teste de disco-difusão foram comparadas pelo teste de Tukey com uso do programa Statistix® (2003).

## 2.8 COMITÊ DE ÉTICA HUMANA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas, conforme parecer nº 1.768.126.

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

Todos os óleos essenciais avaliados no teste de disco-difusão apresentaram atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *E. coli* O157:H7 em diferentes intensidades (Tabela 1).

**TABELA 1** - Tamanho dos halos de inibição (mm) relacionados a atividade antibacteriana dos óleos essenciais, detectados no teste de disco-difusão

Microrganismo	<i>O. vulgare</i> (5µL)	<i>O. basilicum</i> (5µL)	<i>O. vulgare</i> (2,5µL) + <i>O. basilicum</i> (2,5µL)
<i>S. aureus</i>	12,0a	7,0b	11,4a
<i>L. monocytogenes</i>	9,5a	7,5b	7,75 ab
<i>S. Typhimurium</i>	12,6a	7,4b	9,4ab
<i>S. Enteritidis</i>	9,0b	6,8c	12,0a
<i>E. coli</i> O157:H7	9,1a	7,7b	7,5ab

Os dados referem-se à média de triplicatas. Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Os halos de inibição formados pelos óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. basilicum* indicam que estes óleos têm efeito inibitório distinto. *O. vulgare* apresentou atividade antibacteriana mais intensa. Já os halos de inibição do óleo essencial de *O. basilicum* ficaram com diâmetro bem inferior, indicando baixa ação antibacteriana. Estes resultados estão de acordo com outros estudos em que a

atividade antibacteriana de *O. vulgare* também foi observada (Busatta et al., 2007; Araujo e Long, 2016 e Barbosa et al., 2016).

Ahora e Kaur (1999) relatam que halos menores do que 7 mm são considerados não-ativos, e halos superiores a 12 mm possuem inibição satisfatória frente à bactérias. Se forem considerados estes critérios podemos inferir que, com exceção do óleo de *O. basilicum* para *S. Enteritidis*, todos os óleos foram ativos frente as bactérias avaliadas e os óleos de *O. vulgare* frente a *S. Typhimurium* e a mistura de *O. vulgare* (2,5µL) e *O. basilicum* (2,5µL) frente a *S. Enteritidis* tiveram efeitos inibitórios satisfatórios.

Quando analisado o efeito antimicrobiano da mistura dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. basilicum*, observa-se que houve duas situações distintas em que a mistura apresentou ação diferente dos óleos separadamente. Frente a *S. aureus* a mistura manteve a mesma ação apresentada pelo óleo de *O. vulgare* isoladamente, apesar deste óleo estar com a concentração pela metade. Isto significa que o óleo de *O. vulgare* mantém a mesma atividade inibitória tanto quando utilizados 5 µL (quantidade de óleo usada isoladamente) como 2,5 µL (quantidade de óleo na mistura) ou que houve um efeito sinérgico entre os óleos de *O. vulgare* e *O. basilicum* que permitiu a manutenção da ação inibitória mesmo com a metade da concentração de *O. vulgare*. Esta segunda hipótese é reforçada pelo efeito inibitório observado frente a *S. Enteritidis*, onde o diâmetro dos halos induzidos pela ação da mistura dos óleos foi maior do que os halos de qualquer um deles individualmente, indicando que houve sinergismo entre os óleos.

Um dos raros estudos utilizando mistura de óleos foi realizado por Barbosa et al. (2016), que verificou a atividade antibacteriana do óleo essencial de *O. vulgare* misturado com óleo de *R. officinalis* pelo teste de disco-difusão. Os óleos demonstraram interação sinérgica e foram efetivos frente a agentes patogênicos como *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Enteritidis*.

### 3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERÍCIDIA MÍNIMA (CBM)

O óleo essencial de *O. basilicum* não apresentou efeito bactericida nas concentrações testadas (*S. aureus*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*) ou apresentou apenas em altas concentrações (*S. Enteritidis* e *E.coli* O157:H7), o que está de acordo com os resultados obtidos nos testes de disco-difusão, nos quais este óleo apresentou fraco efeito inibitório.

