

Desenvolvimento de *Blends* de óleos essenciais e compostos majoritários no controle de microrganismos indicadores e patogênicos veiculados por alimentos

Development of Blends of Essential Oils and Major Compounds in the Control of Indicator and Pathogenic Foodborne Microorganisms

DOI:10.34117/bjdv7n11-042

Recebimento dos originais: 07/09/2021

Aceitação para publicação: 04/10/2021

Nélio Ranieli Ferreira de Paula

Doutorado em Ciências de Alimentos, Universidade Federal de Lavras -UFLA

Instituição: Instituto Federal de Rondônia - IFRO

Endereço: Avenida Tapajós, 4917, São José - Colorado do Oeste, RO,

CEP: 76993-000

E-mail: nelio.ferreira@ifro.edu.br

Ghabriely Xisto Ricardo

Graduanda em Zootecnia, Instituto Federal de Rondônia - IFRO

Instituição: Estudante - Instituto Federal de Rondônia - IFRO

Endereço: Rua dos Parecis, 4210, Centro - Colorado do Oeste, RO,

CEP: 76993-000

E-mail: ghabixisto@gmail.com

Gleison Serafim Justino

Engenheiro Agrônomo, Instituto Federal de Rondônia - IFRO

Instituição: MapGeo Topografia

Endereço: Rua Cruzeiro do Oeste, 2428, Jardim Paraná - Ariquemes, RO, CEP:76871-

468

E-mail: gleison.justino7@gmail.com

Rebekah Anne Freese

Engenheira Agrônoma, Instituto Federal de Rondônia - IFRO

Instituição: Ag Leader Technology

Endereço: BR 435, km 63 (antiga RO 399, KM 05) – Zona Rural - Caixa Postal 51 -

Colorado do Oeste – Rondônia - CEP 76.993-0000

E-mail: freese.rebekah@gmail.com

Roberta Hilsdorf Piccoli

Doutorado em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa - UFV

Instituição: Universidade Federal de Lavras - UFLA

Endereço: Universidade Federal de Lavras, caixa postal 3037, Departamento de Ciência dos Alimentos. Sala: Ala II – Lavras – Minas Gerais – CEP 37200 - 000

E-mail: rhpiccoli@ufla.br

RESUMO

A aplicação de métodos naturais inovadores para o controle microbiológico em alimentos é vista como uma possibilidade de substituição aos tradicionais métodos existentes no

mercado, as agroindústrias e indústrias responsáveis pelo processamento e preparação dos alimentos podem conferir risco à saúde dos consumidores, devido à alta probabilidade de ocorrências de contaminações por microrganismos indicadores e patogênicos. Com base neste contexto, o presente trabalho avaliou o emprego dos óleos essenciais em embutidos cárneos, sendo eles: presunto, bacon e salame. O uso dos óleos essenciais é uma alternativa de conservação de alimentos pois fornece alimentos mais naturais, frescos e/ou saudáveis e também diminui a concentração de aditivos sintéticos nos produtos. O objetivo deste projeto foi desenvolver e verificar o efeito antimicrobiano de *blends* de óleos essenciais de cardamomo (*Elettaria cardamomum*) e hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*), alecrim (*Salvia rosmarinus*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), e compostos secundários como citral, cineol e eugenol com foco no controle de microrganismos enteropatogênicos como *Escherichia coli* e *Salmonella*, visando a substituição de compostos inorgânicos utilizados atualmente pelas indústrias de processamento de alimentos. O método utilizado para a extração dos óleos consiste no processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado. O delineamento estatístico foi desenvolvido através do fatorial 4 x 4 com 4 repetições, empregando o método de diluição em caldo e difusão em ágar. Com os resultados obtidos através do CMI (concentração mínima inibitória) foi possível detectar os *blends* b8, b9, b13, b14, b15 e b16 com potencial de conservação e armazenamento de embutidos de forma natural e com segurança alimentar.

Palavras chave: Segurança. Bactérias. Saúde. Patógenos.

ABSTRACT

The application of innovative natural methods for microbiological control in food is seen as a possibility of replacing the traditional methods existing on the market, agribusinesses and industries responsible for processing and preparing food can pose a risk to the health of consumers, due to the high probability of occurrences of contamination by indicator and pathogenic microorganisms. Based on this context, the present work evaluated the use of essential oils in meat sausages, namely: ham, bacon and salami. The use of essential oils is an alternative for preserving food as it provides more natural, fresh and/or healthy foods and also reduces the concentration of synthetic additives in the products. The aim of this project was to develop and verify the antimicrobial effect of blends of essential oils of cardamom (*Elettaria cardamomum*) and peppermint (*Mentha piperita*), clove (*Syzygium aromaticum*), rosemary (*Salvia rosmarinus*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), and secondary compounds such as citral, cineol and eugenol focusing on the control of enteropathogenic microorganisms such as *Escherichia coli* and *Salmonella*, aiming to replace inorganic compounds currently used by food processing industries. The method used to extract the oils is the hydrodistillation process in a modified Clevenger apparatus. The statistical design was developed using a 4 x 4 factorial with 4 replications, using the broth dilution and agar diffusion method. With the results obtained through the CMI (minimum inhibitory concentration) it was possible to detect blends b8, b9, b13, b14, b15 and b16 with potential for conservation and storage of sausages in a natural and food safe way.

Keywords: Safety. Bacteria. Health. Pathogens

1 INTRODUÇÃO

A conservação adequada dos alimentos provoca muita preocupação na população mundial. Desde a sua coleta e a maneira como são colhidos, durante o processamento e/ou estocagem até o momento do consumo, os alimentos estão expostos a diversos tipos de contaminações e deteriorações, sendo necessário novas tecnologias para conservação dos alimentos com o intuito de aumentar o tempo de vida útil, assim como, maior tempo na prateleira e em conjunto trazer avanços na qualidade microbiológica e sanitária dos alimentos produzidos (SOUSA et al., 2012).

Os alimentos de origem animal ou vegetal podem conter diversos microrganismos patogênicos causadores de doenças, sendo frescos ou processados (SOUZA et al., 2003). Os patógenos mais preocupantes de origem alimentar são *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli*, provocando o maior número de ocorrência de doenças e mortes (Ricke et al., 2005; Oussalah et al., 2007)

A constante resistência de micro-organismos aos aditivos químicos convencionais tem aumentado a cada ano, apresentando-se ainda mais fortificado, produzindo a carência de utilização de meios naturais e inovadores. Sendo assim, o uso de extratos de óleos essenciais vegetais tem se mostrado promissora ao controle destes micro-organismos contaminantes de alimentos, pois os mesmos possuem diversas características antimicrobianas que podem ser aproveitadas (YAP et al., 2014)

Técnicas de conservação dos alimentos tem sido buscada para obter produtos microbiologicamente seguros. Em destaque há a aplicação de óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas, possuidoras de ação antibacteriana, antioxidante e flavorizantes, além do seu uso no tratamento terapêutico contra doenças infecciosas. Estão também cada vez mais exigidos pelos consumidores, pois fornece alimentos mais naturais, frescos e/ou saudáveis e também diminui a concentração de aditivos sintéticos nos produtos (TAVARES et al., 2014; SILVESTRI et al., 2010).

