



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais
sobre micro-organismos patogênicos em vôngole
(*Anomalocardia brasiliana*)**

JULIANA CANTALINO DOS SANTOS

Salvador-BA

2010

JULIANA CANTALINO DOS SANTOS

**Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais
sobre micro-organismos patogênicos em vôngole
(*Anomalocardia brasiliana*)**

Orientador: Prof. Dr. Celso Duarte Carvalho Filho

Co-orientador (a): Prof^a Dra Tânia Fraga Barros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal da Bahia em cumprimento aos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Salvador- Ba

2010

JULIANA CANTALINO DOS SANTOS

**Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais
sobre micro-organismos patogênicos em vôngole
(*Anomalocardia brasiliana*)**

Aprovada em: 15 de Julho de 2010.

Banca Examinadora:

**Profª Norma Suely Evangelista Barreto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia**

**Profª Aláise Gil Guimarães
Universidade Federal da Bahia**

**Prof. Dr. Celso Duarte Carvalho Filho
Orientador FFAR - UFBA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais sobre micro-organismos patogênicos do vôngole (*Anomalocardia brasiliensis*) durante o armazenamento sob refrigeração

Autor: Juliana Cantalino dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Celso Duarte Carvalho Filho

Co-orientador (a): Prof^a Dra Tânia Fraga Barros

Aprovada em: 15 de Julho de 2010.

Banca Examinadora:

Prof^a Norma Suely Evangelista Barreto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof^a Aláise Gil Guimarães
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Celso Duarte Carvalho Filho
Orientador FFAR - UFBA

"É melhor atirar-se à luta em busca de dias melhores, mesmo correndo o risco de perder tudo, do que permanecer estático, como os pobres de espírito, que não lutam, mas também não vencem, que não conhecem a dor da derrota, nem a glória de ressurgir dos escombros. Esses pobres de espírito, ao final de sua jornada na Terra não agradecem a Deus por terem vivido, mas desculpam-se perante Ele, por terem apenas passado pela vida."

Bob Marley

Aos meus pais Josmário Mercês e Conceição Cantalino pelo exemplo de vida e afeto

Ao meu marido Rodrigo Miranda pelo apoio incondicional.

A todos os meus amigos que tanto me ajudaram nesta trajetória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma etapa concluída, após meses de estudo e desafios...

Ao Prof. Dr. Celso Duarte de Carvalho Filho por acreditar e incentivar o estudo, propiciando informações úteis durante o desenvolvimento deste trabalho!

À Prof^a Dra. Tânia Fraga Barros pelo exemplo de responsabilidade, pelos conselhos, pela amizade conquistada, e finalmente, pela orientação na execução do trabalho.

À Prof^a Dra. Alaíse Gil Guimarães pelo carinho, atenção, disponibilidade que tanto contribuíram ao meu estudo.

À Prof^a Dra. Norma Suely Evangelista Barreto pela contribuição ao estudo.

Ao Prof^o Miguel Fascio pelo auxílio e viabilização da obtenção dos extratos com atividade antimicrobiana.

À Prof^a Maria Spínola pela gentileza e palavras de conforto em momentos difíceis durante esta jornada.

À Prof^a Dra Eliane Ferrarezzo pela amizade e sábias contribuições ao trabalho realizado.

À Dra Selma Turrióni e Luciane Sousa pela amizade e apoio nesta minha fase profissional.

As pesquisadoras do laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC): Corine, Adriana, Manuela, Carol, Débora e Silvia pela gentileza que sempre me receberam durante as análises e pelo convívio durante o período de experimento.

As pesquisadoras Juliana Azevedo e Roberta Meneses pelo fundamental apoio durante as análises microbiológicas.

Ao amigo Daniel Ferreira pelos bons momentos de diálogos.

Aos meus irmãos, que mesmo distantes, são uma fonte de exemplo e orgulho.

A minha outra mãe e avós queridas, Rita de Cássia, Iolanda Miranda e Hildete de Cantalino pelo carinho.

À Priscila Oliveira pela gentileza e presteza que sempre atendeu as minhas solicitações durante a construção de trabalho,

À Luísa Costa e Maili Campos pela enorme contribuição nas análises estatísticas do trabalho.

Ao grupo de pesquisa em Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia pela amizade formada, pelo carinho.

Aos meus, muito mais que colegas de turma, amigos do Programa de Mestrado em Ciência de Alimentos, Daniel, Adriana, Carol, Manu, Betha, Daniela, Léo, Geraldo e Luciene pelos momentos de encontro e aprofundamento intelectual durante e após as aulas ministradas. Nossa amizade pode ter várias vírgulas, mas nunca um ponto final, apesar das distancias gostei muito de ter conhecido vocês.

E a todos aqueles que por ventura não foram citados o meu sincero obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 15 |
| OBJETIVO GERAL | 17 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| CAPITULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 1. Antimicrobianos em Alimentos..... | 18 |
| 2. Óleos essenciais com atividade antimicrobiana | 19 |
| 2.1 Óleo Essencial de Orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.)..... | 21 |
| 2.2 Óleo Essencial de Cravo (<i>Syzygium aromaticum</i> L.) | 23 |
| 2.3 Óleo Essencial de Alho (<i>Allium sativum</i> L.)..... | 24 |
| 2.4 Óleo Essencial de Limão (<i>Citrus limon</i>) | 26 |
| 3 Micro-organismos patogênicos | 26 |
| 3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> | 27 |
| 3.2 <i>Escherichia coli</i> | 29 |
| 3.3 <i>Salmonella spp.</i> | 30 |
| 4 Micro-organismos patogênicos em mariscos | 33 |
| 5 Caracterização do vôngole (<i>Anomalocardia brasiliana</i>)..... | 34 |
| REFERÊNCIAS..... | 36 |
| CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO, ALHO, CRAVO E LIMÃO SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM VÔNGOLE. | 44 |
| RESUMO..... | 44 |

| | |
|---|----|
| ABSTRACT | 44 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 45 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 47 |
| 2.1 Micro-organismos..... | 47 |
| 2.2 Óleos essenciais | 48 |
| 2.3 Teste de susceptibilidade in vitro | 49 |
| 2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima | 50 |
| 2.5 Análise estatística | 50 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |
| 4. CONCLUSÃO | 57 |
| REFERÊNCIAS..... | 58 |
| CAPÍTULO III: CONTROLE DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS ARTIFICIALMENTE INOCULADOS EM VÔNGOLE (<i>Anomalocardia brasiliiana</i>) ATRAVÉS DO USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS..... | |
| RESUMO..... | 61 |
| ABSTRACT | 61 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 62 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 64 |
| 2.1. Avaliação microbiológica do vôngole | 64 |
| 2.2. Avaliação microbiológica do vôngole inoculado artificialmente e óleos essenciais | 65 |
| 2.3. Preparo do marisco | 65 |
| 2.4. Preparação do inóculo | 66 |
| 2.5. Inoculação das cepas no vôngole | 66 |

| | |
|---|----|
| 2.6. Preparação e Adição dos óleos essenciais no vôngole | 66 |
| 2.7. Análise microbiológica do vôngole inoculado artificialmente e óleos essenciais | 67 |
| 2.8. Recuperação <i>Salmonella</i> spp., <i>E.coli</i> e <i>S. aureus</i> | 68 |
| 2.9 Análise Estatística | 68 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 69 |
| 3.1. Análise microbiológica do vôngole | 69 |
| 3.2. Análise Microbiológica do vôngole inoculado artificialmente e óleos essenciais | 70 |
| 3.2.1 Enumeração de <i>S.aureus</i> | 70 |
| 3.2.2. Enumeração de <i>E.coli</i> | 73 |
| 3.2.3. Enumeração de <i>Salmonella</i> spp. | 76 |
| 4. CONCLUSÃO | 78 |
| REFERÊNCIAS | 79 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 83 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1: Atividade antibacteriana de diferentes óleos essenciais. 51

Tabela 2: Resultado da Concentração Mínima Inibitória de diferentes óleos essenciais (mL/mL). 51

CAPÍTULO III

Tabela 1: Resultados das análises microbiológicas do vôngole obtido no comércio.
..... 71

Tabela 2: Valores médios de log (UFC/g) das cepas de *S. aureus* inoculadas artificialmente no vôngole durante o armazenamento..... 63

Tabela 3: Valores médios de log (UFC/g) das cepas de *E. coli* inoculadas artificialmente no vôngole durante o armazenamento..... 65

Tabela 4: Valores médios de log (UFC/g) das cepas de *Salmonella* spp. inoculadas artificialmente no vôngole durante o armazenamento..... 68

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1: Placa com cultura de *S. aureus*, mostrando halos de inibição pelo óleo essencial de orégano através da técnica de difusão em disco..... 44

Figura 2: Placa com cultura de *S. aureus*, mostrando halos de inibição pelo óleo essencial de cravo através da técnica de difusão em poços..... 46

CAPÍTULO III

Figura 1: Valores médios de log (UFC/g) de cepas de *S. aureus* artificialmente inoculadas ao vôngole durante armazenamento..... 64

Figura 2: Valores médios de log (UFC/g) de cepas de *E. coli* inoculadas artificialmente ao vôngole durante o armazenamento..... 66

Figura 3: Valores médios de log (UFC/g) de cepas de *Salmonella* inoculadas artificialmente ao vôngole durante o armazenamento..... 68

RESUMO

Os óleos essenciais têm se apresentado como uma alternativa eficaz para a conservação de alimentos devido ao seu poder antimicrobiano. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais disponíveis no comércio da marca Laszlo Aromalândia (São Paulo- Brasil), como o de alho (*Allium sativum*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), orégano (*Origanum vulgare ssp. Hirtum*) e limão siciliano (*Citrus limonum medica*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas do bivalve *Anomalocardia brasiliana* e cepas padrão de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella cholerasuis*. Para isso foi utilizado a técnica de difusão de disco e Concentração Inibitória Mínima (CIM). Em seguida avaliou a atividade antibacteriana dos óleos essenciais que apresentaram atividade antibacteriana *in vitro*, como o de cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*) e orégano (*Origanum vulgare ssp. Hirtum*) sobre as cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* inoculadas artificialmente em amostras de *Anomalocardia brasiliana* e armazenadas durante cinco dias sob refrigeração avaliar a ação dos óleos essenciais, no vôngole durante o armazenamento sob refrigeração. Neste experimento observou-se que o óleo essencial de alho apresentou atividade antibacteriana frente o *S. aureus* e a *S. cholerasuis*; já os óleos de cravo e orégano apresentaram atividade frente a todas as bactérias analisadas. O óleo essencial de limão não demonstrou atividade antibacteriana. Os resultados demonstraram a maior eficácia do óleo essencial de orégano em relação ao de cravo sobre todas as cepas analisadas. Verificou-se que a adição do óleo essencial reduziu a população de *Salmonella spp* em 5,6 ciclos logarítmicos nas amostras de vôngole artificialmente inoculados. A ação do óleo essencial de cravo garantiu a inibição de *Salmonella*, *E. coli* e *S. aureus*, por no mínimo dois dias, sob refrigeração.

PALAVRAS-CHAVE: óleo essencial, cravo, orégano, antibacteriano, vôngole.

ABSTRACT

The essential oils have presented an efficient alternative for food conservation due to its power antimicrobials. The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of available essential oils in the commerce of the mark Laszlo Aromalândia (São Paulo- Brazil), as the of garlic (*Allium sativum*), glove (*Eugenia caryophyllata*), oregano (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*) and lemon (*Citrus limonum medicates*) on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated of the *Anomalocardia brasiliiana* and standard of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella cholerasuis*, through the technique of record diffusion and of the determination of Minimum the Inhibition Concentration (MIC) after that evaluated the antibacterial activity of oils essential that to present antibacterial activity *in vitro*, as of glove (*Eugenia caryophyllata*) and the oregano (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*) on *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* inoculated artificially in samples of *Anomalocardia brasiliiana* and stored during five days under refrigeration to evaluate the action of essential oils, in *Anomalocardia brasiliiana* during the storage under refrigeration. In this study it was observed that the essential oil of garlic presented antibacterial activity front the *S. aureus* and the *S. cholerasuis*; already the oils of glove and oregano had presented activity front to all the analyzed bacteria. The essential oil of lemon did not demonstrate antibacterial activity. The results had demonstrated to the biggest effectiveness of the essential oregano oil in relation to the one of glove on all bacteria analyzed. It was verified that the addition of the essential oil reduced the population of *Salmonella* spp in 5,6 logarithmic cycles in the samples of *Anomalocardia brasiliiana* inoculated artificially. The action of the essential oil of glove guaranteed the aureus inhibition of *Salmonella*, *E. coli* and *S. aureus*, per at least two days, under refrigeration.

KEY-WORDS: essential oil, clove, oregano, antibacterial, *Anomalocardia brasiliiana*

INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos tem passado por constantes pressões para que sejam removidos os conservantes químicos e adotadas alternativas naturais para a preservação do tempo de vida de prateleira dos produtos alimentícios.

Desta forma, a indústria de alimentos busca opções de substituição dos métodos tradicionais de controle de micro-organismos nos alimentos, tais como tratamentos intensos de calor, acidificação, congelamento, desidratação, adição de sal e agentes químicos. Nos últimos anos, as tecnologias mais estudadas são as de inativação de micro-organismos por métodos não-térmicos, como o uso de alta pressão hidrostática, utilização de pulsos eletromagnéticos, embalagens ativas ou com atmosfera modificada, utilização de compostos antimicrobianos naturais e bioconservação.

O uso de aditivos químicos é a medida comumente utilizada para a conservação de alimentos, porém a utilização indiscriminada e prolongada de antimicrobianos químicos sintéticos tem levado à seleção de micro-organismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos, além de reações adversas no organismo humano.

O uso de antimicrobianos de origem natural, comumente adicionados aos alimentos como condimentos, é uma alternativa eficaz e econômica. Estes condimentos são obtidos a partir de plantas aromáticas e especiarias que são ricas em óleos essenciais são caracterizados por uma notável atividade antimicrobiana, por esta razão, seus produtos derivados podem ser usados para retardar ou inibir o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes.

Apesar dos recentes avanços nas tecnologias de controle de patógenos em alimentos, ainda hoje se verifica a existência de surtos de doenças

transmissíveis por alimentos principalmente em produtos processados de forma artesanal, pois sua manipulação inadequada contribui para a existência de alimentos potencialmente perigosos, dentre eles os pescados e mariscos.