A tabela 2 apresenta os valores da CBM dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. basilicum* e da mistura dos dois óleos.

**TABELA 2** - Concentração bactericida mínima ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) dos óleos essenciais de *O. vulgare*, de *O. basilicum* e da mistura dos dois óleos

Microrganismo	<i>O. vulgare</i>	<i>O. basilicum</i>	<i>O. vulgare</i> + <i>O. basilicum</i>
<i>S. aureus</i>	125	SE*	62,5
<i>L. monocytogenes</i>	125	SE*	250
<i>S. Typhimurium</i>	31,25	SE*	31,25
<i>S. Enteritidis</i>	15,5	250	31,25
<i>E. coli</i> O157:H7	62,5	500	125

Os testes foram realizados em triplicata e os valores foram os mesmos nas três repetições.

\* SE = sem efeito bactericida.

A menor concentração bactericida foi obtida com óleo de *O. vulgare* sobre *S. Enteritidis*. O efeito inibitório deste óleo, na disco-difusão, foi menor do que o da mistura dos óleos, entretanto, na CBM, a mistura necessitou de concentrações mais elevadas do que o óleo de *O. vulgare* isoladamente para exercer seu efeito bactericida sobre *S. Enteritidis*. Estes resultados indicam que o efeito sinérgico verificado no teste de disco-difusão frente a *S. Enteritidis* não foi observado na CBM e que o efeito inibitório observado na disco-difusão não tem relação direta com o efeito bactericida determinado pela CBM, isto pode se dar pela dificuldade de difusão dos óleos no meio e pela barreira física que os óleos fazem no ágar.

Nem sempre a atividade antibacteriana obtida nos testes laboratoriais é observada quando os óleos são adicionados aos alimentos, devido a mudanças na concentração, ambiente do alimento, nutrientes dos alimentos até fatores ambientais e procedimentos de cultivo do condimento. Como as menores concentrações de óleo necessárias para obter efeito bactericida foram observadas frente a *Salmonella*, tanto por *O. vulgare* como pela mistura dos óleos, as cepas de *S. Enteritidis* e de *S. Typhimurium* foram selecionadas para os testes de contaminação experimental em massa para embutido cárneo.

### 3.3 APLICAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *O. VULGARE* E DA MISTURA DOS ÓLEOS DE *O. VULGARE* E *O. BASILICUM* NA MASSA PARA EMBUTIDO CÁRNEO

Apenas na concentração de 1,5% de óleo essencial adicionado à massa para embutido cárneo experimentalmente contaminada foi observado efeito bactericida sobre *Salmonella*, o que já ocorreu logo após a adição dos óleos (Tabela 3). O controle positivo apresentou crescimento de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, e o controle negativo não apresentou crescimento dessas bactérias durante todo o tempo de armazenamento a 4°C.

**TABELA 3** - Recuperação de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium da massa para embutido cárneo experimentalmente contaminada adicionada de óleo essencial de *O. vulgare* e da mistura dos óleos de *O. vulgare* e *O. basilicum*.

Óleos e concentrações	<i>S. Enteritidis</i>				<i>S. Typhimurium</i>			
	0h	24h	48h	72h	0h	24h	48h	72h
<i>O. vulgare</i> 0,5%	P*	P	P	P	P	P	P	P
<i>O. vulgare</i> 1,0%	P	P	P	P	P	P	P	P
<i>O. vulgare</i> 1,5%	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>O. vulgare</i> + <i>O. basilicum</i> 0,5%	P	P	P	P	P	P	P	P
<i>O. vulgare</i> + <i>O. basilicum</i> 1,0%	P	P	P	P	P	P	P	P
<i>O. vulgare</i> + <i>O. basilicum</i> 1,5%	A	A	A	A	P	P	P	P

\*P = presença de *Salmonella* em 25 g; A = ausência de *Salmonella* em 25 g.