As plantas produzem naturalmente grandes variedades de metabólitos secundários como forma de proteção natural contra ataques de microrganismos e pragas, produzindo corantes, odores ou atrativos polinizadores, (YAP et al., 2014), que podem ser usados em atividades antimicrobianas em alimentos (antibacterianas), antifúngicas, antivirais, antiparasitárias, antioxidantes, antissépticas e anestésicas (FERNANDES JÚNIOR et al. 2014; OUSSALAH, 2006).

Os óleos essenciais (OE), também chamados de óleos voláteis, são produtos do metabolismo secundário das plantas aromáticas. Os óleos essenciais podem ser

adquiridos por destilação a vapor ou expressão mecânica, resultando em soluções concentradas devido a forma de extração, (YAP et al., 2014). Segundo Bakkali et al (2008), os óleos essenciais não são óleos propriamente ditos, pois não possuem lipídios em sua composição química, mas, são compostos voláteis complexos que são constituídos de 20 a 60 componentes em diversas concentrações. Nesta composição, dois ou três componentes dos OE estão em concentrações maiores, cerca de 20 a 70% em comparação aos demais componentes existentes.

O óleo essencial de cardamomo é extraído das sementes e possui como composto majoritário o 1,8-cineole, também conhecido como eucaliptol, na concentração de 34%, podendo chegar até 50% (WEISS, 2002). O seu óleo essencial pode gerar efeitos terapêuticos e contém várias propriedades farmacológicas, como efeitos anti inflamatórios, analgésicos, antiespasmódicos, antimicrobianos e antioxidante (EL-MALTI et al., 2007; ACHARYA et al., 2010).

Estudos mostram que o óleo essencial de cardamomo inibe o crescimento das bactérias *E. coli* e *S. aureus* com concentrações a 1%, o crescimento das bactérias (PEREIRA et al., 2014). Os autores El-Malti et al. (2007) encontraram resultados positivos referente a sua atividade antimicrobiana contra bactérias, gram negativas e positivas. Eucaliptol têm mostrado efeito no controle de insetos indesejáveis, utilizado como repelente (TRIPATHI et al., 2009).

O óleo essencial de hortelã-pimenta é extraído das folhas e talos. Possui atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica, devido a presença dos compostos mentol, mentona, acetato de metila, iso-mentona (SINGH et al., 2011). A concentração do composto majoritário mentol no óleo pode variar entre 28% a 42%, composto que provoca maior atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas (ISCAN et al., 2002;).

Valeriano et al. (2012) relataram atividade antimicrobiana do óleo essencial de hortelã-pimenta contra *E. coli*, moderadamente contra *Salmonella Enteritidis* e *Enterobacter sakazakii* e baixa atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*. Apresentou atividade antimicrobiana também contra *Clostridium sporogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus Vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella pullorum*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*, inibindo estes microrganismos em concentrações de 10% (ISCAN et al., 2002).

Com o intuito de pesquisar novos *blends* com capacidade de conservação e armazenamento de embutidos cárneos de forma adequada e natural, este projeto visou

desenvolver diferentes *blends* de concentrações de óleos essenciais (OE) e compostos majoritários (CM) para atender os requisitos de segurança alimentar, aceitabilidade dos consumidores e aumentar a vida útil de embutidos, uma vez que os mesmos são conservados em diferentes temperaturas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Instituto Federal de Rondônia – Campus Colorado do Oeste, no laboratório de microbiologia de alimentos, em três etapas. Primeiro, foi realizada a coleta e extração dos óleos essenciais extraídos pelas espécies vegetais. A segunda etapa consistia em isolar, identificar e quantificar microrganismos indicadores das condições higiênicas de manipulação como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e microrganismos patogênicos como *Salmonella* presente nos embutidos coletadas de agroindústrias da região. A terceira etapa consiste em determinar a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de óleos essenciais (OE) extraídos e de seus compostos majoritários (CM) sobre *Escherichia coli*.

2.1 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Foi realizada a extração dos óleos essenciais de cardamomo (*Elettaria Cardamomum*), tomilho (*Thymus Vulgaris*) e hortelã-pimenta (*Mentha Piperita*). O material para extração de óleo essencial foi coletado nas proximidades do município de Colorado do Oeste – RO. O material retirado das espécies vegetais para extração dos óleos essenciais (folhas, frutos, sementes, raízes ou folhas, variando conforme o tipo de espécie) foram repicados e colocados em balão volumétrico, juntamente com água destilada.

O método utilizado para a extração dos óleos foi através dos processos de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado. As extrações foram realizadas em triplicatas para melhor concretização dos dados e seguiram conforme os procedimentos descritos por Silva et al (2012). Após a repicagem do material, foi transferido 500 g do material para balão volumétrico, e adicionado 700 mL de água destilada para cobrir todo material. O tempo de extração foi cerca de 1 hora e 30 minutos. A volatilidade e a insolubilidade dos óleos essenciais em água e a solubilidade em solventes orgânicos permitiram caracterizá-los e promover o seu isolamento.

O óleo obtido foi coletado e acondicionado em frasco de vidro revestido com papel alumínio, previamente esterilizado. Os óleos extraídos foram armazenados na

temperatura de 10°C até serem utilizados para avaliar a atividade antibacteriana de cada óleo. Foram utilizados os compostos majoritários eucaliptol, timol e mentol, adquiridos da Sigma – Aldrich®.

2.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS ALIMENTOS AGROINDUSTRIAIS

As análises microbiológicas foram realizadas segundo as metodologias propostas pela Internacional Commission Microbiologic Specification for Foods

Method - ICMSF (1983) e Silva et al. (2007), exceto quando mencionada.

Foi isolada, caracterizada e quantificada a bactéria patogênica *Escherichia coli*, obtida de embutidos adquiridos por agroindústrias regionais como: queijo mussarela, salame e apresuntado. Foi utilizado amostras de 25g de embutidos coletados de agroindústrias regionais, tais produtos foram retirados aleatoriamente de forma asséptica das embalagens utilizadas na coleta e, em seguida, realizada a homogeneização em 225ml de água peptonada 0,1% (p/v) esterilizada. Todas as amostras foram homogeneizadas durante um minuto.

Para o preparo dos materiais foram utilizados meios de cultura e caldos para a realização das análises, como: caldo Lauril Sulfato Triptose, caldo *Escherichia coli* estes acondicionados em tubos de ensaio, além destes os meios de cultura: Nutrient- ágar, Baird-Parker ágar, *Salmonella Shiguella*, EMB (*Eosin Methylene Blue*).