No Nordeste brasileiro o vôngole (*Anomalocardia brasiliiana*) é conhecido vulgarmente como: berbigão, papa-fumo, maçunin, chumbinho ou marisco pedra, é um molusco bivalve, que se adapta facilmente às mais diversas condições ambientais, podendo inclusive desenvolver-se em águas bastante poluídas. Devido ao seu hábito alimentar filtrante, estes animais podem adsorver e bioacumular em seus tecidos, diversos patógenos humanos, eventualmente presentes nas águas e nas áreas de cultivo, e uma vez ingeridos crus, mal cozidos ou manipulados sob péssimas condições de higiene, esses moluscos podem ser vetores de doenças gastrointestinais. O vôngole possui etapas de processamento, armazenamento e distribuição, que são geralmente realizadas sem nenhum controle higiênico-sanitário e geralmente a contaminação ocorre por falha na manipulação pós-processo, apresentando como uma forma de veiculação de doenças, principalmente oriundas do manipulador favorecendo a ocorrência de surtos por micro-organismos e/ou suas toxinas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

A investigação sobre novas tecnologias para garantir a inocuidade do vôngole e conseqüentemente o aumento da sua estabilidade durante o armazenamento, o uso de antimicrobianos naturais, pode apresenta-se como uma alternativa economicamente viável para se assegurar a qualidade microbiológica deste produto.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de óleos essenciais na conservação do vôngole (*Anomalocardia brasiliiana*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar ação antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais de alho, limão, orégano e cravo frente a cepas padrão de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

Avaliar ação antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais de alho, limão, orégano e cravo contra *S. aureus* e *E. coli* isoladas do vôngole (*Anomalocardia brasiliiana*).

Determinar a concentração inibitória mínima dos óleos essenciais com atividade antibacteriana.

Avaliar a ação dos óleos essenciais com atividade antibacteriana, frente à micro-organismos inoculados artificialmente no vôngole durante o armazenamento sob refrigeração.

CAPITULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Antimicrobianos em Alimentos

Antimicrobianos alimentares são compostos adicionados ou presentes em alimentos com a função de retardar ou inibir o desenvolvimento microbiano (TIPPAYATUM e CHONHENCHOB, 2007).

Nas últimas décadas o processo de conservação de alimentos tem se tornado um tanto complexo, pois na perspectiva dos consumidores requer-se alimentos mais naturais, livres de aditivos sintéticos, entretanto, apresentando a conveniência de possuir larga vida útil e principalmente que sejam inócuos ao consumidor (BEDIN, et. al., 1999). Seguindo esta tendência de mercado, a legislação de alimentos tem progressivamente restringido e/ou limitado o uso de alguns conservantes químicos utilizados atualmente em diferentes alimentos, de tal modo, esta restrição tem causado problemas a indústrias de alimentos, pois a susceptibilidade de alguns micro-organismos frente a certos antimicrobianos sintéticos clássicos tem diminuído (LEUSCHNER e ZAMPARINI, 2002)

O uso descontrolado de antimicrobianos sintéticos tem sido responsável pelo surgimento de cepas microbianas progressivamente mais resistentes a diferentes compostos antimicrobianos (SOUZA, 2006). Tem-se verificado o aumento da resistência microbianas de cepas isoladas de alimentos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Salmonella* frente a diferentes antibióticos de uso clínico como: ampicilina, bacitracina, cloranfenicol e cefalotina (BANERJEE e SAKKAR, 2004). Segundo Burt (2004),

vários autores relatam o aumento da resistência microbiana a antimicrobianos convencionais na indústria de alimentos, tais como ácidos orgânicos fracos, peróxido de hidrogênio e agentes quelantes. Sendo assim, a resistência microbiana torna-se um importante impulsionador para a busca de novos constituintes antimicrobianos para a aplicação em alimentos. Baseado nos resultados observados *in vitro* vários autores tem se aprofundado nesta possibilidade da aplicação em alimentos (FEY et. al., 2000; LAMBERT et al., 2001; MENDONÇA, 2004; KRUGER, 2006).

Óleos essenciais extraídos de plantas são potencialmente ativos frente muitos patógenos, pois são fontes de compostos antimicrobianos e inúmeros são os estudos que comprovam a sua atividade contra muitos patógenos de origem alimentar. Diversos autores têm estudado a atividade antimicrobiana dos condimentos e/ou especiarias, assim como de seus óleos essenciais, que progressivamente têm sido adicionados aos alimentos como aromatizantes (CHAO e YOUNG, 2000; MENDONÇA, 2004; SOUZA et al., 2005). Entretanto os componentes das matrizes alimentares podem, possivelmente, interagir com os princípios ativos destes potenciais compostos antimicrobianos resultando em moderada a não significativa a eficácia do antimicrobiano (MENON e GARG, 2001).

2. Óleos essenciais com atividade antimicrobiana

Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanoides e constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-

organismos (SIQUI et al., 2000, GONÇALVES et al., 2003). Diferentes partes das plantas são utilizadas para obtenção do óleo essencial como flores, folhas, sementes, raízes, cascas e tubérculos (ARIDOGAN et al., 2002).

As especiarias e seus produtos derivados (extratos, óleos essenciais, constituintes químicos) tem sempre mostrado resultados satisfatórios na inibição de micro-organismos patogênicos oportunistas, patogênicos primários, deteriorantes e/ou na inibição da produção de toxinas microbianas (KIZIL e SOGUT, 2003).

O uso de óleos essenciais em alimentos com objetivo de melhorar as características sensoriais é muito comum, porém sua atividade antiviral, antiparasítica, antitoxigênica, antimicótica, inseticida, pesticida e antibacteriana, quando aplicados em alimentos, é pouco conhecida (BURT, 2004).

Os óleos essenciais como agentes antimicrobianos apresentam como principais características a sua origem natural e são considerados como possuidores de baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana frente a sua ação. A segunda característica citada toma como base o fato de que os óleos essenciais são compostos por misturas de componentes, que, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana, e desta forma torna mais difícil à adaptabilidade dos micro-organismos (DAFERERA et al., 2000).

O método Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) que tem como objetivo testar a susceptibilidade de utilização de antibióticos tem sido modificada para o uso com óleos essenciais (HAMMER et. al., 1999), porém com existem diversas adaptações que variam desde o meio de cultura até a quantidade do inóculo utilizada (BURT, 2004).

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM), porém o método utilizado para a

determinação da CIM varia entre os diversos estudos, sendo um obstáculo para comparação entre os mesmos. O método de diluição em ágar é o mais utilizado, devido à simplicidade de execução e ao baixo custo, já o método da micro diluição vem sendo bastante utilizado, principalmente devido à sua sensibilidade e quantidade mínima de reagentes, o que possibilita um maior número de réplicas aumentando a confiabilidade dos resultados, porém é importante avaliar os fatores interferentes, estabelecendo parâmetros de acordo com a necessidade do método empregado para a determinação do CIM (OSTROSKY et al., 2008).

2.1 Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.)

O orégano pertence à família Lamiaceae e tem sido alvo de muitas avaliações quanto às propriedades biológicas de seu óleo essencial. Em alguns óleos de orégano, o timol é o principal componente que proporciona o aroma e sabor, em outros o carvacrol é predominante. Além disso, muito têm sido explorado a respeito da composição de seu óleo essencial, devido à potencial capacidade antimicrobiana de seus componentes químicos (REHDER et. al., 2004; BUSATTA, 2006). Porém, as aplicações tecnológicas deste óleo requerem a estabilização de condições ideais, como a susceptibilidade de certas linhagens de micro-organismos e a concentração ótima de inibição dos patógenos (MOREIRA et al., 2005).

O estudo da atividade antibacteriana do orégano e de seus diferentes extratos e óleo essencial têm sido realizado contra bactérias, fungos patogênicos e deteriorantes. Sahin et al. (2003) conduziram estudo para avaliar a efetividade antibacteriana do extrato metanólico e do óleo essencial de orégano sobre uma série de bactérias de interesse em alimentos, e observaram que o óleo essencial foi efetivo na inibição de *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus macerans*,

Bacillus subtilis, *B. megenterium*, *Clavibacter michiganense*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Os halos de inibição observados oscilaram entre 10 e 33 mm de diâmetro, enquanto que a CIM variou entre 15.62µg/mL sobre *A. baumani* e 125µg/mL sobre *B. megenterium*. Evidenciaram que o óleo essencial de orégano possui compostos com potencial antibacteriano.

Sagdiç (2003) avaliou a ação inibitória do hidrossol de orégano sobre bactérias patogênicas e observou sua efetividade na inibição de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Yersinia enterocolitica* nas concentrações de 10 e 25mL/100mL foi bacteriostático, enquanto que nas concentrações de 50 e 75mL/100mL teve ação bactericida. Já Valero e Salmeron (2003) notaram que o óleo essencial de orégano (25µg/mL) foi efetivo na extensão da fase lag da curva de crescimento de cepas de *Bacillus cereus*, tornando tal fase 110% mais longa (tempo de duração) quando comparada ao ensaio controle.

Marino et al. (2001) analisando o efeito antimicrobiano de várias especiarias notaram que o óleo essencial de orégano foi o mais efetivo na inibição de bactérias Gram-positivas em relação as Gram-negativas, causando um alongamento da fase lag além de apresentar-se como eficiente substância bactericida, detectado pela não recuperação de tais micro-organismos após reincubação em meio de recuperação. Dentre as cepas Gram-negativas a *E. coli* O157:H7 foi a mais sensível, enquanto a *L. monocytogenes* e representantes da família Bacilaceae foram as mais sensíveis entre as cepas Gram-positivas ensaiadas.

Skandamis et al. (2002) observaram que a adição de óleo essencial de orégano na concentração de 0.8% (v/p) em filés de carne bovina conjuntamente com o uso de embalagens com diferentes concentrações de CO₂, O₂, N₂ e vácuo à uma temperatura de 5°C provocou uma redução inicial da população de *Salmonella tiphymurium* de 1 a 2 ciclos logarítmicos, partindo-se o ensaio de um inóculo inicial de aproximadamente 10⁵ UFC/g, além da redução da

flora microbiana indígena dos produtos cárneos. Demonstraram que o uso em conjunto de atmosferas modificadas em baixas temperaturas e óleo essencial de orégano poderia ser aplicado na conservação de produtos cárneos.

Nostro et al. (2004) evidenciaram sensibilidade de cepas de *S. aureus* e *S.epidemicus* metilina resistentes ao óleo essencial de orégano com Concentração Mínima Inibitória (CIM) oscilando entre 0.06 e 0.125% (v/v), sendo todas as cepas ensaiadas sensíveis a tal produto. Chun et al. (2005) observaram a sensibilidade de cepas de *Helicobacter pylori* frente ao extrato aquoso e etanólico de orégano, com a formação de halos de inibição de crescimento microbiano de até 23 mm de diâmetro.

2.2 Óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum* L.)

O cravo-da-índia é uma planta arbórea, endêmica das Ilhas Molucas e possui odor fortemente aromático, sabor ardente e característico. O cravo-da-índia contém 14 a 20% de um óleo volátil, 10 a 13% de ácido galotânico, ácido oleanólico, vanilina, cromona eugenina, triterpeno, benzaldéido, ceras vegetais, cetonas, clavicól, resinas, taninos, ácido gálico, esteróis, esteróis glicosídicos, kaempferol e quercetina. O óleo contém eugenol livre (70 a 95%), acetato de eugenol e 5 a 8% de β -cariofileno (ROBBERS et al., 1997). Juntos esses componentes constituem cerca de 99% do óleo, mas não são responsáveis pela sua nota fresca e frutuária. O eugenol ou 4-alil-2-metoxifenol é um fenol e encontra-se largamente distribuído no reino vegetal, principalmente como constituinte dos óleos essenciais de plantas (BOAVENTURA et al., 2006).

O eugenol, principal constituinte químico presente na especiaria apresenta efeitos antiinflamatório, cicatrizante e analgésico. É comumente utilizado como antimicrobiano e antifúngico, com amplo espectro de ação contra *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Streptococcus*

mutans, *Mycoderma* sp. *Lactobacillus acidophilus* e *Bacillus cereus*, entre outras espécies de bactérias, fungos e leveduras (GUIMARÃES et al., 2008).

O mecanismo de ação do eugenol ocorre em nível de membrana plasmática, juntamente com a inativação de enzimas e/ou no material genético celular. É possível que parte do efeito antimicrobiano do eugenol esteja relacionado com a sua natureza fenólica (BOAVENTURA et al., 2006).

Hoffmman et al. (1999) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias (canela, cravo, gengibre e menta) de mesma marca comercial, em três diferentes concentrações (10,0; 1,0 e 0,1%), sobre cepas de *S. aureus*, *Salmonella enteritidis* e constataram que o óleo essencial de cravo, na concentração de 10,0% inibiu completamente o crescimento de todos os microrganismos testados.

Trajano et al. (2009) investigaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais de cravo (*E. caryophyllata*) sobre cepas de *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4362), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7664), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella enterica* (ATCC 6017), *Serratia marcescens* (ATCC 13880) e *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610) e constataram que este óleo essencial inibiu todas as bactérias testadas com formação de halos de inibição de até 30 mm de diâmetro.

2.3 Óleo essencial de alho (*Allium sativum* L.)

O alho possui vários constituintes químicos voláteis e instáveis, quase todos derivados orgânicos do enxofre. Os efeitos biológicos do alho estão relacionados à presença dos compostos sulfurados voláteis, entre estes a alicina (LANZOTTI, 2006). A maioria dos componentes sulfurados não está presente nas células intactas. Quando o alho é amassado, partido, cortado ou mastigado ocorre

uma interação entre os vários compostos, desencadeando reações químicas seqüenciais. Quando as células do bulbo são rompidas, permite que a aliína entre em contato com a enzima alinase e em poucos minutos, ocorre à formação do composto volátil alicina (SCHULZ et al., 2004)

A alicina, formada a partir da aliína, pela ação da enzima aliinase possui propriedades fungicidas, antivirótica e antibacteriana frente a vários microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos. A alicina é a responsável pelo odor característico do alho, esta substância inibe o desenvolvimento de bactérias (LANZOTTI, 2006).