O óleo de *O. vulgare* apresentou efeito bactericida sobre ambos os sorotipos do microrganismo. Entretanto, esse mesmo óleo, quando misturado em quantidades iguais ao óleo de *O. basilicum*, perdeu seu efeito bactericida sobre o sorotipo Typhimurium de *Salmonella*. Considerando que o óleo de *O. vulgare* isoladamente não apresentou efeito bactericida sobre *S. Typhimurium* na concentração de 1%, não seria de se esperar que quando foi utilizada a mistura dos dois óleos a 1,5%, onde o óleo de *O. vulgare* está na concentração de 0,75%, apresentasse algum efeito, como ocorreu. Por outro lado, o mesmo não ocorreu em relação a *S. Enteritidis*, que não foi recuperada do alimento experimentalmente contaminado tanto quando misturado ao óleo de *O. vulgare* a 1,5% como quando adicionado da mistura dos óleos a 1,5%, mas foi recuperada do alimento com óleo de *O. vulgare* a 1%, mesmo após 72 horas de armazenamento. Estes resultados sugerem a ocorrência de sinergismo entre os dois óleos, o que também foi observado nos testes de disco-difusão e CBM.

A mistura dos óleos apresentou efeito bactericida distinto frente aos sorotipos Enteritidis e Typhimurium, o que deixa claro que há diferenças entre os sorotipos quanto à susceptibilidade aos óleos de *O. vulgare* e *O. basilicum*. Portanto, os estudos sobre a aplicação de óleos essenciais em alimentos com a finalidade de eliminar *Salmonella*, devem sempre incluir testes com diferentes sorotipos da bactéria, uma vez que a presença de *Salmonella* não é aceitável em alimentos destinados ao consumo humano, independentemente do sorotipo (Brasil, 2001).

Resultados semelhantes aos do nosso trabalho foram obtidos por Barbosa (2010), que avaliou a atividade antibacteriana de óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. basilicum* em amostras de carne moída e hambúrguer bovinos contaminados artificialmente com *Salmonella* e verificou que o óleo essencial de *O. vulgare* na concentração 1,6% na carne moída e 1,2% no hambúrguer possibilitou eliminação de *S. Enteritidis* em 6 horas de contato com o alimento.

### 3.4 ANÁLISE SENSORIAL

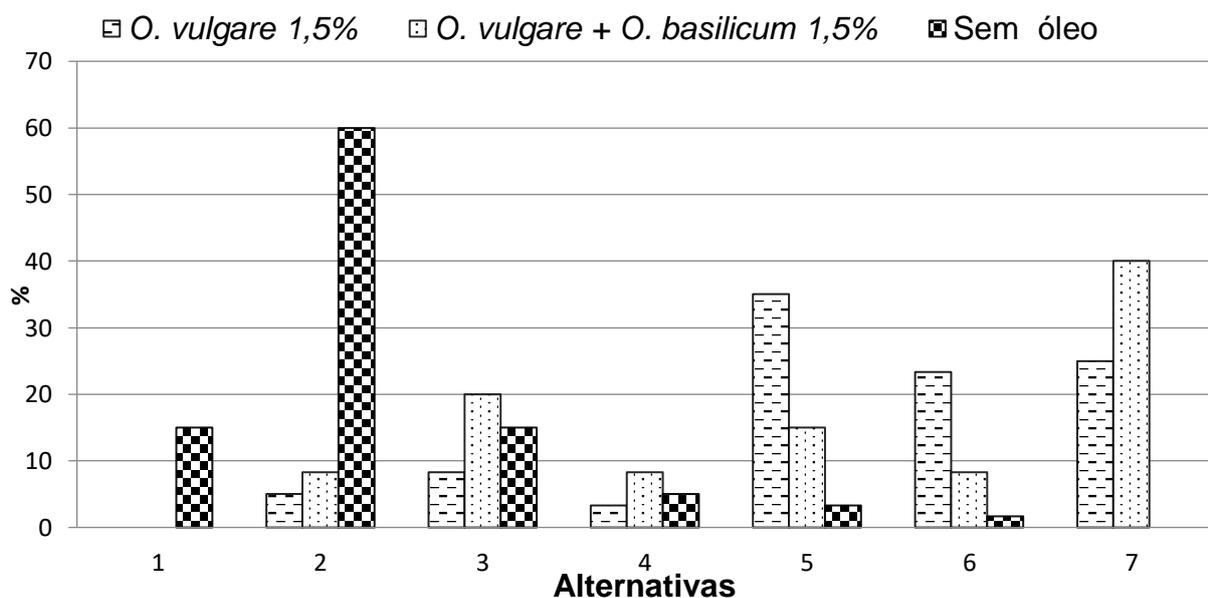
A elaboração da massa para embutido cárneo para a análise sensorial foi realizada na concentração de 1,5% de óleo essencial de *O. vulgare* e 1,5% da mistura dos óleos essenciais de *O.*