Os coliformes a 37°C foram quantificados utilizando-se a técnica do número mais provável (NMP). O teste presuntivo foi realizado com a inoculação de quatro alíquotas da amostra em três tubos de ensaio, com auxílio de uma pipeta de 1000 µl, contendo tubos de Durhan invertidos e Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), incubados a 37°C por 24 - 48 horas.

Foram considerados tubos positivos para coliformes a 37°C aqueles que apresentaram turvação e formação de gás. Os resultados foram expressos em logaritmo decimal do número mais provável por grama (log NMP/g).

Os coliformes a 45°C foram quantificados também pela técnica do número mais provável (NMP). Alíquotas foram transferidas dos tubos positivos de coliformes a 37°C, com auxílio de uma alça de repicagem, para tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC) com tubos de Durhan invertidos.

Os tubos foram incubados a 45°C por 48 horas. Sendo considerados tubos positivos para coliformes a 45°C aqueles que apresentaram turvação e formação de gás.

Os resultados foram expressos em logaritmo decimal do número mais provável por grama (log NMP/g).

A análise de contagem bacteriana total foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície, utilizando meio Nutrient- ágar (NT). Foram utilizadas quatro alíquotas da amostra, com auxílio de uma pipeta de 100 µl, esta alíquota foi homogeneizada na placa com auxílio de alça drigalski, sendo as placas incubadas a 37°C por 48 horas. Foi realizada a contagem total de colônias das bactérias, os resultados foram expressos em logaritmo decimal de Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC/g).

Para a análise de *Escherichia coli* foram utilizados quatro alíquotas dos tubos positivos para coliformes a 45°C, no qual foi utilizado 100µl, com auxílio de uma pipeta, esta alíquota foi transferida para uma placa de Petri contendo o caldo EMB (*Eosin Methylene Blue*), posteriormente o líquido pipetado foi homogeneizado na placa com auxílio de alça drigalski, sendo as placas incubadas a 37°C, durante 48 horas. Posteriormente foi realizada a verificação de desenvolvimento de colônias típicas de *Escherichia* sp. sendo os resultados expressos por presença ou ausência desse microrganismo.

As colônias presuntivas de *Staphylococcus* foram quantificadas pelo método de plaqueamento em superfície, utilizando meio Baird-Parker ágar (BP). Foram utilizadas quatro alíquotas da amostra, com auxílio de uma pipeta de 100 µl, esta alíquota foi homogeneizada na placa com auxílio de alça drigalski, sendo as placas incubadas a 37°C por 48 horas. Foi realizada a contagem de colônias típicas desse microrganismo. Os resultados foram expressos em logaritmo decimal das unidades formadoras de colônias por grama (log UFC/g).

Para a análise de *Salmonella* sp. foram utilizadas quatro alíquotas dos tubos positivos para coliformes a 45 °C, no qual foi utilizado 100µl, com auxílio de uma pipeta, esta alíquota foi transferida para uma placa de Petri contendo o meio *Salmonella shiguelia*, posteriormente o líquido pipetado foi homogeneizado na placa com auxílio de alça drigalski, sendo as placas incubadas a 37°C, durante 48 horas. Posteriormente, foi verificado o desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella*, sendo os resultados expressos por presença ou ausência desse microrganismo.

Posteriormente as bactérias identificadas foram isoladas em placas contendo ágar nutriente para serem usadas na avaliação antimicrobiana dos óleos essenciais e compostos majoritários.

2.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS MAJORITÁRIOS

Essa parte do experimento consistiu em avaliar o efeito antimicrobiano de diferentes concentrações de óleos essenciais de cardamomo (*Elettaria cardamomum*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e de seus compostos majoritários eucaliptol, timol e mentol. Os tratamentos foram compostos pela combinação dos arranjos dados pela interação da bactéria isolada com as diferentes concentrações de óleos essenciais (OE) e compostos majoritários (CM), com fatorial 4 x 4, com 4 repetições, ou seja, quatro óleos essenciais/compostos majoritários, com quatro concentrações Tabela 1.

TABELA 1 – Esquema Fatorial de Blends de óleos essenciais e compostos majoritários

| Tratamentos | Misturas de OE / CM | sigla/ Blends | Concentrações |
|-------------|------------------------|---------------|---------------|
| Blends 1 | CINEOL + ALECRIM 1 | CINAL 1 | 50/50 |
| | CINEOL + ALECRIM 2 | CINAL 2 | 100/50 |
| | CINEOL + ALECRIM 3 | CINAL 3 | 100/100 |
| | CINEOL + CAPIM LIMÃO 4 | CINCAL 4 | 100/100 |
| Blends 2 | CITRAL + CAPIM LIMÃO 1 | CITCAL 5 | 75/25 |
| | CITRAL + CAPIM LIMÃO 2 | CITCAL 6 | 100/50 |
| | CITRAL + CAPIM LIMÃO 3 | CITCAL 7 | 100/100 |
| | CITRAL + HOR. PIM. 4 | CITHORP 8 | 100/100 |
| Blends 3 | CRAVO + HOR. PIM. 1 | CRAHORP 9 | 25/75 |
| | CRAVO + HOR. PIM. 2 | CRAHORP 10 | 50/100 |
| | CRAVO + HOR. PIM. 3 | CRAHORP 11 | 100/100 |
| | CRAVO + EUGENOL 4 | CRAEUG 12 | 100/100 |
| Blends 4 | CARDAMOMO + CINEOL 1 | CARDACIN 13 | 50/50 |
| | CARDAMOMO + ALECRIM 2 | CARDALE 14 | 50/50 |
| | CARDAMOMO + EUGENOL 3 | CARDAEUG 15 | 100/100 |
| | CARDAMOMO + CITRAL 4 | CARDACIT 16 | 100/100 |

O estoque dos óleos essenciais e compostos majoritários foi feito pela mistura do solvente caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*), acrescido com emulsificante de leite em pó (0,6%). A partir do estoque foram efetuadas as diluições com caldo TSB. Por exemplo, na concentração de óleo essencial a 1% foi pipetada 990 µL de caldo TSB com emulsificante de leite em pó (0,6%) e 10 µL de óleo. Foram avaliadas as seguintes concentrações (%): 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,03 e 0,015 (v / v). Foi considerada a concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais e compostos majoritários a menor concentração que apresentou inibição de *Escherichia coli*.

A padronização dos inóculos bacterianas foi realizada mediante curva de crescimento. Foi realizada a reativação das culturas, em tubo contendo TSB, incubada na estufa a 37°C por 24 horas, posteriormente foi transferida 100 µL desse tubo para 100 mL

de caldo TSB e incubadas a 37°C, por período *over night*. Foram realizadas leituras periódicas da absorbância (600nm) em espectrofotômetro. As culturas foram padronizadas em aproximadamente 10^8 UFC/mL⁻¹, para seu uso na avaliação do efeito antimicrobiana dos óleos essenciais e compostos majoritários.

A concentração mínima inibitória (CMI) de óleos essenciais e compostos majoritários foi determinada empregando o método de diluição em caldo (técnica de microdiluição) e o método de difusão em ágar, de acordo com o NCCLS (2012) com adaptações.