Segundo Packer (2007) amostras de óleo de andiroba, copaíba e alho não apresentaram atividade bacteriostática e fungistática frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, o mesmo sugere que uma possível degradação de compostos com tal atividade, porém não foram objetivos do trabalho as análises físico-químicas das amostras, talvez estas seriam a chave para esta incoerência nos resultados obtidos com os óleos de copaíba e alho.

Ross et al. (2001) evidenciaram que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alho, utilizando métodos de difusão em placa, foi insignificante, podendo ser devido à natureza hidrofóbica e volátil deste óleo. Em contrapartida, resultados mostram que exibe considerável atividade antimicrobiana, quando testado em culturas líquidas, especialmente quando as precauções para minimizar as perdas de volatilização são aplicadas.

2.4 Óleo essencial de limão (*Citrus limon*)

O óleo essencial de limão apresenta na sua composição compostos como limoneno, p-cimeno, terpenenol e citral (KUNICKA-STYCZYN et al., 2009). Estes componentes são aprovados para uso em alimentos e contribuem para conferir alterações sensoriais desejáveis aos produtos alimentícios. Caccioni et al. (1998), após avaliarem a atividade antifúngica que dentre os componentes de óleos cítricos, foi constatado que o limoneno apresentou maior poder inibitório dentre os outros componentes dos óleos cítricos como p-cimeno, terpenenol e citral.

Os estudos relatando o uso do óleo essencial como antimicrobiano em alimentos não tem sido muito explorado.

Kunicka-Styczyn et al. (2009) estudaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de lavanda e limão para uso como cosméticos e constataram a eficácia do óleo essencial de limão em cepas de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida sp.* e *Aspergillus niger*.

Kotzekidou et al. (2008) estudaram a eficácia do óleo de limão comerciais em cepas de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* em amostras de chocolate e constataram que estas cepas foram inibidas pela presença do óleo de limão, sugerindo o uso deste óleo como uma barreira para aumentar a vida de prateleira ao produto.

3 Micro-organismos patogênicos

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos, podendo levar a doenças por ação de micro-organismos patogênicos ou de suas toxinas (STAMFORD et al., 2006), que podem levar ao

desenvolvimento de doenças, afetando a saúde humana. Doenças veiculadas por alimentos são um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, sendo responsáveis por reduções no crescimento econômico global. A contaminação de alimentos com patógenos e seu crescimento, multiplicação e/ou produção de toxinas é de interesse da saúde pública (CARMO, 2008). Para garantir que os alimentos são microbiologicamente seguros, tanto os manipuladores e os alimentos precisam ser continuamente monitorados. As análises microbiológicas refletem as condições higiênicas que envolvem a produção, armazenamento, transporte e manuseio além de elucidar a ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos (EFSA, 2006).

De acordo com dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2009) no período de 1999 a 2008 ocorreram no Brasil 6.062 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), com 117.330 pessoas acometidas e 64 óbitos. Os micro-organismos *Staphylococcus* spp. e *Bacillus cereus* são, respectivamente, o segundo e o terceiro mais implicados como agentes causadores destes surtos, sendo a *Salmonella* spp. o micro-organismo responsável pela maior quantidade de surtos.

3.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica, Gram positiva, aeróbia, mesófila, com uma temperatura mínima para a sua proliferação a 10°C, mas são necessárias temperaturas mais altas para produzir a toxina (>15°C). O *S. aureus* é halotolerante e capaz de se desenvolver em meios com atividade de água tão baixa como 0,86. Os estafilococos são capazes de crescer em meio com até 20% de cloreto de sódio (VIEIRA, 2004; FRANCO e LANDGRAF, 2008), sendo considerados resistentes aos estresses ambientais, fator que potencializa sua

patogenicidade e possibilita sua sobrevivência em alimentos de origem marinha. A presença deste micro-organismo em grande número costuma indicar práticas ineficientes de produção e higiene (BEIRÃO et al., 2000). O pH mínimo para a sua proliferação é 4,5. Estas exigências de desenvolvimento acima referidas estão relacionadas com a proliferação em meio laboratorial quando outros fatores são ótimos. Isto nem sempre é o caso nos alimentos onde outros fatores limitantes podem atuar conjuntamente. Vale salientar, que as cepas de *Staphylococcus aureus* são péssimas competidoras e não crescem bem na presença de outros micro-organismos e pode estar presente no conduto nasal, nos olhos, na garganta, no trato gastrointestinal e na superfície da pele de homens, onde é mais freqüente nas mãos, braços, rosto e feridas. A partir dessas localizações, o micro-organismo pode contaminar o alimento direta ou indiretamente (BARROS, 2009; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Nos surtos de intoxicação alimentar por estafilococos foram implicados um grande número de alimentos. Os alimentos de origem marinha cozidos incluem-se entre os alimentos mais frequentemente contaminados por operários, já que se estima que o homem seja a mais importante fonte do *S. aureus* que chegam aos alimentos (BARROS, 2009). Na intoxicação estafilocócica, as bactérias se multiplicam nos alimentos e produzem uma toxina termoestável que é o produto da multiplicação da bactéria nos alimentos deixados em temperaturas inadequadas (FRANCO e LANDGRAF, 2008; MAGNANI, 2001).

A enterotoxina estafilocócica é termoestável e pode permanecer no alimento mesmo após o cozimento, possibilitando desta forma, a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar (CARMO et al., 2008; BALABAN e RASOOLY, 2000; CUNHA NETO, 2002).

Algumas linhagens de *Staphylococcus* produzem a toxina da síndrome do choque tóxico (SANTOS, 2003) cujos sintomas são agudos, potencialmente

fatais e caracterizados por febre alta, descamação da pele e hipotensão (LAMAITA, 2003). Esta síndrome, diferentemente da gastroenterite causada pelas enterotoxinas, ainda não foi associada ao consumo de alimentos (RAPINI et al., 2005). No entanto, sua presença no alimento pode indicar uma possível fonte de veiculação dessa enfermidade para o homem (SENA, 2000), além de se constituir em fator de virulência da linhagem. Com capacidade de produção de enterotoxinas Rapini et al. (2005) constataram a presença de cepas de *Staphylococcus* spp em manipuladores de alimentos e ressaltam a necessidade imprescindível da adoção de condutas higiênicas e sanitárias durante a manipulação do alimento.

A real frequência da intoxicação estafilocócica é desconhecida, seja por erro diagnóstico, por ser similar a outras intoxicações (*Bacillus cereus*); por coleta inadequada de amostras para testes laboratoriais, exames laboratoriais impróprios ou investigações epidemiológicas inadequadas dos surtos. No estado de São Paulo foram notificados 25 surtos por *S. aureus*, envolvendo quase 200 pessoas, nos anos de 2001 e 2002 (CVE, 2010).

3.2 *Escherichia coli*

A *E. coli* é o micro-organismo aeróbio mais freqüente no trato digestório do homem e dos animais de sangue quente. Uma vez que este micro-organismo é um componente normal da microbiota fecal, sua detecção pode indicar a possível ocorrência de outros micro-organismos que poderiam ser ainda mais patogênicos para o homem, animais domésticos e selvagens (BARROS, 2009).

De acordo com a etiologia, a *E. coli* é uma enterobactéria Gram negativa, que possui motilidade, produz indol, não produz H₂S e uréase e

fermenta a lactose. As bactérias deste grupo têm a capacidade de continuar fermentando a lactose com produção de gás a 44 a 45,5 °C. Nestas condições, 90% das culturas de *E. coli* são positivas, enquanto apenas algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantêm esta característica (RASZL et al., 2001).

Dentre as cepas de *E.coli*, entretanto, há um grupo capaz de provocar doenças em indivíduos humanos, dentre elas a *E. coli* enteropatogênica (EPEC); a *E. coli* enteroinvasora (EIEC), a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e a *E. coli* enterohemorrágica (CVE, 2010).

3.3 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, apresenta-se como bastonetes curtos, Gram negativo, fermentadores, não esporulados, na maioria móvel por flagelos peritríquios (exceto *S. gallinarum* e *S. pullorum*), de metabolismo aeróbio ou facultativamente anaeróbio. A temperatura ideal situa-se na faixa de 35 a 37 °C, sendo a mínima de 5 °C e a máxima de 47 °C. O pH ótimo para seu desenvolvimento fica próximo de 7,0 e valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas e, com relação à concentração de sal, não toleram concentrações superiores a 9% (JAY, 2002).

Salmonella ssp. tem sido reconhecida como um importante patógeno zoonótico de importância econômica em animais e humanos. A salmonelose humana é geralmente caracterizada pelo início agudo de febre, dor abdominal, náuseas e às vezes, vômitos. Os sintomas são leves e muitas vezes a maioria das infecções são autolimitadas, durando poucos dias. No entanto, em alguns pacientes, a infecção pode ser mais grave e associada a desidratação pode ser risco de vida. Nesses casos, assim como quando *Salmonella* provoca infecção da corrente sanguínea, antimicrobianos eficazes são essenciais para o tratamento.

Salmonelose também tem sido associada a seqüelas como artrite crônica reativa (TURGIS et al., 2009; BARROS, 2009; EFSA, 2006).

Este micro-organismo é a principal causa de infecções transmitidas por via alimentar humana na América Latina e a carne de aves é um dos principais veículos. O reservatório comum da *Salmonella* é o trato intestinal de uma ampla variedade de animais domésticos e silvestres e a transmissão geralmente ocorre quando os alimentos são mantidos às temperaturas inadequadas de armazenamento, cozimento inadequado ou contaminação pós-processo. Uma característica agravante é o processo de abate nos matadouros na América Latina que geralmente é manual e rudimentar, e muitas vezes as condições de higiene são pobres (BARROS, 2009).

Algumas espécies do gênero *Salmonella* são patogênicas ao homem como é o caso de *S. typhi*, responsável pela febre tifóide, *S. paratyphi* (A, B e C), causadora de febre entérica e as demais salmonelas (*S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. bongori*, *S. choleraesuis*, *S. nyanza*, *S. paratyphi*, *S. virginia*), que causam as enterocolites ou salmoneloses. Inúmeros casos de infecção alimentar provocados por *Salmonella* spp. têm sido descritos, envolvendo os mais variados tipos de alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 2008), sendo esse micro-organismo um dos mais freqüentemente envolvidos em casos e surtos de enfermidades veiculadas por alimentos, inclusive no Brasil.

Guimarães et al. (2001) relatam a ocorrência de um surto de infecção alimentar ocorrido em outubro de 1997 em um restaurante hospitalar da cidade de Salvador-Ba, Brasil. Na oportunidade foram investigados carne de sol, bolinho de peixe, arroz, feijão, aipim, melancia e suco de maracujá e constataram após as análises a presença de *Salmonella* spp. nas amostras de feijão e de aipim sauté. Neste mesmo estudo os manipuladores foram submetidos à coprocultura e verificou-se que todos (100%) eram portadores de *Salmonella*, 50% com *S. typhi*, 40% com *S. enteritidis*, e 10% com *Salmonella* spp, evidenciando desta forma, a

ocorrência de contaminação pós-processamento, devido a possíveis práticas de higiene inadequadas.

Santos e Kupek (2000) descreveram o perfil epidemiológico dos surtos de infecção alimentar causada por *S. enteritidis* no sul do Brasil. A maionese era o alimento mais freqüentemente associado aos surtos, sendo o veículo responsável em quase dois terços dos casos investigados. Eles descobriram que as manifestações mais freqüentes ocorreram em casa (60%), mas o maior número das infecções resultantes das cozinhas industriais (78%). Peresi et al., (1998) relataram a surtos de salmonelose em São Paulo, Brasil. Eles descobriram que haviam 906 pessoas doentes, incluindo 295 pacientes internados e que 4 tipos de cepas de *S. enteritidis* foram isoladas de 80% das amostras de fezes, de 100% das amostras de alimentos e de 41% dos ovos. Dos surtos, 95% estavam associados ao consumo de alimentos contendo ovos crus ou mal cozidos.

Além das implicações em saúde pública, onde a *Salmonella* spp. é um dos principais patógenos implicados em doenças veiculadas por alimentos (DVA), particularmente a partir de produtos de origem animal, sua presença assume significativa importância mundial, em face da ocorrência de cepas multirresistentes a antimicrobianos, estando muitas vezes associada a surtos de DVA em vários países, incluindo o Brasil (FLUIT et al., 2006). O cenário atual observado é altamente preocupante tendo em vista a transferência concomitante de plasmídeos de virulência e de resistência antimicrobiana. Observações recentes apontam que os quadros clínicos de maior gravidade são determinados por microorganismos que apresentam fenótipo de resistência antimicrobiana (FAO, 2007).

Os principais sintomas da salmonelose (infecções não tifóides) são diarreias não sanguinolentas, dores abdominais, febre, náuseas e vômitos que ocorrem, geralmente, 12 a 36 horas após a ingestão do alimento contaminado. Contudo, os sintomas podem variar consideravelmente desde uma doença grave

do tipo tifóide com complicações mais sérias até uma infecção assintomática (BARROS, 2009).

4 Micro-organismos patogênicos em mariscos

Os moluscos adaptam-se facilmente às mais diversas condições ambientais, podendo inclusive desenvolver-se em águas bastante poluídas. Devido ao seu hábito alimentar filtrante, estes animais podem adsorver e bioacumular em seus tecidos, diversos patógenos humanos, eventualmente presentes nas águas de cultivo, tais como vírus entéricos, bactérias, protozoários e helmintos (RIGOTTO, 2003). Na costa brasileira não ocorre controle da extração do vôngole, que é coletado de maneira rudimentar (ARAÚJO, 2001; NANDI, 2005). A qualidade do ambiente onde são cultivados ou extraídos determina os requisitos de qualidade dos moluscos bivalves e a garantia de um produto saudável e seguro para o consumidor (ORBAN et al., 2006).

Segundo Bispo et al. (2004), a exploração do vôngole não conta com procedimentos tecnológicos eficientes e capazes de conferir segurança ao produto, submetido a um rápido processo de cocção, retirado de sua concha e acondicionado em saco plástico, para depois ser transportado sob congelamento e comercializado em feiras-livres e supermercados.

A legislação brasileira, através da Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 que trata do Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos estabelece para a carne de moluscos bivalves cozidos, temperados ou não, industrializados resfriados ou congelados os seguintes padrões: estafilococos coagulase positiva até 10^3 UFC/g, coliformes a 45°C/g até 5×10 NMP/g e ausência de *Salmonella* spp. em 25g de amostra (BRASIL, 2001).