*vulgare* e *O. basilicum*, visto que foi essa concentração que apresentou efeito antimicrobiano frente *S. Enteritidis* e *S. Typhimuirum*.

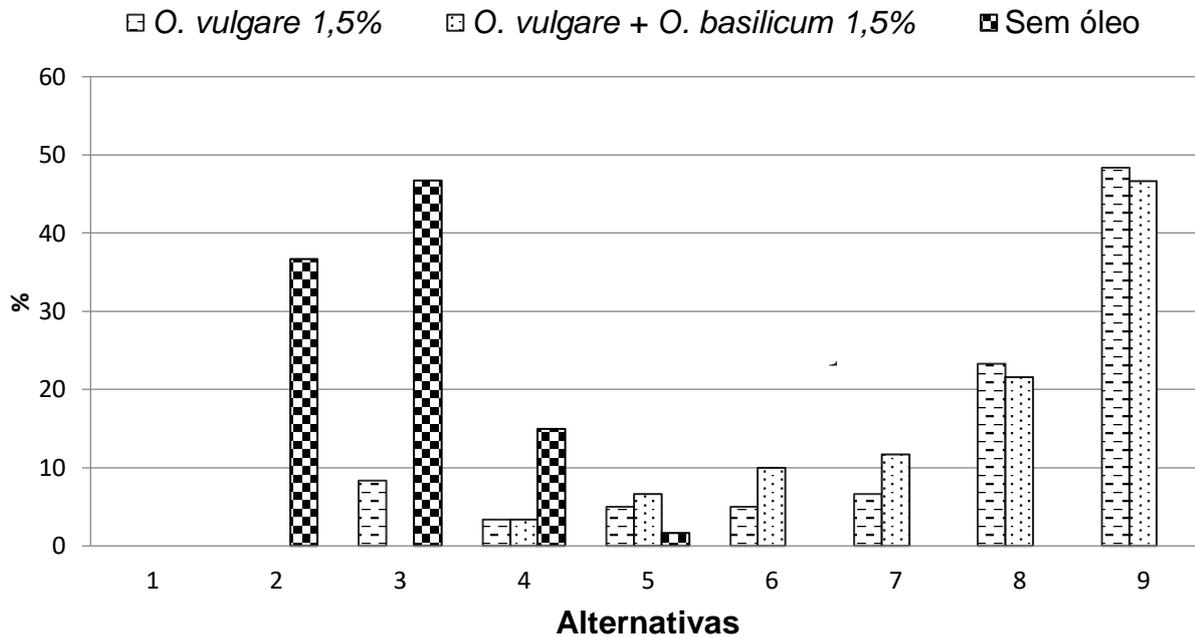
Na análise sensorial foi aplicada a ficha de pesquisa de mercado em que todos os 60 avaliadores relataram que consumiam embutido cárneo e o que mais desgostavam em um embutido cárneo era o excesso de gordura, sal e tempero. Na pergunta “qual o embutido cárneo com condimento você mais gostaria de consumir”, as opções eram “embutido cárneo com manjeriçã, embutido cárneo com orégano, embutido cárneo com manjeriçã e orégano e nenhuma das alternativas”, a maioria dos avaliadores respondeu que prefeririam o embutido cárneo com orégano e manjeriçã, seguido de embutido cárneo com orégano.