A técnica de microdiluição, descrito pelos autores Rios & Recio (2005) consiste no uso de microplacas de poliestireno com 96 cavidades onde foi pipetado 150 µL das soluções nas cavidades da microplaca e em seguida foi realizada a diluição seriada, ou seja, a transferência de 150 µL de um poço para outro, em série e, posteriormente, inocula 10 µL da suspensão bacteriana sobre cada poço.

Em cada placa, há o controle positivo, o que consiste em pipetar 150 µL de caldo TSB mais 30 µL da suspensão bacteriana, para verificar que o caldo não interfere no crescimento da bactéria e o controle negativo, o que consiste em pipetar 150 µL do caldo TSB, para verificar que o caldo não esteja contaminado. As microplacas foram vedadas e incubadas a 37°C por 24h. Após esse período, foi realizado o plaqueamento do material das culturas nas cavidades do microplaca em TSA (*Agar Triptona de Soja*) e incubadas a 37°C por 24h. A concentração mínima inibitória (CMI) dos componentes foi aquela onde, após incubação, não foi detectado crescimento bacteriano na placa.

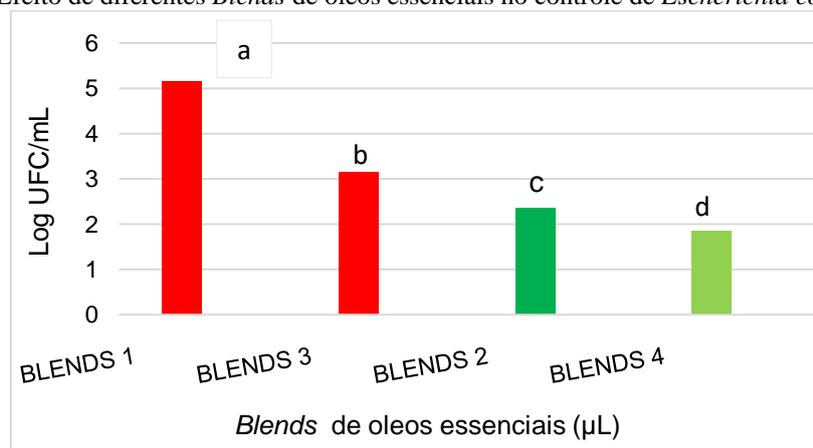
O método difusão em ágar consistiu no uso de placas de petri contendo 20 mL do meio de cultura TSA e Ágar *Hektoen Enteric*, em duplicata. Foi pipetado primeiramente 100 µL a concentração dos óleos essenciais ou compostos majoritários, em seguida foi espalhado até secar com uma alça de drigalski e posteriormente pipetado 30 µL da suspensão bacteriana, e espalhado até secar. As placas foram colocadas na estufa por 24 horas a 37°C para posterior avaliação da atividade antimicrobiana das concentrações, avaliando se houve crescimento ou não de colônias nas placas. Os ensaios foram realizados baseados no método de Kirby-Bauer modificado, descrito pelos autores Barbosa et al. (1988) e Rojas et al. (2006).

Os dados foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa Statistica e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados de *Escherichia coli* ATCC 35401, foram verificados efeitos significativos ($p \leq 0,01\%$) entre os fatores isolados, (A) *blends* e (B) concentração e da mesma forma a interação entre os fatores A (*blends*) e o fator B (concentração) foi significativa ao nível de 1% de probabilidade ($p \leq 0,01\%$). Na Figura 1, visualizamos o efeito isolado do fator A, *Blends* (1, 2, 3 e 4) e neste sentido podemos determinar que os melhores tratamentos foram as misturas compostas pelos *Blends* 2 (citral (75 μ l) + capim limão (25 μ l); citral (100 μ l) + capim limão (50 μ l); citral (100 μ l) + capim limão; citral (100 μ l) + hortelã pimenta (100 μ l) e *Blends* 4 (cardamomo (50 μ L) + cineol (50 μ L), cardamomo (50 μ L) + alecrim (50 μ L), cardamomo (100 μ L) + eugenol (100 μ L) e cardamomo (100 μ L) + citral (100 μ L) pois estes apresentaram resultados abaixo de 2,7 *ciclosLog* conforme os limites críticos para produtos cárneos cozidos, curados ou não, defumados ou não, dessecados ou não, embutidos ou não, refrigerados ou não (mortadela, salsicha, presunto, fiambre, morcelas, patês, galantines) estabelecidos pela ANVISA segundo a IN 60 de 2019. As bactérias gram-negativas (como *Escherichia coli* e *Salmonella*) contém lipopolissacarídeos na membrana externa o que forma uma superfície hidrofílica. Isso cria uma barreira a substâncias hidrofóbicas, como os óleos essenciais, tornando essas bactérias resistentes a esses aditivos (DORMAN & DEANS, 2000).

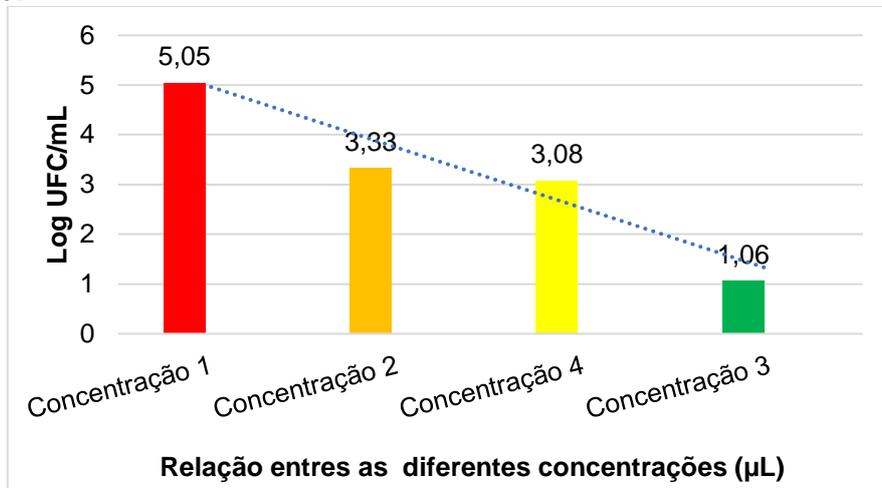
FIGURA 1 – Efeito de diferentes *Blends* de óleos essenciais no controle de *Escherichia coli* ATCC 35401



Na Figura 2 podemos mostra o efeito isolado das diferentes concentrações no que tange haver uma relação significativa entre os diferentes compostos utilizados para o desenvolvimento de diferentes *Blends*. De acordo com os resultados observa se sinergismo entre os diferentes composto pesquisados nestes *blends* pois à medida que aumenta a concentração do primeiro componente (OE) e diminui a concentração do

segundo composto (OE ou composto majoritário) modulou a ação no controle de *Escherichia coli* ATCC 35401.