A contaminação dos mariscos por *Salmonella*, devido à sua proliferação em águas poluídas, tem sido um problema em muitas partes do mundo. Em um trabalho de revisão, foram apresentados resultados obtidos em camarões tropicais de cultivo que, freqüentemente, encontram-se contaminados com *Salmonella*.

Uma vez ingeridos crus, mal cozidos ou manipulados sob péssimas condições de higiene, esses moluscos podem ser vetores de doenças transmissíveis pela água tais como febre tifóide, salmonelose, cólera e hepatite viral do tipo A (TIRELLI, 2004).

Pereira et al. (2006) avaliaram a qualidade microbiológica de 90 amostras de ostras da espécie *Crassostrea gigas* cultivadas e comercializadas na região litorânea de Florianópolis-SC, Brasil, através da contagem de coliformes a 35°C e 45°C, *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva e da pesquisa de *Salmonella* sp, *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*. Não foram encontrados *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella* spp. Apenas uma amostra estava contaminada com estafilococos coagulase positiva e contagens de coliformes a 35°C e a 45°C acima do limite preconizado pela legislação, evidenciando-se contaminação tanto no local de cultivo quanto no local de venda.

5 Caracterização do vôngole (*Anomalocardia brasiliiana*)

O vôngole, *Anomalocardia brasiliiana*, pertence ao filo *Mollusca*; classe *Bivalvia*; sub-classe *Lamellibranchia*; família *Veneridae*; gênero *Anomalocardia*; espécie *Anomalocardia brasiliiana*. Tem brilho vítreo e coloração amarelada, apresentando freqüentemente manchas ou faixas sinuosas cinza-escuras, de interior porcelanoso, muitas vezes com manchas acinzentadas na região posterior (BOFFI, 1979).

Estes animais são encontrados desde as Índias Ocidentais até o Uruguai, ocorrendo ao longo de toda costa brasileira. Vive próximo das zonas entre-marés em praias abrigadas, com água calma, sem arrebentação. Animais de diversos tamanhos vivem juntos em fundos arenosos, enterrados a pequenas profundidades (BOFFI, 1979; AVIEIRO, 2007).

Por ser um bivalve euritérmico (suporta à ampla variação de temperatura ambiente), com grande resistência à deficiência de oxigênio, e crescimento rápido, a espécie forma bancos naturais com biomassas significativas em habitats com elevada variabilidade temporal em parâmetros ambientais como salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido na água. A espécie sobrevive até 240 horas em condições de anorexia com temperatura limite de 42°C, características essas que facilitam a exploração humana, transporte e comercialização da espécie (ARRUDA et al., 1982).

O vôngole apresenta hábito alimentar suspensívoro, onde o alimento provém de um fluxo de água que passa através da cavidade do manto, pelas brânquias ciliadas. Estas são alargadas, pregueadas e funcionam como um filtro, concentrando partículas orgânicas, algas microscópicas e organismos planctônicos que servem como alimento para o animal (WARD et al., 1996).

Estes moluscos são encontrados nos ambientes de manguezal do Brasil e servem de fonte de renda para diversas famílias das populações litorâneas que vivem do extrativismo do mangue. Em geral as mulheres e crianças é que se envolvem em sua coleta e vendem em feiras livres e a falta de condições higiênico-sanitária na forma como o vôngole é coletado, distribuído e vendido tenham como consequência a perda de qualidade causada por micro-organismos, apresentando risco aos consumidores devido à presença de toxinas microbianas e/ou seus agentes patogênicos (DANTAS, 2009).

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, C. M. Y. **Biologia reprodutiva do berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé.** 2001. 204p. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

ARIDOGAN, B. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. **Archives of Pharmacal Research**, v. 25, n. 6, p. 860-864, Dec. 2002.

ARRUDA, S.H.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; MANDELLI JÚNIOR, J. Berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791), bivalvia comestível da região da Ilha do Cardoso, Estado de São Paulo, Brasil: Aspectos Biológicos de Interesse para a Pesca Comercial. **B. Inst. Pesca**, v. 9, p. 21-38, 1982.

AVIERO, M.V. **Análise nutricional, microbiológica e histológica do berbigão *Anomalocardia brasiliana* da reserva extrativista marinha do pirajubaé (remapi), Florianópolis/SC.** 2007. 77p. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 1-10, Oct. 2000.

BANERJEE, M.; SARKAR, P. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic micro-organisms from spices. **Food Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 335-342, jun. 2004.

BARROS, B.C.V. **Avaliação da qualidade sanitária do pescado Salgado seco comercializado nas feiras livres de Belém-PA.** 2009. 45p. Trabalho de Conclusão de Programa de Especialização em Veterinária de Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal – HIPOA. 2009. Universidade Castelo Branco. Belém.

BEDIN, C.; GUTKOSKI, S. B.; WIEST, J. M.. Atividade antimicrobiana de especiarias. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 65, p. 26-29, 1999.

BEIRÃO, H. et al. Processamento e industrialização de moluscos. In: Seminário e Workshop Tecnologias para Aproveitamento Integral Do Pescado,1., 2000. Campinas. **Anais...** Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes, ITAL, 2000. p. 38-84.

BISPO, E. S.; SANTANA, L. R. R.; ANDRADE, G. Q.; LEITE, C. C. Aproveitamento Industrial de Mariscos na Produção de Linguiça. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, SP, v. 4, n. 24, p. 664-668, 2004.

BOAVENTURA A. O. et al. **Avaliação das atividades antifúngicas e antibacterianas do cravo-daíndia (*Syzygium aromaticum L.*)**, Anais do CNPq, 20 de Junho 2006, Belo Horizonte-MG;

BOFFI, A. V. **Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico**. São Paulo: FAPESP HUCITEC, 1979, p. 58-62.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999–2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/aulas/i_rcvisa/doencas_brasil_greice.ppt> Acesso em: 17 mai. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 7-E, 10 jan. 2001.

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

BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana *in vitro* e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. Erechim – RS. 2006. 94p. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI).

CACCIONI, D.R.L.; GIZZARDI, M; BIONDI, D.M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. - Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal Food Microbiology**, **43**: 73-9, 1998.

CARMO, E. S.; LIMA, E.O.; SOUZA. E.L.. The potential of *Origanum Vulgare L.* (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 39, p. 362-367. 2008.

CHAO, S.C.; YOUNG, D.G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oils Research**. s.l. n.12, p. 630-649, 2000.

CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 809-816, 2005.

CONNER, D.; BEUCHAT, L. Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants.. **Appl Environ Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 229-33, Feb. 1984.

CUNHA NETO, Adelino da; SILVA, Celiane Gomes Maia da; STAMFORD, Tânia Lúcia Montenegro. Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**. 2002, vol.22, n.3, pp. 263-271.

DAFERERA, D. et al. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **J. Agric Food Chem**, v. 48, n. 6, p. 2576-81, Jun. 2000.

DANTAS, R.A. **Avaliação microbiológica e físico-química de vôngole (*Anomalocardia brasiliensis*) e siri (família Portunidae) embalados em diferentes atmosferas e armazenados sob refrigeração e congelamento**. 2009. 208p Dissertação de Mestrado do Programa de Ciência de Alimentos, Universidade Federal da Bahia. Salvador. 2009.

European Food Safety Authority (EFSA) – Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. **EFSA J.**, n. 310 , 10; 23-95. 2006

FAO. Food Agriculture Organization. Food Safety Risk Profile for *Salmonella* species in broiler (young) chickens. CCFH Working Group on Guidelines for control of *Campylobacter* and *Salmonella* spp. 06/2007.

FEY, P. et al. Ceftriaxone-resistant salmonella infection acquired by a child from cattle. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 17, p. 1242-1249, Apr 2000.

FLUIT, A.C.; VAN DER BRUGGEN, J.T.; AARESTRUP, F.M. Priorities for antibiotic resistance surveillance in Europe. **Clin Microbiol & Infect**. n. 12: p.410-417. 2006.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

GONÇALVES, L. A. et al. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucavu, v. 6, n. 1, p. 8-14. 2003

GUIMARÃES, A. G.; LEITE, C. C.; TEIXEIRA, L. D. S.; SANTANA, M. E. B.; ASSIS, P. N. Detecção de *Salmonella* spp. em alimentos e manipuladores envolvidos em um surto de infecção alimentar. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 2, n. 1, p. 1-4, jan./mar. 2001

GUIMARÃES, S. S. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja (*glycine max*) em resposta a derivados de capítulos florais de cravo-da-índia (*syzygium aromaticum* L.). **Ciência Rural**. Paraná, v.38, n.7, out. 2008.

HAMMER, K. et al. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **J. Appl Microbiology**. v. 86, n. 6, p. 985-90, Jun. 1999.

HOFFMANN, F.L.; SOUZA, S.J.F.; GARCIA-CRUZ, C.H.; VINTURIM, T.M.; DUTRA, A.L. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. **Boletim do CEPPA**, v.17, p.11-20, 1999.

JAY, J.M. *Modern food microbiology*. 4. ed. Zaragoza: Acribia 2002. 615 p.

KIZIL, S.; SOGUT, T. Investigation of antibacterial effects of spices. **Crop Research**. v. 3, n. 86-90, 2003.

KOTZEKIDOU,P.; GIANNAKIDIS,P.; BOULAMATIS, A.; Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against food borne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, Food Science and Technology**. n 41(1):119-127. 2008.

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. 2006. 70f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006

KUNICKA-STYCZYN,A.; SIKORA,M.; KALEMBA. D. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. **Journal of Applied Microbiology**. n. 107, p. 1903–1911. 2009.

LAMAITA, H.C. **Freqüência de espécies de *Staphylococcus*, de TSST-1 e de enterotoxinas estafilocócicas em leite cru refrigerado em propriedades de**

Minas Gerais. 2003. 74f. Dissertação do Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J.; NYCHAS, G. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of oregano essential oil, thymol and carvacol. **Journal of Applied Microbiology**.v.91, n.453-462. 2001.

LANZOTTI, V. The analysis of onion and garlic. **Journal Chromatography A.**, v. 1112, n. 1-2, p. 3- 22, 2006.
2.1.

LEUSCHNER, R.; ZAMPARINI, J. Effects of spices on growth and survival of Escherichia coli O157 and Salmonella enterica serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. **Food Control**, v. 13, n. 6-7, p. 399-404, Sep-Oct. 2002.

MAGNANI, A.L. **Efeito do cravo (*Syzygium aromaticum*) sobre *Salmonella e Staphylococcus aureus* em salame tipo italiano.** 2001. 42p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2001.

MENDONÇA, A.T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *S. aureus* em ricota cremosa.** 72f. 2004. Tese (Pós-graduação em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras. Lavras. Minas Gerais. 2004.

MENON, K.; GARG, S. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. **Food Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 647-650, Dec. 2001.

NANDI, R. R. **Ecologia Populacional do Berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Veneridae) na Praia da Base-Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé, Florianópolis, SC.** 2005. 67p. Trabalho de Conclusão. Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **Fems Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, Jan. 2004.

ORBAN, E.; DI LENA, G.; NEVIGATO, T.; CASINI, I.; CAPRONI, R.; SANTARONI, G.; GIULINI, G. Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, *Chamelea gallina*, from the Adriatic sea. **Food Chemistry**, v. 101: 1063-1070, 2006.

OSTROSKY, E. et al. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal Of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301-307, Apr./Jun. 2008.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S.. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17: p.102-107.2007.

PEREIRA, M. A.; NUNES, M. M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C.R. Microbiological quality of oyster (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 37: 159-163, 2006.

PERESI, J. et al. Food borne disease outbreaks caused by *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saude Publica**, v. 32, n. 5, p. 477-483, Out. 1998.

RAPINI, L.S., et al. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. [online]**. vol.57, n.6, pp. 825-829. 2005

RASZL, S. M. et al. **HACCP: Instrumento Essencial Para a Inocuidade dos Alimentos**. Buenos Aires, Argentina: OPAS/INPRAZ, 2001.

REHDER, V.L.G.; MACHADO, A.L.M.; DELARMEINA, C.; SARTORATTO, A.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p.67-71, 2004.

RIGOTTO, C. **Proposta da utilização de adenovírus como indicadores de contaminação viral humana em ostras de cultivo**. 2003. 116p. Dissertação de Mestrado (biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina.

ROBBERS J.E. et al. Farmacognosia e Farmacobiotechnologia. **Editorial Premier**, São Paulo -SP, 1997.

ROSS, Z. et al. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. **Appl Environ Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 475-80, jan. 2001.

SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. **Lebensm.-Wiss. u.-Technolol.** v.36, p. 467-473, 2003.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M.; et al. **Food Control**. 56: 2-9, 2003

SANTOS, D.A. **O papel do manipulador de alimentos em surtos de intoxicação alimentar causados por espécies de Staphylococcus ocorridos em quatro cidades do Estado de Minas Gerais, Brasil**. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SANTOS, S.M.; KUPEK, E. Serial outbreaks of food-borne disease in Blumenau, Brazil, caused by Salmonella Enteritidis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, n. 4, p. 275-278, 2000.

SENA, M.J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema de lactoperoxidase de Staphylococcus spp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife**. 2000. 75f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SIQUI, A.C. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v. 16, p. 38-43.

SKANDAMIS, P.; TSIGARIDA, E.; NYCHAS, G.J.E. The effect of oregano essential oil on survival /death of Salmonella typhimurium in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. **Food Microbiology**. v. 19, p. 97-103, 2002.

SOUZA, E.L. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos**. Recife. 2006. Tese de Doutorado, Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N.; BARBOSA FILHO, J.M. Antimicrobial Effectiveness of Spices: an Approach for Use In Food Conservation Systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol.48, n. 4: 549-558p. Jul. 2005.

STAMFORD, T.L., et al. Enterotoxigenicidade de Staphylococcus spp. isolados de leite *in natura*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** [online]. vol.26, n.1, pp. 41-45. 2006.

TIPPAYATUM, P.; CHONHENCHOB, V. Antibacterial effect of essential oil compounds and nisin to food spoilage bacteria. **Kasetsart Journal** . v. 41, n.5, p. 319-323. 2007.

TIRELLI, N. C. **Diagnóstico da Qualidade da Água e da Carne das Ostras da espécie *Crassostrea gigas* na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.** Florianópolis. 2004, 70p. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

TRAJANO, V.N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 29(3): 542-545, jul.-set. 2009.