O atributo sabor entre o controle (sem adiçã de óleos) e as amostras com óleos essenciais de *O. vulgare* e mistura dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. basilicum* apresentaram diferenças nos percentuais (Figura 1). O controle mostrou percentual elevado para os atributos “gostei moderadamente” e “gostei muito” respectivamente. Já as formulações acrescidas do óleo essencial resultaram em porcentagens de “desgostei muito” e “desgostei extremamente” superiores a opinião “gostei”. Na ficha de intenção de compra as amostras com adiçã de óleo essencial apresentaram percentuais elevados para “decididamente não compraria” e “compraria somente se fosse forçado” (Figura 2). Estes resultados apontam para a não aceitação pelos consumidores do produto adicionado de 1,5% de óleos essenciais, tanto de *O. vulgare* isoladamente quanto da mistura em quantidades iguais com o óleo de *O. basilicum*.

**FIGURA 1** - Teste de intenção de compra para embutido cárneo acrescido de óleos essenciais; 1 = decididamente eu compraria, 2 = provavelmente eu compraria, 3 = talvez sim/talvez não, 4 = provavelmente eu não compraria, 5 = decididamente eu não compraria, 6 = compraria ocasionalmente, 7 = compraria somente se fosse forçado.



**FIGURA 2** - Teste da aplicação da ficha hedônica para embutido cárneo acrescido de óleos essenciais; 1= Gostei extremamente, 2= Gostei muito, 3= Gostei moderadamente, 4= Gostei ligeiramente, 5= indiferente, 6= Desgostei ligeiramente, 7= Desgostei moderadamente, 8= Desgostei muito, 9= Desgostei extremamente.



Como demonstrado, a concentração de 1,5% do óleo utilizada no presente trabalho foi efetiva para reduzir as contagens de contaminantes na massa para embutido cárneo, porém tais concentrações são elevadas e, quando avaliadas sensorialmente, a sua aceitabilidade não obtém o mesmo sucesso.

A maioria dos estudos realizados aponta para o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais, sem mencionar a sua aplicação em alimentos e a aceitabilidade dos consumidores (Ernandes, 2007; Menezes et al., 2009; Caravic et al., 2010, Alves, 2010; Pozzo et al. 2011; Probist, 2012; Andrade, 2013; Al Abbasy et al., 2015; Ansesio, 2015; Araujo e Longo, 2016) ou testam seu efeito antimicrobiano no alimento sem realizar avaliação sensorial (Botre et al., 2010). Dos poucos estudos que avaliaram a aceitação de alimentos adicionados de óleo essencial de *O. vulgare* estão os trabalhos de Barbosa (2010), com carne moída e hambúrguer, e de Santurio (2015), com linguiça. Os produtos avaliados apresentaram aceitação pelos consumidores, porém as concentrações de óleo eram bem inferiores às utilizadas no nosso estudo.