FIGURA 2 - Efeito isolado de diferentes concentrações na inibição de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 35401



Diversos trabalhos corroboram com estes resultados apresentados nesta pesquisa pois de acordo com (SINGH et al., 2011) o óleo essencial de hortelã-pimenta é extraído de talos e folhas e possui atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica, devido a presença dos compostos mentol, mentona, acetato de metila, iso-mentona. A concentração do composto majoritário mentol no óleo pode variar entre 28% a 42%.

NA Tabela 2 apresenta o resultado de análises de variância (ANAVA) quanto ao desdobramento de interação entre fatores *Blends* & Concentração no controle de microrganismos enteropatogênicos. De acordo com os resultados houve significância ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de tukey, para efeitos de *Blends* dentro de cada concentração no controle de *Escherichia coli* ATCC 35401.

TABELA 2 – ANAVA entre os fatores *Blends* & Concentração no controle de microrganismos enteropatogênicos

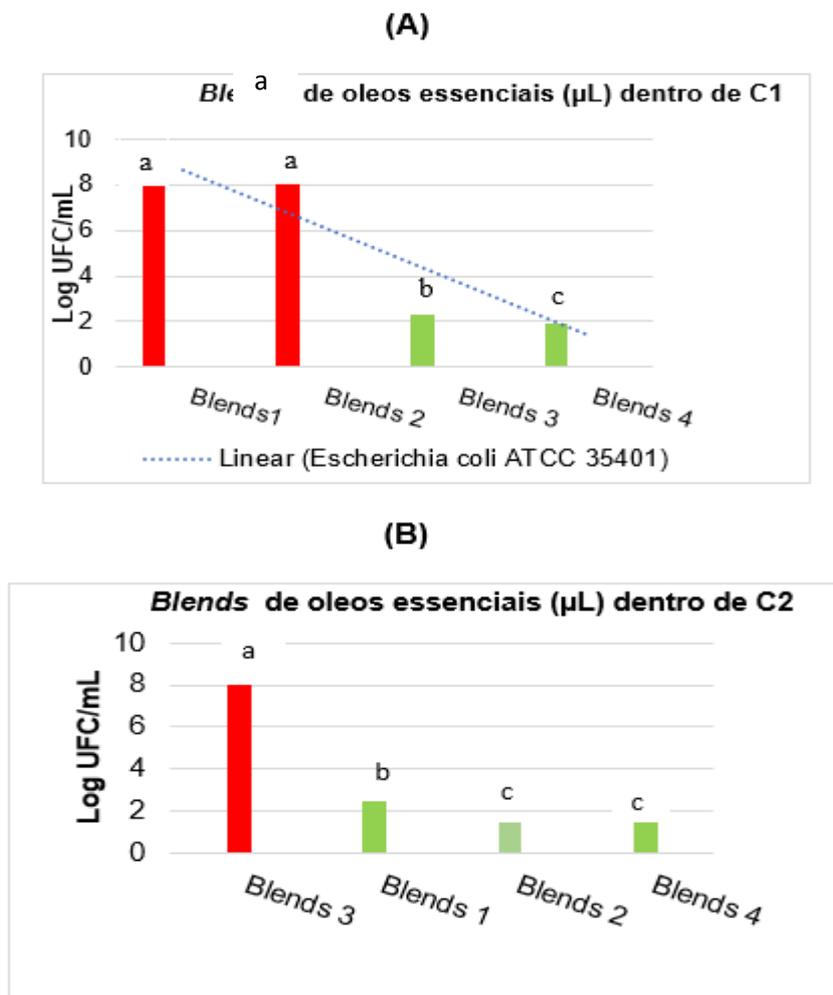
| Causas de Variação | GL | SQ | QM | F | P |
|--------------------|----|--------------|--------------|-----------|----------|
| Fator B1 d. C1 | 3 | 139,50501875 | 46,501672917 | 2108,00** | < 0,0001 |
| Fator B2 d. C2 | 3 | 118,83741875 | 39,612472917 | 1795,70** | < 0,0001 |
| Fator B3 d. C3 | 3 | 18,107475000 | 6,0358250000 | 273,61** | < 0,0001 |
| Fator B4 d. C4 | 3 | 141,53375000 | 47,177916667 | 2138,66** | < 0,0001 |
| Resíduo | 45 | 0,9926812500 | 0,0220595833 | - | |

Nas Figuras 3A, 3B, 4A e 4B mostram as comparações entre as médias de *Blends* dentro de cada Concentração: C1, C2, C3 e C4. De acordo com os resultados, em todas as combinações desenvolvidas entre óleos essenciais (OE) e compostos majoritários e/ou

(OE) obtivemos respostas satisfatórias quanto ao potencial de inovação e desenvolvimento de conservantes biodegradáveis de forma sustentável, sem causar impacto ao ambiente e principalmente a saúde dos consumidores no controle de *Escherichia coli* ATCC 35401.

Duarte et al. (2007) que avaliaram 29 óleos essenciais contra diferentes sorotipos de *E. coli*, observaram que os óleos de *M. piperita*, *O. basiculum*, *O. vulgare* e *Thymus vulgaris* apresentaram concentrações mínimas inibitórias acima de 1000 µg/mL, valores considerados elevados pelos autores. As bactérias gram-negativas (como *Escherichia coli* e *Salmonella*) contém lipopolissacarídeos na membrana externa o que forma uma superfície hidrofílica. Neste sentido, havendo uma barreira de substâncias hidrofóbicas reduz o mecanismo ação de alguns *blends* de óleos essenciais, no entanto o *blends* utilizando compostos majoritários potencializa na ação contra enterobactéria conforme verificado nesta pesquisa.