TURGIS, M. et al. Effect of selected antimicrobial compounds on the radiosensitization of *Salmonella Typhi* in ground beef. **Lett Applied Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 657-62, Jun. 2009.

VALERO, M.; SALMERÓN, M. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. **Int J Food Microbiology**, v. 85, n. 1-2, p. 73-81, Aug. 2003.

VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado.** São Paulo: Livraria Varela. 388p. 2004.

WARD, S. et al. Bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons on agar plates: the role of biosurfactants. **Biotechnology Techniques**, v.10, n.5, p.371-374. 1996.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ORÉGANO, ALHO, CRAVO E LIMÃO FRENTE ÀS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS DE VÔNGOLE

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cravo, limão, orégano e alho sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isolados de *Anomalocardia brasiliiana* e cepas padrão de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella cholerasuis*, através da técnica de difusão de disco e da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Neste estudo observou-se que o óleo essencial de alho apresentou atividade antibacteriana frente o *S. aureus* e a *S. cholerasuis*; já os óleos de cravo e orégano apresentaram atividade frente a todas as bactérias testadas. O óleo essencial de limão não demonstrou atividade antibacteriana.

Palavras-chave: óleo essencial, vôngole, atividade antibacteriana

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of essential oils of clove, limon, oregano and garlic several species of bacteria like *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated of *Anomalocardia brasiliiana* and bacteria standard of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella cholerasuis*, through diffusion test and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). In this study it was observed that the garlic essential oil presented antibacterial activity front the *S. aureus* and the *S. cholerasuis*, already the oils of clove and oregano had presented activity front to all the analyzed bacteria. The essential oil of lemon did not demonstrate antibacterial activity.

Key-words: essential oil, *Anomalocardia brasiliiana*, antibacterial activity

1. INTRODUÇÃO

As propriedades biológicas dos óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas e medicinais têm sido exploradas há muitos anos e atualmente, o uso de compostos antimicrobianos naturais tem se intensificado com o propósito de serem aplicados na conservação de alimentos (DORMANS e DEANS, 2000; BURT, 2004; KRUGER, 2006; BUSSATA, 2007).

Os condimentos são de origem vegetal e freqüentemente utilizados para conferir sabor agradável aos alimentos, no entanto, são ricos em óleos essenciais, que são misturas naturais complexas de metabólitos secundários voláteis, podendo ser isolados de plantas por arraste a vapor. Estes óleos essenciais são formados por mais de cem componentes, responsáveis por seu sabor (NASCIMENTO et al., 2007) e a sua utilização como antimicrobiano tem sido bastante pesquisada por se tratar de substituinte mais seguro para conservação dos alimentos quando comparados aos aditivos químicos.

Além dos condimentos como agentes antimicrobianos, a utilização de sumos de frutas e hortaliças utilizados na dieta, apresentam-se como possibilidade para o desenvolvimento de uma terapêutica simples no combate a doenças infecciosas repercutindo na qualidade de vida de milhões de consumidores além do impulso técnico, científico e financeiro (ARAÚJO, 2007).

Segundo Souza (2006), uma das maiores dificuldades para o uso de antimicrobianos em alimentos são as barreiras necessárias para se regularizar o uso deste como aditivo, mas em países como os Estados Unidos vários componentes de óleos essenciais são registrados para uso como flavorizantes em alimentos. No Brasil, substâncias utilizadas como aromatizantes naturais em alimentos são isentos de registro no Ministério da Saúde e sua utilização é permitida (BRASIL, 2000). Estes flavorizantes são considerados como não tendo nenhum risco para a saúde dos consumidores como o carvacrol, carvona,

cinamaldeído, citral, eugenol, mentol, timol, p-cimeno, limoneno, entre outros (SKANDAMIS e NYCHAS, 2002). Porém substâncias como metil eugenol e estragol são considerados tóxicos e tem sua inclusão proibida em alimentos (BURT, 2004).

Vários condimentos e especiarias são bastante conhecidos pelo seu poder bactericida. Dentre estes condimentos, destaca-se o alho, sendo sua atividade antimicrobiana descrita por vários autores e esta característica é devido à ação da alicina (BURT, 2004; MENDONÇA, 2004; PEREIRA et al., 2008). Em estudo, Indu et al. (2006), constataram que o alho apresentou excelente atividade antibacteriana nas concentrações de 100%, 75%, 50% e 25% frente a todos os sorovares de *Escherichia coli*.

Em produto altamente perecível torna-se indispensável à ação de agentes antimicrobianos para preservar a sua qualidade e segurança por um longo período de tempo, além disso, do ponto de vista sensorial a combinação de aromas como alho e outros condimentos é uma prática tempero comum na Europa e na América Latina que é bem aceito pelos consumidores e em estudos comprovaram a eficácia deste produto para a conservação de alimentos (AYALA-ZAVALA et al., 2009).

Bernbom et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana do cloreto de sódio, ácido láctico e extrato de alho sobre micro-organismos patogênicos em produto de peixe fermentado e constaram que o extrato de alho, nas concentrações de 0 até 10% não apresentava atividade inibitória sobre *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, no entanto *Vibrio* spp. foi inibido com 1,0-1,5% deste extrato.

Bodini et al. (2009) estudaram a atividade do extrato de alho sobre o *quorum-sensing* (QS) dos micro-organismos *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas* sp e *Pseudomonas*

chlororaphise e constataram o poder inibitório deste extrato no desenvolvimento destes micro-organismos. Os óleos essenciais como novo princípio antibacteriano, devido à sua atividade anti-QS pode ser importante na redução da patogenicidade de bactérias resistentes aos medicamentos *in vivo* (KHAN et al. 2009).

Dentre outros óleos essenciais com propriedades antimicrobianas, destaca-se o cravo (*Eugenia caryophyllata*), que é conhecido por seu poder anestésico, analgésico local, anti-inflamatório, e efeitos antibacterianos (HEMAISWARYA e DOBLE, 2009). Enquanto o óleo essencial do limão (*Citrus limon* L.) que possui como principais constituintes o limoneno, β - pineno, γ - terpineno e 2% citral (neral e geranial), tem como seus constituintes com atividade antibacteriana sobre as bactérias *E.coli* e *S. aureus* constatada, o limoneno e o citral (MISHARINA e SAMUSENKO, 2008; SCHUCK et al., 2001)

O presente trabalho teve como objetivo determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de quatro óleos essenciais (orégano, cravo, limão e alho) da mesma marca comercial sobre micro-organismos cepas-padrão ATCC e isolados de alimentos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

Foram testados *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isolados do vôngole (*Anomalocardia brasiliiana*), obtidos do projeto “Avaliação microbiológica e apoio a melhoria na qualidade de mariscos processados e comercializados por "mariscadeiras", da Baía de Todos os Santos” desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia dos Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. Também foram utilizadas bactérias cepas padrão

ATCC (American Type Culture Collection): *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) do banco de cepas do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. Todas as bactérias foram armazenadas sob congelamento em freezer à temperatura de -20°C e 24 horas antes da realização do experimento, foram repicadas em ágar de Soja Tripticaseína (TSA) e incubados a 35°C.

2.2 Óleos essenciais

Foram testados óleos essenciais disponíveis no comércio da marca Laszlo Aromalândia (São Paulo- Brasil), como de alho (*Allium sativum*), de cravo botões (*Eugenia caryophyllata*), de orégano (*Origanum vulgare ssp. Hirtum*) e do limão siciliano (*Citrus limonum medica*).

A empresa Laszlo Aromalândia (Autorização para funcionamento/ANVISA nº 2.04.758-2) é uma empresa que comercializa óleos essenciais para diversas áreas, como indústria de alimentos, cosméticos, farmacêuticos, entre outros. Os óleos essenciais estudados são comercializados para a aplicação em alimentos e conforme a legislação específica, este tipo de produto para a utilização em alimentos são isentos de registro no Ministério da Saúde (BRASIL, 2000).

O processo de obtenção dos óleos essenciais de cravo (*Eugenia caryophyllata*), alho e orégano analisados foi o processo de hidrodestilação, com o controle da temperatura (inferior a 100°C) e pressão durante o processo para evitar a perda dos princípios ativos dos óleos essenciais. Já para a obtenção do óleo essencial da casca do limão (*Citrus limonum medica*) foi obtido pelo método de prensagem a frio, neste processo as frutas são prensadas e extraídos o suco e

os óleos essenciais. Após a prensagem é realizada a centrifugação da mistura, através da qual se obtém o óleo essencial puro (LASZLO, 2010).

O óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllata*) possui 90% de eugenol. O de orégano (*Origanum vulgare ssp. Hirtum*) apresenta 80% de carvacrol, o do limão siciliano (*Citrus limonum medica*) contém 60% de d-limoneno e o de alho (*Allium sativum*) (LASZLO, 2010).

2.3 Teste de susceptibilidade *in vitro*

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi testada através da técnica de difusão em disco de acordo com o protocolo M2-A8 do “National Committee for Clinical Laboratory Standard” (NCCLS, 2000), adaptado para produtos naturais.

De um crescimento bacteriano de 18 a 24 horas, foram inoculadas três a cinco Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em 5 mL de solução salina a 0,85%, com auxílio da alça bacteriológica, previamente flambada. A suspensão obtida teve a turvação ajustada ao padrão 0,5 da escala de McFarland correspondendo a 10^8 células/ mL. Com o auxílio de “swab” estéril, a suspensão foi semeada na superfície de uma placa de ágar Müller-Hinton, em três direções até a obtenção de um esfregaço uniforme. Após a secagem do inóculo, foram aplicados discos de papel de filtro, com 6 mm de diâmetro, impregnados com 5 µL de cada óleo essencial. As leituras foram realizadas, após 18 a 24 horas de incubação a 35-37°C, por meio da medição dos halos de inibição de crescimento bacteriano em milímetros de diâmetro. Controles de qualidade foram realizados com as cepas padrão e disco de cloranfenicol (30µg-CECON).

2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada através da técnica de difusão em poços, conforme metodologia adaptada de Kruger (2006).

A suspensão bacteriana foi procedida como descrita no item anterior para o padrão 0,5 McFarland, correspondente a 10^8 células /mL. Um mL da suspensão foi homogeneizada a 19 mL de ágar Muller Hinton fundido e resfriado a 45°C - 50°C em seguida transferido para a placa de Petri contendo um fino filme de ágar bacteriológico a 1% e 5 ponteiros estéreis vertidas, para a obtenção dos poços. Após solidificação, as ponteiros foram retiradas e foram aplicados 50 μL dos óleos essenciais, nas diluições 0,1%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, em cada poço. A incubação foi feita a $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e após este período de incubação os diâmetros dos halos formados foram medidos (em milímetros).

2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e a diferença entre as amostras foi avaliada segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como podem ser observados na Tabela 01, os óleos essenciais de cravo e orégano apresentaram atividade frente a todas as bactérias analisadas. Já o óleo essencial de alho somente apresentou atividade antibacteriana frente *S. aureus* e *S. choleraesuis*. No entanto o óleo de orégano apresentou maiores halos de inibição bacteriana. O de limão não demonstrou atividade antibacteriana.

Tabela 1: Atividade antibacteriana de diferentes óleos essenciais frente às bactérias isoladas do vôngole e as cepas ATCC.

| Bactérias | Óleos essenciais | | | |
|--------------------------------|---|-------------|--------------------------|-------------|
| | Limão | Alho | Cravo | Orégano |
| Isolados do vôngole | (Diâmetro dos halos em milímetros) | | | |
| <i>S.aureus</i> isolado 1 | NI | 40 ± 0 | 11 ± 0 | 26.7 ± 0.33 |
| <i>S.aureus</i> isolado 2 | NI | 40 ± 0 | 13,3 ± 0,33 | 28 ± 1 |
| <i>E. coli</i> isolado 1 | NI | NI | 10,3 ± 0,33 | 23.7 ± 0.33 |
| <i>E. coli</i> isolado 2 | NI | NI | 10,7 ± 0.33 ^a | 20,3 ± 2.33 |
| Cepas padrão ATCC | NI | | | |
| <i>Salmonella choleraesuis</i> | NI | 39.7 ± 0.33 | 8.7 ± 0.33 | 14.3 ± 0.33 |
| <i>S.aureus</i> | NI | 40 ± 0 | 15,7 ± 0.33 | 29,3 ± 0.33 |
| <i>E.coli</i> | NI | NI | 11 ± 0 | 27,7 ± 2.33 |

NI (Não houve inibição)

Através da análise estatística pelo teste de Tukey dos resultados obtidos na Tabela 1, conclui-se que existe diferença significativa entre a ação dos diferentes óleos essenciais, frente a mesma bactéria analisada.



Figura 1: Placa com cultura de *S. aureus*, mostrando halos de inibição pelo óleo essencial de orégano através da técnica de difusão em disco.

Os resultados (Tabela 1) mostram que as cepas de *S. aureus* tanto as padrões quanto as isoladas do vôngole foram mais susceptíveis aos óleos de cravo, orégano e alho que as demais cepas. O mesmo resultado foi verificado por Dormans e Deans (2000), após utilizarem óleos essenciais de orégano, gerânio, cravo e pimenta, para avaliar suas atividades, com a metodologia de difusão em poços, frente a 25 espécies Gram-positivas e negativas e observaram que bactérias Gram-positivas eram mais suscetíveis que as Gram-negativas, sendo que óleos de orégano e cravo que apresentaram zona de inibição de 18.9mm e 14.9mm, respectivamente, sobre cepas de *S. aureus* e 29.5mm e 11,7mm sobre as cepas de *E. coli*. Avaliando a relação entre Gram positivas e negativas quanto à susceptibilidade a antimicrobiano, Burt (2004) afirma que a maioria dos estudos que investigam a ação dos óleos essenciais em relação aos microrganismos patogênicos em alimentos concorda que, geralmente, os óleos são ligeiramente

mais ativos para as bactérias Gram-positivos do que sob as bactérias Gram-negativas. As espécies Gram-negativas são menos susceptíveis à ação dos óleos essenciais devido à existência de uma membrana exterior que cerca a parede celular, o qual restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através de parede externa.