O óleo essencial de *O. vulgare* e a mistura dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. basilicum* na concentração 0,5% e 1,0% não foram capazes de eliminar *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* da massa experimentalmente contaminada. Entretanto, na concentração de 1,5%, *S. Enteritidis* foi eliminada por ambos os tratamentos e *S. Typhimurium* somente pelo óleo essencial de *O. vulgare*. Quando avaliado sensorialmente, o embutido cárneo na concentração de 1,5% não obteve boa aceitação pelos consumidores, apesar de ter apresentado efeito preventivo da contaminação

microbiana. Assim, a utilização de óleos essenciais em alimentos ainda necessita de estudos, que visem a aplicação dos componentes responsáveis pela ação antibacteriana dos mesmos nos produtos, garantindo a segurança microbiológica sem afetar suas características organolépticas. Possíveis alternativas para minimizar os efeitos sensoriais indesejados poderão ser a encapsulação dos óleos essenciais (El Asbahania et al., 2015) antes da adição a massa cárnea ou ainda a elaboração de coberturas ou filmes com os óleos essenciais (Dannenberg et al., 2017).

## REFERÊNCIA

AL ABBASY, D. W. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum* Linn.) **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 8, p. 645-649, 2015.

ALEIXO, C. G. **Efeito dos óleos essenciais e compostos majoritários sobre endósporos de *Clostridium botulinum* inoculados em mortadela**. 2013. 60f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras.

ALVES, R. **Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos de folhas de manjeriço, pimenta de macaco e tomilho sobre patógenos em alimentos**. 2010, 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet: Composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial biológico**. 2013. 227f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ANDREWNS, W.H.; WANG, H.; ANDREW, J.; HAMMACK, T. *Salmonella* U.S Food and Drug Administration Bioteriological analytical manual, Chapter 5, 2016. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 18 set. 2017

ANSESIO, C. M. et al. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum* spp.). Essential oils from Central and Southern Argentina. **Industrial Crops and Products**, v.63, p. 203-213, 2015.

ARAUJO, M. M.; LONGO, L. P. Teste de ação antimicrobiana *in vitro* de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Institute Biológico**, v. 83, p. 1-7. 2016.

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

BARBOSA, N. L. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservantes em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação**. 2010. 121f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução-RDC nº12, de 02/01/01, **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 jan. 2001. Seção I, p. 45-53.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, v. 2 /Brasília: Anvisa, 2010, 904p.

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

BOTRE, D. A. et al. Avaliação de filme com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres**, v. 57, p. 283-291, 2010.

BUSATTA, C. et al. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agente in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 610-616, 2007. .

CARAVIC-STANKO, K. et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v. 119, p. 196-201, 2010.

CARNICER, N. A.; OLIVEIRA, A. P.; AMARAL, F. J.; ANDRIOLI, R. G. L. **Monitoramento dos níveis de nitrito encontrados em linguças artesanais comercializadas em Lins/SP**. 2007. 41f, Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) - Centro Universitário Católico Salesiano, São Paulo.

CLSI. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI (Clinical Lab. Stand. Institute) 35. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2015.

DANNENBERG, G. S. et al. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology** v. 81, p. 314-318, 2017.

DUARTE, M. T. **Avaliação do teor de nitrito de sódio em linguças do tipo frescal e cozida comercializadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil**. 2010, 87f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

EL ASBAHANIA, A. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1, p. 220-243, 2015.

ERNANDES, G. O. M. F.; CRUZ, G. H. C. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. **B. CEPPA**, v. 25, p. 193-206, 2007.

MARTUCCI, J. F. et al. Orégano and lavender essential oils as antioxidante and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 205-213, 2015.

MENEZES, T. O. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Ver Odontol UNESP**, v. 38, p. 184-191, 2009.

ORDÓÑEZ, A.J e colaboradores. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de origem animal, volume 2**. São Paulo: Artmed, 2005. 279p.

POZZO, D. M. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 23, p. 1-6, 2011.

PROBIST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012, 112f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SANTURIO, F. D. **Uso de óleos essenciais de especiarias para controle de coliformes em linguiça toscana**. 2015, 62f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia em Alimentos) – Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

SILVEIRA, S. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais de óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de Louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo frescal**. 2012, 215f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; NARAIM, N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente as perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene Alimentar**, v. 17, p. 38-42, 2003.

STATISTIX®. **Statistix 8 analytical software**. Tallahassee, Florida, USA, 2003.