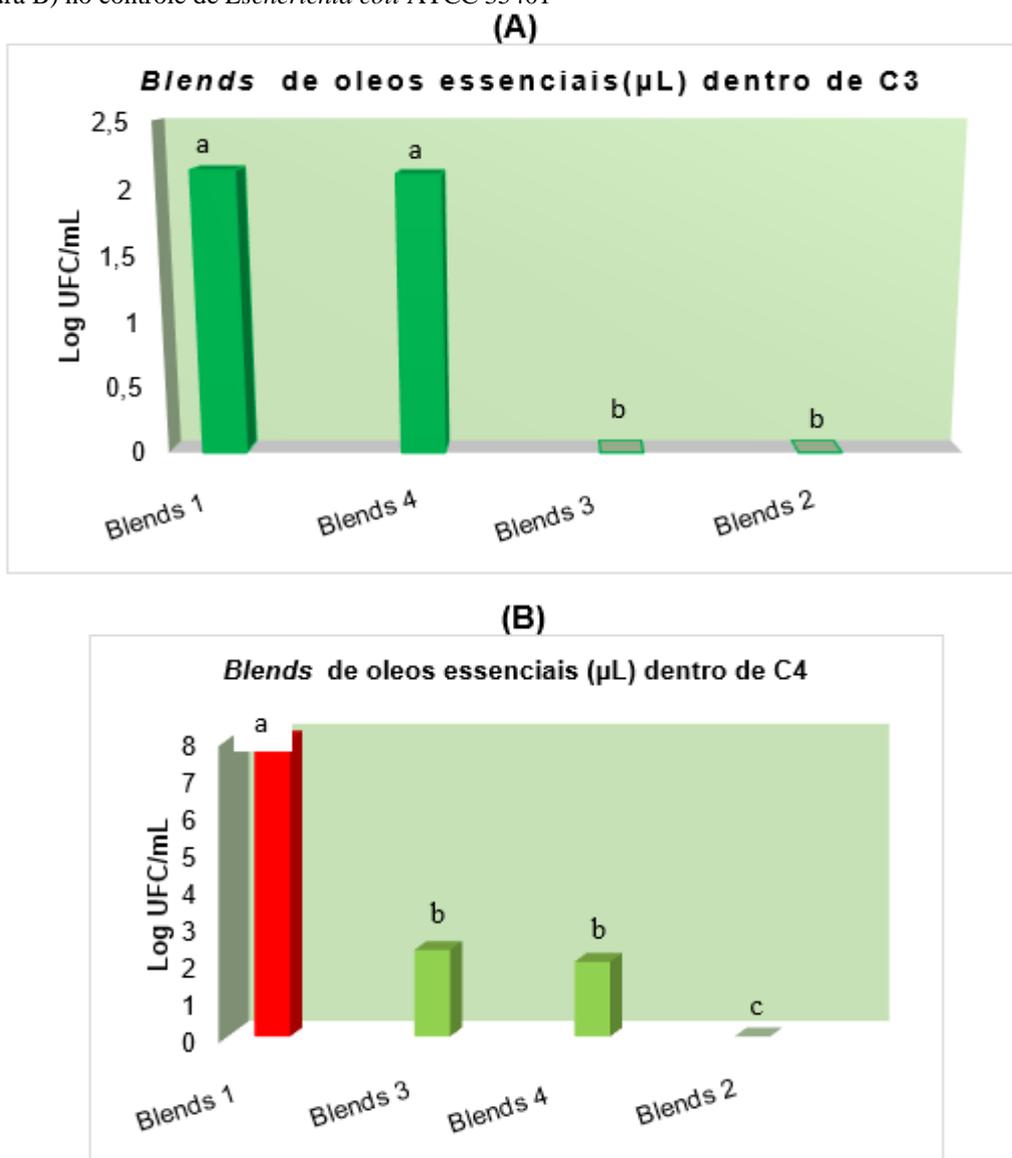
FIGURA 3 – Desdobramento de *Blends* (µL) dentro da **Concentração 1** (Figura A) e **Concentração 2** (Figura B) no controle de *Escherichia coli* ATCC 35401



Vale destacar que nos desdobramentos de *BLENDS* 1, 2, 3 e 4 dentro das concentrações C3, Figura 4A constataram os melhores resultados quanto ao efeito bacteriostático e bactericida contra microrganismos enteropatogênicos, uma vez que nestes *BLENDS* nestas concentrações foram determinados os melhores efeitos para controle de microrganismos indicadores e patogênicos, conforme avaliado nesta pesquisa também para *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* ATCC 35401. Óleos ricos em compostos fenólicos possuem atividade antimicrobiana sobre bactérias da família *Enterobacteriaceae* (PEÑALVER et al., 2005).

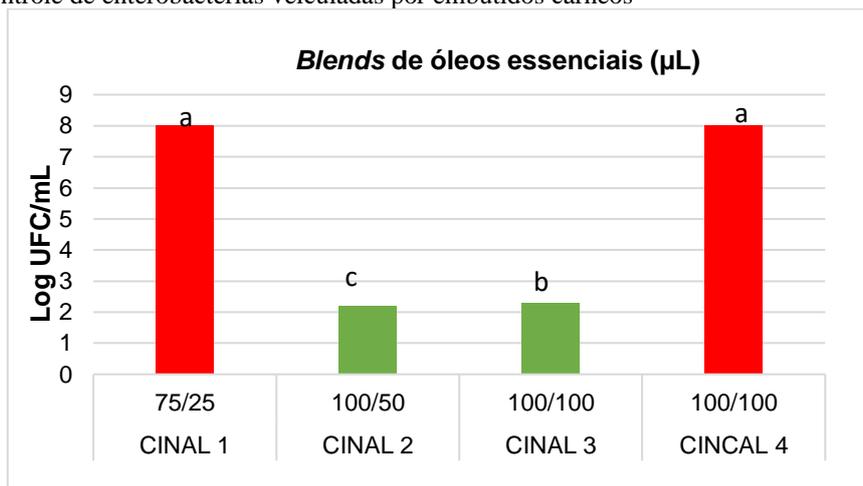
De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 4A e 4B podemos observar as melhores concentrações e combinações de *blends* de óleos e ou compostos majoritários pois estas foram eficientes quanto aos *Blends*: 1, 2, 3, e 4 no controle de enterobactérias e também quanto ao atendimento da legislação vigente IN 60 da ANVISA, Brasil 2019. Outro fator importante além de promoverem a redução média de 6 ciclosLog no controle bacteriano estes *blends* nestas concentrações também apresentaram as melhores respostas bactericida e bacteriostática conjuntamente.

FIGURA 4 - Desdobramento de *Blends* (μL) dentro da **Concentração 3** (Figura A) e **Concentração 4** (Figura B) no controle de *Escherichia coli* ATCC 35401



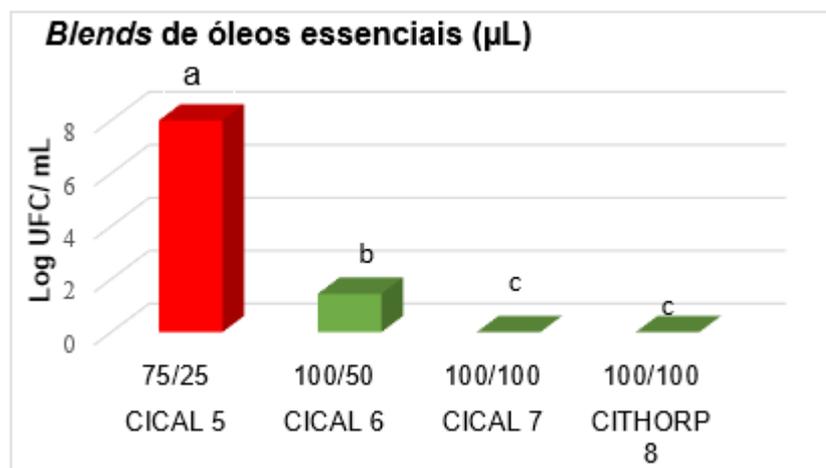
Semelhantemente, foi verificado efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade para todas concentrações pesquisadas dentro de cada *blends*. De acordo com a Figura 5A nos tratamentos: B4, ou seja, cineol (100 μL) +alecrim (50 μL), e B7 cineol (100 μL) +alecrim (100 μL) foram detectadas as melhores concentrações quanto ao controle de enterobactérias ficando estas concentrações abaixo do limite crítico estabelecido pela legislação, Brasil 2019.