No entanto, a maior susceptibilidade à ação de antimicrobianos naturais de acordo com a coloração de Gram não foi constatado por Ushimaru et al. (2007), ao estudarem a ação antimicrobiana dos extratos metanólicos de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) e alho (*Allium sativum* L.) sobre bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* sp) e verificaram que o extrato metanólico de cravo-da-índia (95mg/mL) foi mais eficaz para as bacterianas Gram positivas e os extratos metanólicos de alho (133mg/mL) apresentaram maior eficácia contra as bactérias Gram-negativas estudadas. No entanto os autores ressaltam a importância de se avaliar as concentrações dos extratos secos.

Segundo Martino et al. (2009), o óleo essencial de orégano mostrou ação principalmente contra as bactérias Gram positivas, entre as quais *S. epidermidis* foi a mais inibida. Entre as bactérias Gram-negativas, apenas *E. coli* foi inibida pelo óleo.

Busatta et al. (2007) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial orégano (*Origanum vulgare*) contra várias bactérias patogênicas, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesius*, através do método de difusão em disco, e verificaram que a *Salmonella choleraesius* apresentou maior halo de inibição (29.0 ± 0.08 mm) que as outras cepas testadas.

Santuário et al. (2007), após avaliarem a atividade antibacteriana de óleos essenciais extraídos de orégano (*Oreganum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*), frente a 60 isolados de *Salmonella*

enterica, compreendendo 20 sorovares, todos de origem avícola, através do método de microdiluição em caldo, concluíram que o óleo essencial de orégano apresentou maior poder inibitório que os demais óleos. Porém, salientam que as comparações destes resultados com estudos similares devem ser cautelosas, na medida em que a grande maioria dos estudos emprega a técnica de difusão em ágar, fornecendo resultados referentes ao diâmetro de inibição, expressos em milímetros; mesmo os estudos de microdiluição em caldo, na grande maioria dos casos, não seguem procedimentos padronizados, como os empregados no referido experimento.

No presente estudo se verificou que o óleo essencial da casca do limão (*Citrus limonum medica*) não apresentou atividade sobre todas as bactérias analisadas (Tabela 1). A utilização de óleo essencial de limão como agente antimicrobiano frente a micro-organismos patogênicos em alimentos é pouco explorada, no entanto, é possível encontrar pesquisas em outras áreas e na forma de extratos, como o estudo de Soares et al. (2008) que avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro* das tinturas das folhas do cajá, da casca do limão e das folhas do jenipapo sobre micro-organismos da cavidade bucal, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus mutans* (ATCC 2575), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27609), e *Lactobacillus casei* (ATCC 7469) e observaram que a tintura de cajá e do limão foram as que obtiveram os melhores resultados.

Johann et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato da casca do limão (*C. limon*), nas concentrações de 7.8 a 1000 µg/ml, frente aos micro-organismos *S. aureus* e *E. coli*. e constataram que o extrato apresentou atividade antimicrobiana e a Concentração Inibitória Mínima para *S. aureus* foi de 1000 µg/ml e 500 µg/ml para *E. coli* este mesmo resultado positivo quanto a atividade do óleo essencial de limão não foi verificado neste experimento.

Enquanto Araújo (2007) avaliou a atividade antimicrobiana dos sumos de cebola (*Allium cepa*), tomate (*Solanum lycopersicum*, L.), pimentão (*Capsicum cordiforme*), pimenta (*Capsicum sp.*), limão (*Citrus limon*), maracujá (*Passiflora alata*), melancia (*Citrullus lanatus*), laranja doce (*Citrus sinensis*), laranja azeda (*Citrus aurantium* Linn.) e uva (*Vitis vinifera*), frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* e constatou que os micro-organismos Gram-positivos apresentaram maior poder de inibição que os demais, sendo que o sumo do limão demonstrou maior atividade em relação aos demais sumos utilizados.

Na Tabela 2, pode-se observar que todos os microorganismos foram suscetíveis à ação do óleo essencial de orégano, com uma variação nos valores de CIM de 0,25-0,5 mL / mL.

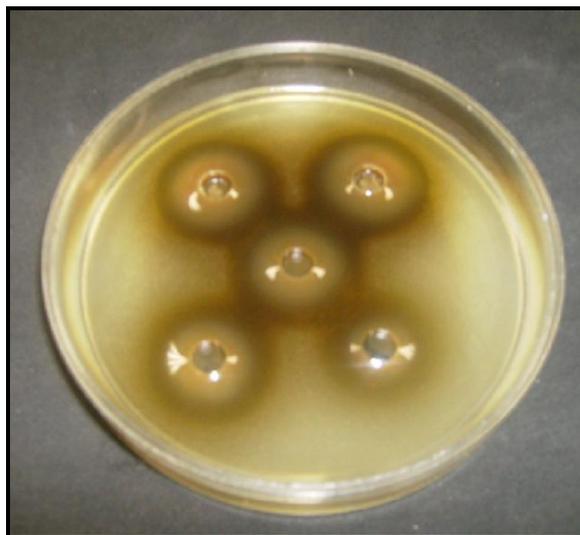


Figura 2: Placa com cultura de *S. aureus*, mostrando halos de inibição pelo óleo essencial de cravo através da técnica de difusão em poços.

Du et al. (2009) estudaram a atividade antimicrobiana dos óleos de pimenta da Jamaica, alho e orégano sobre *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* e constataram que a atividade antimicrobiana do óleo de orégano foi maior do que as atividades dos outros óleos, quando adicionados em um filme para a conservação de alimentos e variando a concentração de 0% (controle) a 3% p/p.

Resultados de CIM do óleo essencial de orégano, obtidos neste trabalho, são da mesma ordem de grandeza que os encontrados por Busatta et al. (2007), por exemplo, a *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* apresentaram os respectivos valores encontrados foram: 0,46 0,46 e 0,23 mL / mL. No presente estudo, a CIM do óleo essencial de orégano para o mesmo óleo, verificou-se para as cepas ATCC, para ambos *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*, foi de 0.5 mL/mL e 0.25 mL/mL, respectivamente.

Tabela 2: Resultado da Concentração Mínima Inibitória de diferentes óleos essenciais (mL/mL)

| Bactéria | Óleos essenciais | |
|----------------------------|------------------|---------|
| | Cravo | Orégano |
| Isolados do vôngole | | |
| <i>S.aureus</i> isolado 1 | 0.5 | 0.25 |
| <i>S.aureus</i> isolado 2 | 0.5 | 0.25 |
| <i>E. coli</i> isolado 1 | 1.0 | 0.5 |
| <i>E. coli</i> isolado 2 | 1.0 | 0.5 |
| Cepas padrão ATCC | | |
| <i>S. cholerasuis</i> | 1.0 | 0.5 |
| <i>S. aureus</i> | 0.5 | 0.25 |
| <i>E.coli</i> | 1.0 | 0.5 |

Baseado na Tabela 2 observa-se que o óleo de cravo inibiu as cepas estudadas com uma variação nos valores de CIM de 0.5-1,0 mL / mL, sendo menos eficaz sobre as cepas de *E.coli* e *Salmonella*. Hoffmanno et al. (1999), após testar óleo de cravo concluíram que este óleo, na concentração de 10,0%, inibiu

completamente o crescimento de todos os vinte e um microrganismos testados, dentre eles *S. aureus*, *B. cereus* e *Salmonella enteritidis*.

4. CONCLUSÃO

O desempenho satisfatório dos óleos estudados foi alcançado com concentração relativamente baixa dos óleos essenciais de cravo e orégano sobre todas as bactérias testadas.

O óleo essencial de alho que não apresentou atividade frente as cepas de *E. coli*.

O óleo essencial de orégano apresentou maior potencial inibidor que o óleo de cravo frente as cepas ATCC e isolados de *S. aureus*, *E. coli* e *Samonella*.

O óleo essencial de limão não apresentou atividade antibacteriana.

As cepas de *S. aureus* apresentaram as menores concentrações inibitórias mínima em relação às cepas de *Salmonella* e *E. coli* frente aos óleos de cravo e orégano.

As concentrações inibitórias mínimas dos óleos essenciais frente as bactérias testadas variaram entre 0,25% a 1% para os óleos testados.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, C.D. **Atividade antibacteriana in vitro e in sito de Allium tuberosum – Rottler ex Spengl (alho “nirá”, alho “japonês”, “jiucaí”, alho “chinês”) – Liliaceae –sobre agentes de toxinfecções alimentares.** 2007. 85f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

AYALA-ZAVALA, J. et al. Enhancing safety and aroma appealing of fresh-cut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils. **Journal Food Science**, v. 74, n. 7, p. 84-91, Sept. 2009.

BERNBOM, N. et al. Survival and growth of Salmonella and Vibrio in som-fak, a Thai low-salt garlic containing fermented fish product. **Int J Food Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 223-9, Sept. 2009.

BODINI, S. et al. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. **Lett Applied Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 551-5, Nov. 2009.

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

BUSATTA, C. et al. Evaluation of Origanum vulgare essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 610-616, Oct/Dec. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n.º 23 de 16 de março de 2000.* Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/23_00.htm>. Acesso em: 09 mai. 2010.

DORMAN, H.; DEANS, S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-16, Feb. 2000.

DU, W. et al. Antibacterial effects of allspice, garlic, and oregano essential oils in tomato films determined by overlay and vapor-phase methods. **Journal Food Science**, v. 74, n. 7, p. M390-7, Sep. 2009.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 997-1005, Nov. 2009.

HOFFMANN, F.L.; SOUZA, S.J.F.; GARCIA-CRUZ, C.H.; VINTURIM, T.M.; DUTRA, A.L. Determinação da atividade antimicrobiana “in vitro” de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. **Boletim do CEPPA**, v.17, p.11-20, 1999.

INDU, M. et al. Antimicrobial activity of some of the South-Indian spices against serotypes of Escherichia coli, Salmonella, Listeria monocytogenes and Aeromonas hydrophila. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 153-158, Apr./Jun. 2006.

JOHANN, S. et al. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from Citrus spp. peels. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 6, p. 681-5, Sep 2007.

KHAN, M. et al. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. **Lett Appl Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 354-60, Sep. 2009.

KRUGER, M.F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. 2006. 74f. Dissertação (Pós-graduação em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

LASZLO AROMATERAPIA. Disponível em: < <http://www.laszlo.ind.br/>> **Acessado em: 05 de junho de 2010.**

MARTINO, L. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Letswaart growing wild in Campania (Southern Italy). **Molecules**, v. 14, n. 8, p. 2735-46, 2009.

MENDONÇA, A.T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *S. aureus* em ricota cremosa**. 72f. 2004. Tese (Pós-graduação em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras. Lavras. Minas Gerais. 2004.

MISHARINA, T.A.; SAMUSENKO, A.L. Antioxidant Properties of Essential Oils from Lemon, Grapefruit, Coriander, Clove, and Their Mixtures. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 45, n.4, p.438-442, 2008

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.17, n.1, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards M7-A5. Wayne, PA, 2000.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G., SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun., 2008.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F. ; Pozzatti P. ; MORAES, C. ; FRANCHIN, P. R. ; ALVES, S. H. . Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, p. 803-808, 2007.

SOARES, S. et al.. Atividade antibacteriana de tinturas de plantas tropicais sobre microorganismos da cavidade bucal. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v.29, n.1, p. 20-24, jan./jun., 2008.

SCHUCK, V.J.A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 37, n. 1, jan./abr., 2001

SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. **Int J Food Microbiology**, v. 79, n. 1-2, p. 35-45, Nov 2002.

SOUZA, E.L. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos**. Recife. 2006. Tese de Doutorado, Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.

USHIMARU, P. et al. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 717-719, Oct./Dec. 2007.

CAPÍTULO III

CONTROLE ATRAVÉS DO USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS ARTIFICIALMENTE INOCULADOS EM VÔNGOLE (*Anomalocardia brasiliiana*)

RESUMO

O presente estudo visou avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) e orégano (*Origanum vulgare ssp. Hirtum*) sobre as cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* inoculadas artificialmente em amostras de *Anomalocardia brasiliiana* e armazenadas durante cinco dias sob refrigeração. Os resultados demonstraram a maior eficácia do óleo essencial de orégano em relação ao de cravo sobre todas as cepas analisadas. Verificou-se que a adição do óleo essencial reduziu a população de *Salmonella* spp em 5,6 ciclos logarítmicos nas amostras de vôngole artificialmente inoculados. A ação do óleo essencial de cravo garantiu a inibição de *Salmonella*, *E. coli* e *S. aureus*, por no mínimo dois dias, sob refrigeração.

PALAVRAS-CHAVE: óleo essencial, cravo, orégano, antibacteriano, vôngole.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the antibacterial activity of essential oils of clove (*Eugenia caryophyllata*) and oregano (*Origanum vulgare ssp. Hirtum*) on *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* inoculated artificially in samples of *Anomalocardia brasiliiana* stored during five days on refrigeration. The results had demonstrated the biggest effectiveness of the essential oil of oregano in relation of clove on all bacteria analyzed. It was verified that the addition of the essential oil reduced the population of *Salmonella* spp in 5,6 logarithmic cycles in the samples of shellfish inoculated artificially. The action of the essential oil of clove guaranteed the inhibition of *Salmonella*, *E. coli* and *S. aureus*, at least two days, under refrigeration.

KEY-WORDS: essential oil, clove, oregano, antibacterial, *Anomalocardia brasiliiana*

1. INTRODUÇÃO

A utilização de óleos essenciais de plantas e condimentos com função antimicrobiana em alimentos tem sido crescentemente estudada e os resultados demonstram a eficácia destes óleos, como uma alternativa viável para a conservação de alimentos. Os óleos essenciais podem ser utilizados como método adicional para controlar o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes em alimentos (SKANDAMIS e NYCHAS, 2002; PEREIRA et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2008).

Os óleos essenciais e outros componentes de ervas e condimentos são usados na preparação de alimentos, sendo muitos desses classificados como GRAS - “Generally Recognized as Safe” (MAGNANI, 2001).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais em alimentos depende de vários fatores como composição, concentração, condições de tratamento, estocagem do condimento empregado, espécie e número de micro-organismos contaminantes presentes. A maioria dos estudos que relatam o efeito inibidor de condimentos sobre micro-organismos são conduzidos *in vitro*. Conseqüentemente são crescentes os estudos em relação a extratos antimicrobianos utilizados em diversos tipos de alimentos. Dentre os fatores que interferem na atividade antimicrobiana do óleo essencial no alimento destaca-se o tipo da matriz alimentícia estudada, visto que a forma como este óleo irá se difundir pelo o alimento irá interferir na eficácia do mesmo (CHAO e YOUNG, 2000; SAGDIÇ, 2003; PEREIRA et al., 2008; KRUGER, 2006).