FIGURA 5 A Efeito de diferentes concentrações de *blends* de óleos essenciais de cineol, alecrim e capim limão no controle de enterobactérias veiculadas por embutidos cárneos



Neste sentido de acordo com a Figura 5B, e 5C as concentrações pesquisadas mostraram melhores respostas e semelhanças quanto a interação entre os óleos utilizados nos desenvolvimentos destes *blends* para controle de microrganismos indicadores e patogênicos de produtos cárneos embutidos, descobriu se que aumentar a concentração de citral e diminuir a concentração de capim limão melhora ação antimicrobiana e neste sentido verificou se efeito bacteriostático e bactericida para: CICAL6; CICAL7 respectivamente . Vale destacar que o *blends* de citral com hortelã pimenta (CITHORP8) também promoveu efeito bactericida no controle de microrganismos enteropatogênicos.

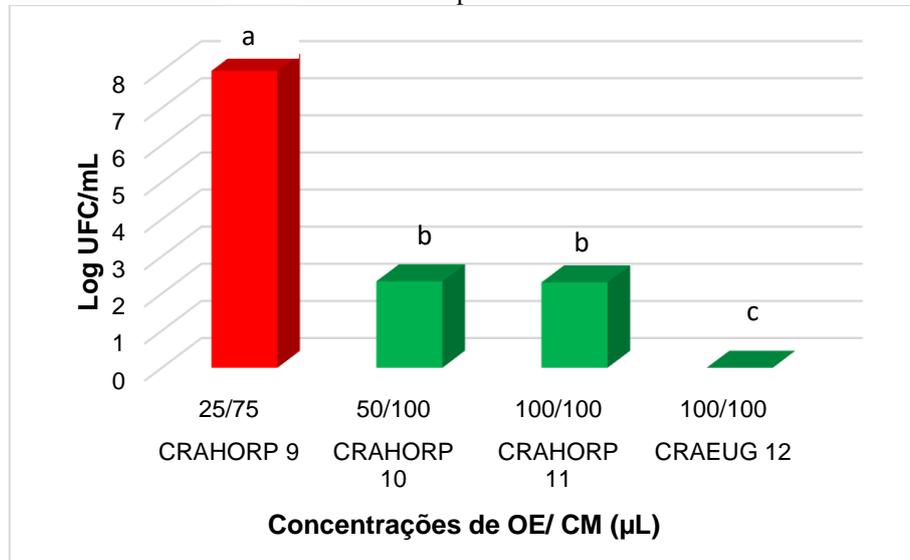
FIGURA 5 B Efeito de diferentes concentrações de *Blends*: citral, capim limão e hortelã pimenta no controle de enterobactérias isoladas de embutidos cárneos



De acordo com a Figura 5C existe modulação entre a concentração de cravo da índia e hortelã pimenta, constatou se que o uso de eugenol, composto majoritário, potencializa ação antimicrobiana contra microrganismos patogênicos na elaboração de

conservante biodegradável para conservação de alimentos embutidos. A concentração de 100 μL de cravo +100 μL eugenol foi superior ao *blend* cravo da Índia (100 μL) + hortelã pimenta (100 μL).

FIGURA 5 C Efeito de diferentes concentrações de *blends* de óleos essenciais de cravo, hortelã pimenta e eugenol no controle de enterobactérias veiculadas por embutidos cárneos



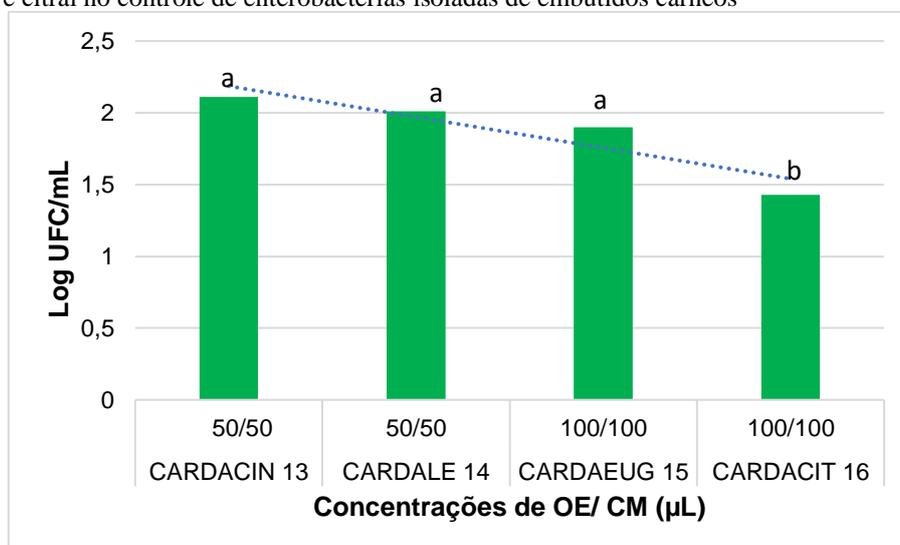
De acordo com Ernandes & Garcia-Cruz (2007) o óleo essencial de cravo da Índia mostrou 43,3% de halos de inibição bacteriana, enquanto o de hortelã apresentou 37,5%, sendo as bactérias gram positivas mais sensíveis ao efeito dos óleos com 44,2% de frequência de halos formados em relação às Gram negativas com 36,7%, conforme Silvestri et al. (2010). De acordo com Burt (2004) os óleos essenciais de eugenol, couve, cravo-da-Índia, orégano e tomilho inibem bactérias patogênicas em produtos cárneos e são efetivos nas concentrações de 0,5 a 2,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Resultados semelhantes foram obtidos nesta pesquisa, pois constatou inibição e redução significativa de 6 *ciclosLog* utilizando *blends* de cravo/hortelã pimenta, e cravo/eugenol contra enterobactérias isoladas nesta pesquisa.

Na Figura 5D apresenta os resultados de desdobramento do fator B (Concentração) dentro dos diferentes *blends* pesquisados (fator A). Para tanto, existe interação significativa ao nível de 1% de probabilidade entre os fatores pelo teste de tukey. Todas concentrações pesquisadas nos *blends* (50 μL cardamomo/50 μL cineol; 50 μL cardamomo/50 μL alecrim; 100 μL cardamomo/100 μL eugenol e 100 μL cardamomo/100 μL citral) atendem aos limites críticos estabelecidos pela legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, conforme apresentado na IN 60 de 2019. Neste

sentido verificou se maiores possibilidades de combinações tanto com OE quanto com CM quanto a promover reduções logarítmicas significativas no que tange o controle de enterobactérias patogênicas e microrganismos indicadores.