Os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e cravo (*Syzygium aromaticum*) têm sempre apresentado resultados de destaque como agente hábil de inibição de bactérias e fungos contaminantes de alimentos. Por

terem ocorrência natural levam vantagem em relação aos antioxidantes sintéticos no tocante à toxicidade, que embora existente seja menos lesiva aos tecidos do que os produtos sintéticos (SOUZA et al., 2005; TANGERINO, 2006).

Os estudos da viabilidade da utilização de antimicrobianos naturais pode ser um aliado na conservação de alimentos, auxiliando na redução dos quadros de doenças veiculadas por alimentos. Principalmente, quando se trata da preservação de alimentos excessivamente manipulados que são contaminados por se encontrarem em condições higiênico-sanitárias inadequadas como os mariscos do tipo vôngole.

O vôngole constitui um alimento nutritivo e de grande importância nas regiões onde o poder aquisitivo é baixo e as fontes nutritivas em geral são escassas (GUIMARÃES, 2002). Porém há relatos de mariscos coletados na costa brasileira que apresentaram presença de *Escherichia coli* (VIEIRA, 2004; PEREIRA et al., 2004; DANTAS, 2009) e *Salmonella* (FURLAN, 2004). Muitas bactérias que não são encontradas naturalmente nesse tipo de alimento são introduzidas durante o seu processamento (CORDEIRO, 2005).

A manipulação da carne de marisco é um ponto crítico durante o seu processamento e estudos demonstraram que esta etapa infere um risco considerável de contaminação e mesmo em unidades industriais de produção de alimento, onde o processamento é rigorosamente controlado, pode ocorrer contaminação do produto (DANTAS, 2009; PIRES et al., 2002).

A carne dos mariscos é altamente perecível e pode transmitir microrganismos com potencial patogênico, caso haja falhas higiênicas nas suas etapas de processamento. Dantas (2009) após avaliar a qualidade higiênico-sanitária de vôngole (*Anomalocardia brasiliensis*) constatou que melhor higiene das mãos e utensílios utilizados pelas marisqueiras durante a catação dos mariscos seria importante para reduzir significativamente a contaminação da carne

processada levando-se em consideração todas as etapas de produção deste alimento. Durante o estudo, o autor verificou que na colheita e catação do vôngole, 30% e 50% das marisqueiras, respectivamente, apresentaram contaminação da superfície das mãos por estafilococos coagulase positiva, 20% e 40% das mãos das marisqueiras mostraram contaminação por *E. coli* durante a colheita e catação do vôngole, respectivamente.

A ocorrência de surtos alimentares devido à presença de micro-organismos patogênicos em moluscos tem sido evidenciada e as falhas devido à manipulação inadequada e na cadeia de frio são identificadas como responsáveis pelas contaminações deste tipo de alimento e o agravamento do problema está associado ao consumo destes moluscos *in natura* ou levemente cozido (BEIRÃO et al., 2000). A ocorrência de surtos de intoxicações e infecções alimentares em razão do consumo de mariscos contaminados é uma confirmação de que o risco deve ser monitorado e medidas preventivas devem ser adotadas.

Desta forma, o presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano e cravo frente às cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. após a inoculação em vôngole durante cinco dias de armazenamento sob refrigeração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Avaliação microbiológica do vôngole

As amostras de marisco do tipo vôngole foram adquiridas no comércio na cidade de Salvador-BA. As amostras foram embaladas e conduzidas em caixas isotérmicas com gelo reciclável, e em seguida, foram levadas para o laboratório de

Pesquisa em Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFBA, onde foram feitas as análises.

As análises microbiológicas do vôngole *in natura* foram realizadas contagem e enumeração de Coliformes a 45° C, contagem e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva e isolamento e identificação de *Salmonella* spp. de acordo com Silva et al.(2007).

Nas análises, avaliaram-se os parâmetros exigidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) e foram feitas de acordo com as exigências estabelecidas para de moluscos bivalves cozidos (Coliformes a 45°C, *Salmonella* spp. e Estafilococos coagulase positiva).

2.2. Avaliação microbiológica do vôngole inoculado artificialmente e óleos essenciais

Foram utilizados cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* previamente isoladas do marisco do tipo vôngole (*Anomalocardia brasiliiana*) e cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection) de *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

Óleos essenciais de botões de cravo (*Eugenia caryophyllata*) e de orégano da Turquia (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*), da marca Laszlo Aromalândia (São Paulo- Brasil), foram adquiridos no comércio e utilizados no estudo.

2.3. Preparo do marisco

O marisco foi obtido no comércio de Salvador-BA e submetido a tratamento térmico de 121°C por 15 minutos em autoclave para garantir a eliminação da microbiota natural. As amostras foram subdivididas em porções de 20g de amostra. Em seguida, o alimento foi armazenado sob temperatura de refrigeração (5°C). As amostras foram avaliadas nos intervalos de tempo 0, 2, 48, 72, 96 e 120 horas de armazenamento.

2.4. Preparação do inóculo

De um crescimento bacteriano de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* de 18 a 24 horas, foram inoculadas separadamente 3 a 5 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de cada cepa em 5 mL de solução salina a 0,85% , com o uso de alça bacteriológica, previamente flambada. A suspensão obtida teve a turvação ajustada ao padrão 0,5 da escala de McFarland, correspondendo a uma cultura de 10^8 UFC/ml. Em seguida estas suspensões de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* foram diluídas em água peptonada a 10^4 , 10^3 , 10^4 UFC/ml respectivamente.

2.5. Inoculação das cepas no vôngole

As suspensões foram adicionadas ao marisco, atingindo a concentração 10^2 , 10 e 10^2 UFC/g de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus*, respectivamente. A homogeneização do inóculo no produto foi realizada inicialmente de forma manual por cerca de 10 minutos, com auxílio de luvas cirúrgicas desinfetadas e em seguida se utilizou o Stomacher por três minutos (KRUGER, 2006).

2.6. Preparação e Adição dos óleos essenciais no vôngole

Após a homogeneização foram adicionadas ao marisco e inóculo, os óleos essenciais nas proporções, previamente determinadas no testes *in vitro* (KRUGER, 2006).

O óleo essencial de orégano para as cepas de *S. aureus* foi adicionado na concentração de 0,25%. Este mesmo óleo essencial para as cepas de *Salmonella* e *E. coli* foi adicionado na concentração de 0,5% pois foi a menor concentração que apresentou maior halo de inibição nos testes *in vitro*, conforme estudo Santos et al. (2010).

O óleo essencial de cravo para as cepas de *S. aureus* foi adicionado na concentração de 0,5%. Este mesmo óleo essencial para as cepas de *Salmonella* e *E. coli* foi adicionado na concentração de 1% pois foi a menor concentração que apresentou maior halo de inibição nos testes *in vitro*, conforme estudo Santos et al. (2010).

A contagem de microorganismos após a adição do antimicrobiano foi realizada nos intervalos de tempo 0, 2, 48, 72, 96 e 120 horas de armazenamento a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

2.7. Análise microbiológica do vôngole inoculado artificialmente e óleos essenciais

O controle do processo de esterilização foi realizado através da transferência de 0,1 mL para placas contendo Agar padrão para contagem (PCA), após a secagem, as placas foram incubadas a 37°C por 48h. O controle foi avaliado nos intervalos de tempo 0, 2, 48, 72, 96 e 120 horas de armazenamento (SOUZA, 2005).

Já o controle positivo do crescimento das cepas estudadas foi realizado com as amostras contendo separadamente cada uma dos micro-organismos sem a adição de óleos essenciais. Em seguida foram avaliados nos intervalos de tempo 0, 2, 48, 72, 96 e 120 horas de armazenamento a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

2.8. Recuperação *Salmonella* spp., *E.coli* e *S. aureus*

Para a contagem de *Salmonella* spp., *E. coli* e *S. aureus* cada amostra de 20g foi homogeneizada em 180 mL de água peptonada 0,1% estéril. Em seguida, em duplicata, foram transferidas alíquotas de 0,1mL para a superfície de ágar Xilose Lisina Desoxicilato (XLD) para recuperação de *Salmonella* spp., de ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para determinação de *E. coli* e de ágar Baird Parker (BP) para recuperação de *S. aureus* e espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalsky . Após a secagem, as placas de XLD e EMB foram incubadas a 37°C por 24h e as placas de BP foram incubadas a 37°C por 48h para posterior contagem.

2.9 Análise Estatística

O delineamento experimental do teste de atividade antibacteriana dos óleos foi inteiramente casualizado, e para a análise estatística fez-se a comparação das médias pelo Teste de Tukey, com limite de confiança de 95%. Todo experimento foi realizado em duplicata, podendo-se acompanhar o crescimento bacteriano nos mariscos em diferentes tempos (0, 2, 48, 72, 96 e 120 horas) de armazenamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise microbiológica do vôngole

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece para a carne de moluscos bivalves cozidos, temperados ou não, industrializados resfriados ou congelados os seguintes padrões: estafilococos coagulase positiva até 10^3 UFC/g, coliformes a 45°C/g até 5×10 NMP/g e ausência de *Salmonella* spp. em 25g de amostra. Os resultados da análise microbiológica do vôngole *in natura* (Tabela 1) apresentaram ausência de *Salmonella* spp. e os demais resultados enquadraram-se nos limites estabelecidos pela RDC N° 12, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001).

Tabela 1: Resultados das análises microbiológicas do vôngole obtido no comércio.

| Análises | Vôngole <i>in natura</i> | Legislação específica (BRASIL, 2001) |
|----------------------------------|--------------------------|---|
| Coliformes à 45°C | < 3 NMP/g | 5×10 NMP/g |
| Estafilococos coagulase positiva | < 10 UFC/g | 10^3 UFC/g |
| <i>Salmonella</i> spp. | Ausência em 25g | Ausência em 25g |

A cocção é uma etapa comum aos mariscos e possui a finalidade de facilitar o processo de separação da carne das conchas e carapaças. Este tratamento térmico é, relativamente, eficiente para a redução da microbiota endógena uma vez que atinge temperatura média próxima a 100°C por, aproximadamente, quinze minutos sendo capaz de destruir grande parte das formas vegetativas dos micro-organismos endógenos com potencial patogênico (DANTAS, 2009).

É importante conhecer as características microbiológicas dos moluscos bivalves, pois sendo organismos filtradores retém micro-organismos que podem ultrapassar facilmente os limites microbiológicos fixados pela legislação (BARROS et al., 2005). Pereira et al.(2004) afirmaram que mesmo após o tratamento térmico a flora microbiana inicial de mexilhões foi encontrada no alimento pós-processamento devido a contaminação cruzada.

A contaminação dos mariscos com *Salmonella*, devido à sua proliferação em águas poluídas, tem sido um problema em muitas partes do mundo (FAO, 2010). No presente estudo não foi detectado a presença de *Salmonella* spp. na amostra de vôngole. Este mesmo resultado foi constatado por Dantas (2009) ao avaliar a qualidade higiênico-sanitária de vôngole (*Anomalocardia brasiliiana*) na região da Baía de Todos os Santos (Bahia-Brasil), muito embora a salmonelose permaneça uma das doenças de origem alimentar mais freqüentes no mundo inteiro e

3.2. Análise Microbiológica do vôngole inoculado artificialmente e óleos essenciais

3.2.1 Enumeração de *S.aureus*

O óleo essencial de orégano apresentou maior atividade para as cepas de *S. aureus* em relação ao óleo essencial de cravo, inibindo o desenvolvimento microbiano até o 4º dia de armazenamento a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Em relação ao período de armazenamento as cepas de *S. aureus* ATCC não diferiram em nível de 5% de significância no crescimento entre as 48 a 72 horas de armazenamento, porém houve diferença significativa entre 2 a 120 horas de armazenamento de acordo com o teste de Turkey (Tabela 2).

Tabela 2: Valores médios de log (UFC/g) para cepas de *S. aureus* inoculadas artificialmente no vôngole durante o armazenamento.

| Micro-organismo | Período de armazenamento (horas) | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 0 | 2 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| <i>S. aureus</i> (ATCC) | 2,6 ^a | 2,6 ^a | 4,0 ^b | 4,2 ^b | 5,3 ^c | 5,1 ^c |
| <i>S. aureus</i> (isolado) | 2,7 ^a | 2,7 ^a | 3,9 | 4,2 | 5,2 ^b | 5,3 ^b |
| <i>S. aureus</i> (ATCC + orégano) | 2,6 ^a | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 2,5 ^a |
| <i>S. aureus</i> (isolado + orégano) | 2,7 ^a | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 2,9 ^a |
| <i>S. aureus</i> (ATCC + cravo) | 2,6 | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 3,1 |
| <i>S. aureus</i> (isolado + cravo) | 2,7 ^a | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 3,0 ^a |

*Médias seguidas por letras distintas, minúscula nas linhas diferem entre si a 5% de significância.

O óleo essencial de orégano tem como principais componentes o carvacrol e o timol, que possui ação sinérgica, atuando na parede celular microbiana aumentando a sua permeabilidade, como demonstraram Lambert et al. (2001), testando óleo essencial de orégano e obtendo inibição total para as cepas de *S. aureus*. Kruger (2006) afirma que este óleo essencial pode ser adicionado em matrizes alimentares desde que não interfira no *flavor* normal do alimento, já que em estudos verificou-se que a adição do óleo essencial de orégano na concentração de 0,5% em lingüiça frescal suína resultou na rejeição deste produto após análise sensorial.

A redução das cepas de *S. aureus* inoculadas artificialmente foi de 5,2 ciclos logarítmicos para as amostras com óleo de orégano nas primeiras 96 horas (quatro dias) de armazenamento (Figura 1) em relação as amostras sem a adição de óleos essenciais. Segundo Mendonça (2004) verificou a redução de cepas de

S. aureus, quando utilizou óleo essencial de orégano em ricota artificialmente contaminada. E atribui esse resultado à diminuição da ação do timol que é afetada pela ação das proteínas.