Segundo Pereira et al. (2014), o óleo essencial de cardamomo apresentou atividade antimicrobiana inibindo a *S. aureus* nas CMI de 4%, apresentando-se sensível à bactéria em estudo, pois 30 minutos após a desinfecção desse óleo essencial, houve redução significativa do número de células da bactéria, portanto a solução de cardamomo a 1% não reduziu o número de células viáveis das bactérias, sendo não considerada efetiva. Porém nesta pesquisa utilizando concentrações semelhantes obtivemos resposta satisfatórias dentro dos limites críticos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil 2019.

FIGURA 5 D Efeito de diferentes concentrações de *blends* de OE e/ou CM de cardamomo, cineol, alecrim e eugenol e citral no controle de enterobactérias isoladas de embutidos cárneos



O óleo essencial de cravo da Índia (*Caryophyllus aromaticus* L. - *Myrtaceae*) está presente na planta em grande quantidade, entre 15% e 25% e é utilizado na culinária, nas indústrias de alimento e também na medicina. O principal constituinte deste óleo é o ácido cinâmico (70% a 80%) e eugenol (4% a 7%) (Matan et al., 2006) e a ação antimicrobiana é relatada frente a inúmeros microrganismos (Dorman & Deans, 2000).

4 CONCLUSÃO

Os *blends* pesquisados nas concentrações de C3 apresentaram melhores resultados quanto à ação bacteriostática e bactericida contra microrganismos enteropatogênicos, indicadores como *Salmonella sp.* e *Escherichia coli* ATCC 35401. As combinações de

óleos essenciais e compostos majoritários dentro da concentração C3 contribuem de forma substancial para desenvolvimento inovador de conservante biodegradável e sustentável no que tange a conservação de embutidos, segurança, saúde e atendimento á legislação vigente.

Existe modulação entre a concentração de cravo da índia e hortelã pimenta, pois constatou se que eugenol, composto majoritário, potencializa o efeito antimicrobiano contra microrganismos patogênicos na elaboração de conservante biodegradável para conservação de alimentos embutidos. Semelhantemente descobriu se que o aumentar a concentração de citral e diminuir a concentração de capim limão modula significativamente ação antimicrobiana promovendo efeito bacteriostático e bactericida conjuntamente contra enterobactérias.

Todas concentrações pesquisadas nos *blends* 4 (50 μ L cardamomo/50 μ L cineol; 50 μ L cardamomo/50 μ L alecrim; 100 μ L cardamomo/100 μ L eugenol e 100 μ L cardamomo/100 μ L citral) atendem aos limites críticos estabelecidos para enterobactérias.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Rondônia *Campus* Colorado do Oeste pelo suporte financeiro e o espaço na instituição de ensino para o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, A.; DAS, I.; SINGH, S.; SAHA, T. Chemopreventive Properties of Indole-3 Carbinol, Diindolylmethane and Other Constituents of Cardamom Against Carcinogenesis. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v.2 n.2, p.166– 177, 2010.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. **Efeitos biológicos de óleos essenciais** - uma revisão. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46 (2): 446–75.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – IN 60 de 23 de dezembro de 2019. **Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 de dezembro de 2019. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resolucoes/>>. Acesso em: 04/10/2021.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in 650 foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 651 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.
- CHANG, W.C.; HSU, F.L. Inhibition of platelet activation and endothelial cell injury by polyphenolic compounds isolated from *Lonicera japonica* Thunb. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.45, n.4, p.307- 12, 1991.
- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. (2000) Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils. **Journal of Applied Microbiology**, 88, 308-316. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- DUARTE, M.C.T. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.197–201, 2007.
- EL-MALTI, J.; MOUNTASSIF, D.; AMAROUCH, H. Antimicrobial activity of *Elettaria cardamomum*: toxicity, biochemical and histological studies. **Food Chemistry**, v.104, n.4, p.1560–1568, 2007.
- ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. **Atividade Antimicrobiana de Diversos Óleos Essenciais em Microrganismos Isolados do Meio Ambiente.** B.CEPPA, Curitiba v. 25, n. 2, p. 193-206 jul./dez. 2007.
- FERNANDES JÚNIOR, A.; SILVA, G. S.; BARBOSA, L. N.; ALVES, F. C. B.; ANDRADE, B. F. M. T.; ALBANO, M.; DI STASI, L. C. Medicinal Plants from the Brazilian Savanna with Antibacterial Properties. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, p.1-13. 2014.
- ISCAN, G. et al. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.14, p.3943-6, 2002.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos:** características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, 1998. 606 p.

MATAN, N. et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, n.2, p.180-5, 2006.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, n.5, p.414-20, 2007.

PEÑALVER, P. et al. Antimicrobial activity of five essential oils against origin 1831 strains of the Enterobacteriaceae Family. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.113, p.1-6, 2005.

PEREIRA, A. A.; PICCOLI, R. H.; BATISTA, N. N.; CAMARGOS, N. G.; OLIVEIRA, M. M. M. Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* Enteritidis por óleos essenciais. **Ciência Rural**, v.44, n.11, p.2022-2028, 2014.

RICKE, S.C. et al. Alternatives to antibiotics: chemical and physical antimicrobial interventions and food-borne pathogen response. **Poultry Science**, v.84, n.4, p.667- 75, 2005.

SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v.57, n.5, p.589-594, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Varela. 2007.552 p.

SINGH, R.; SHUSHNI, M.A.M.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activity of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, v.4, n.1, p.1-20, 2011.

SOUSA, L.C.S.; SOUSA, J.S.; BORGES, M.G.B.; MACHADO, A.V.; SILVA, M.J.S.; FERREIRA, R.T.F.V.; SALGADO, A.B. Tecnologia de embalagens e conservação de alimentos quanto aos aspectos físico, químico e microbiológico. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 8, n. 1, p. 19- 27, 2012.

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

TAVARES, F. O.; PIERETTI, G. G.; ANTIGO, J. L.; POZZA, M. S. S.; SCAPIM, M. R.S.; MADRONA, G. S. Cobertura comestível adicionada de óleos essenciais de orégano e alecrim para uso em ricota. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.69, n.4, p.249-257, 2014.

TEIXEIRA, J. J. M; BESERRA, S. J. O; SILVA, I, C, L; LIMA, C.G. Análise antimicrobiana dos óleos essenciais de palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) J. F. Watson) e pimenta rosa (*Schinus terebinthifolia* Raddi) frente á *Staphylococcus aureus*

multiressistentes. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n° 6, p. 34935-34953, jun. 2020

TRIPATHI, A. K.; SINGH, A. K.; UPADHYAY, S. Contact and fumigant toxicity of some common spices against the storage insects *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v.29, n. 3, p. 151-157, 2009.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R.H.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s.v.14, n.1, p.57-67, 2012.

WEISS, E. A. **Spice crops**. CABI Publishing, Wallingford, UK. 2002.

YAP, P.S.X.; YIAP, B.C.; PING, H.C.; LIM, S.H.E. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal**, v. 8, n. 1, p. 6-14, 2014.