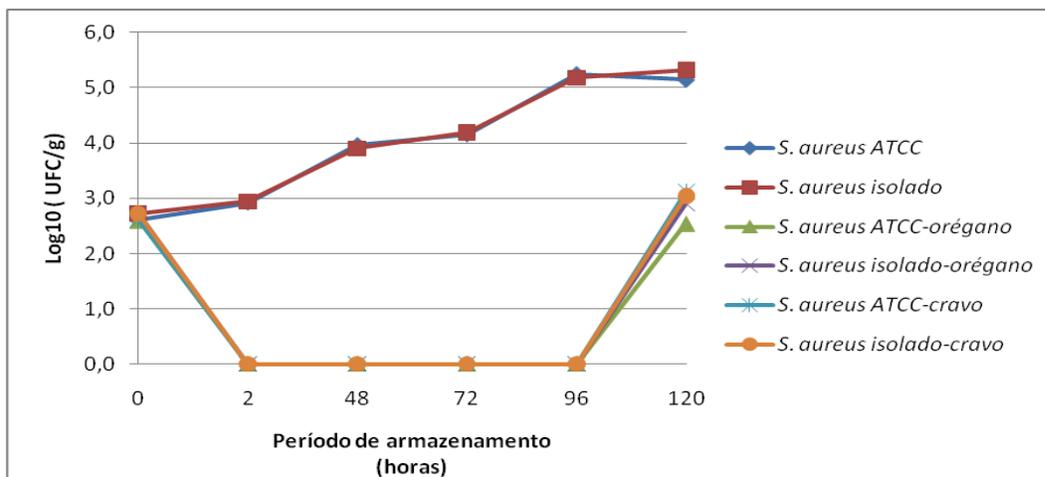


Figura 1: Valores médios de log (UFC/g) de cepas de *S. aureus* artificialmente inoculadas ao vôngole durante armazenamento.

A ação do cravo-da-índia no presente estudo é apresentada na Figura 1 onde pode-se observar uma redução de 5,1 ciclos logarítmicos da carga microbiana em até 96 horas de armazenamento. Após este período foi verificado um desenvolvimento bacteriano, porém com a redução de até dois ciclos logarítmicos em relação à amostra controle, mantendo este produto dentro dos limites preconizados pela RDC nº 12, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001). Bayomi (1992) utilizou o óleo de cravo para a inibição de cepas de *S. aureus* em amostras de iogurte e constatou o eficaz potencial inibidor deste óleo.

Mendonça (2004) após avaliar os efeitos dos óleos essenciais de orégano e cravo nas concentrações de 5% e 1%, respectivamente, para conservação de ricota cremosa pasteurizada e artificialmente contaminada por *S. aureus*, verificou que o óleo de cravo se apresentou como o melhor antibacteriano, reduzindo em

3,5 ciclos logarítmicos do micro-organismo estudado e três ciclos logarítmicos quando utilizado o óleo de orégano, concluindo que estes óleos se apresentam como uma ferramenta auxiliar para a conservação deste alimento.

3.2.2. Enumeração de *E.coli*

As amostras contaminadas artificialmente com *E. coli* sem óleo essencial apresentaram um aumento significativo no número de células bacterianas (UFC) ao longo dos cinco dias de armazenamento (Tabela 3).

Tabela 3: Valores médios de log (UFC/g) das cepas de *E. coli* inoculadas artificialmente no vôngole durante o armazenamento

| Micro-organismo | Período de armazenamento (horas) | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------|----------------|------------------|------------------|------------------|
| | 0 | 2 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| <i>E. coli</i> ATCC | 2,8 | 3,5 | 4,1 | 5,1 | 5,6 ^a | 6,0 ^a |
| <i>E. coli</i> isolado | 2,8 | 3,6 | 4,2 | 5,2 | 5,4 | 5,9 |
| <i>E. coli</i> ATCC + orégano | 2,8 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 2,5 |
| <i>E. coli</i> isolado + orégano | 2,8 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 2,4 |
| <i>E. coli</i> ATCC + cravo | 2,8 | 0 ^a | 0 ^a | 2,5 | 3,0 | 4,1 |
| <i>E. coli</i> isolado + cravo | 2,8 ^a | 0 ^b | 0 ^b | 2,7 ^a | 3,0 | 3,8 |

*Médias seguidas por letras distintas, minúscula nas linhas diferem entre si a 5% de significância.

O uso de óleo essencial de orégano inibiu as cepas de *E. coli* após 46 horas de armazenamento. Em estudo *in vitro*, Sagdiç et al. (2003) também puderam constatar que o extrato de orégano na concentração de 2% foi capaz de causar a eliminação total do inóculo de *E. coli* em até cinco dias de exposição.

Segundo Souza (2005), o potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano pode ser empregado como composto alternativo para a segurança microbiológica de alimentos. A detecção de considerável propriedade antimicrobiana deste óleo apresenta-se como um substituto aos aditivos químicos.

O óleo essencial de orégano possui grande quantidade de compostos fenólicos. Esta característica é a responsável pela sua intensa atividade antimicrobiana, visto que estes compostos são capazes de se dissolverem na membrana microbiana e, desta forma, penetram na célula onde pode interagir com mecanismos essenciais para o metabolismo microbiano (MARINO et al., 2001). A utilização de óleo essencial de orégano inibiu cepas de *E. coli* após 96 horas de armazenamento (Figura 2).

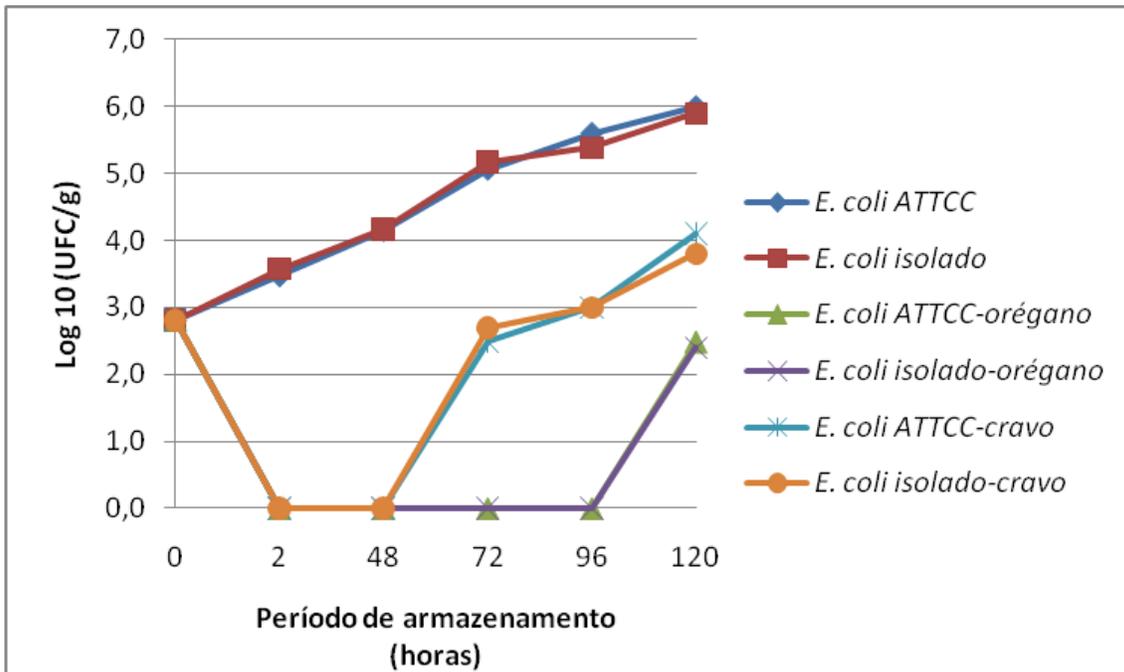


Figura 2: Valores médios de log (UFC/g) de cepas de *E. coli* inoculadas artificialmente ao vôngole durante o armazenamento.

Baseado na Tabela 3 e Figura 2 constata-se que as amostras contendo o óleo essencial de cravo apresentaram inibição total da atividade microbiana *E. coli* até 48 horas de armazenamento. Assim como, observa-se que as cepas de *E. coli* sem o óleo essencial apresentaram maior crescimento no período de armazenamento de 24 a 72 horas.

A presença do óleo essencial de cravo reduziu em até quatro ciclos logarítmicos, o crescimento microbiano (Tabela 3 e Figura 2) em 48 horas de armazenamento e o óleo essencial de orégano em até 5,6 ciclos logarítmicos em 96 horas de armazenamento. A Figura 2 permite visualizar o maior tempo de duração da fase Lag para as cepas de *E. coli*, contendo óleo essencial de orégano. A duração da fase Lag (ou latência) da curva de crescimento bacteriano é tomada como um indicador de tempo que uma dada bactéria desprende para que ocorra uma adaptação ao novo meio ao qual foi exposta (FRANCO et al., 2008). Desta forma quanto maior for a fase Lag, maior a dificuldade do micro-organismo de se adaptar ao novo meio, e assim, não estabelecer um comportamento de desenvolvimento exponencial (TRABULSI et al., 2002).

Harpaz et al. (2003) relatam que os óleos essenciais possuem uma melhor atividade frente às bactérias Gram positivas devido a uma maior incorporação dos aditivos na parede celular da bactéria. Baseado nesta afirmação constata-se que as cepas de *S. aureus* (Tabela 2 e Figura 1) foram mais suscetíveis a ação dos óleos de cravo e orégano que as cepas de *E. coli* (Tabela 2 e Figura 3), que são micro-organismos Gram-negativos até o quarto dia de armazenamento. Bussata (2006) afirma menor susceptibilidade das bactérias Gram-negativas aos óleos essenciais podendo estar relacionada com as dificuldades destes em difundir-se na membrana externa, ocasionado por uma barreira hidrofílica, que embora não seja totalmente impermeável, dificulta a passagem de macromoléculas e componentes hidrofóbicos.

3.2.3. Enumeração de *Salmonella* spp.

A ação bactericida dos óleos essenciais de orégano e cravo frente às cepas de *Salmonella* ATCC (Tabela 4) em todo o período de armazenamento pode ser atribuída à baixa concentração do inóculo (10^3 UFC/g) adicionado à matriz alimentícia em relação ao inóculo utilizado nos testes *in vitro* (10^8 UFC/g) para a determinação da concentração mínima inibitória.

Tabela 4: Valores médios de log (UFC/g) das cepas de *Salmonella* spp. inoculadas artificialmente ao vôngole durante o armazenamento.

| Micro-organismo | Período de armazenamento (horas) | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 0 | 2 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| <i>Salmonella</i> ATCC | 1,6 | 2,5 | 3,1 | 3,8 | 4,3 | 5,6 |
| <i>Salmonella</i> ATCC + orégano | 0,0 ^a | 0,0 ^a | 0,0 ^a | 0,0 ^a | 0,0 ^a | 0,0 ^a |
| <i>Salmonella</i> ATCC + cravo | 0,0 ^a | 0,0 ^a | 0,0 ^a | 0,0 ^a | 0,0 ^a | 0,0 ^a |

*Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas linhas, diferem entre si a 5% de significância.

As cepas de *Salmonella* spp. presentes no vôngole sem a adição de óleos essenciais obtiveram um desenvolvimento considerável durante o armazenamento sobre refrigeração (Figura 3).

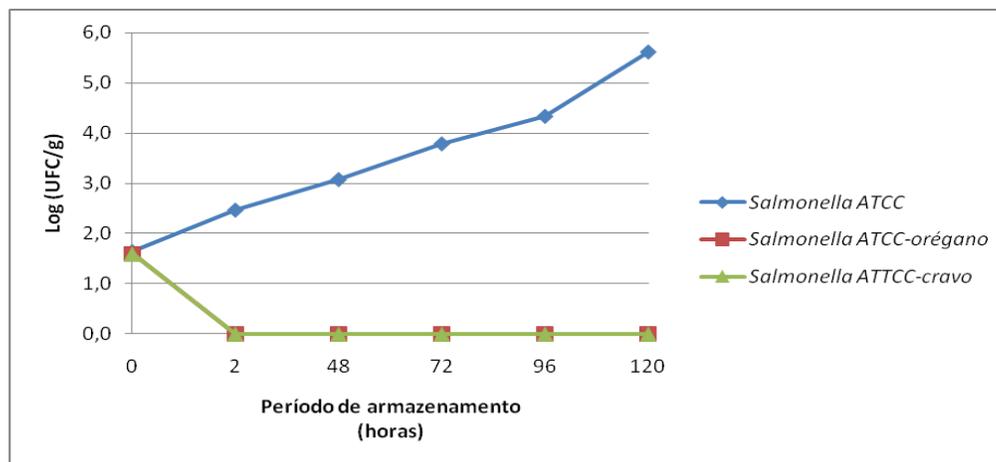


Figura 3: Valores médios de Log (UFC/g) das cepas de *Salmonella* spp. inoculadas artificialmente ao vôngole durante o armazenamento com diferentes óleos.

Os estudos de Magnani (2001) corroboram com os resultados encontrados neste trabalho, o referido autor avaliou o efeito do óleo de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) sobre *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* inoculados em salame tipo italiano na concentração de, aproximadamente, 10^3 a 10^4 UFC/g respectivamente, do produto. Após 20 dias de armazenamento do salame tipo italiano não foi possível detectar a presença de *Salmonella* spp. no produto adicionado de 0,2% de óleo essencial de cravo. A adição de 0,2% de óleo essencial de cravo no salame tipo italiano, nas condições experimentais usadas, não resultou em efeito inibidor adicional sobre *S. aureus* durante o período de armazenamento do produto.

4. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados mostraram que:

- A ação do óleo essencial de cravo sobre o vôngole artificialmente inoculado com cepas de *S. aureus* garantiu a inibição de micro-organismo, por no mínimo 96 horas, sob refrigeração.
- O óleo essencial de orégano foi efetivo sobre todas as cepas artificialmente inoculadas em vôngole por quatro dias de armazenamento, mantendo o produto em níveis microbiologicamente aceitáveis até o quinto dia de armazenamento.
- Os óleos essenciais de orégano e cravo foram eficazes na inibição de cepas de *Salmonella* spp., conservando o produto em níveis microbiologicamente aceitáveis por até 120 horas de armazenamento.
- A utilização dos óleos essenciais de cravo e orégano, como conservantes naturais para o vôngole, se apresentou como uma alternativa adicional para a conservação deste produto.

REFERÊNCIAS

BARROS, L.M.O. et al. Contaminante fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará. **Revista Ciência Agronômica**. s.l. v.36, n.3, p. 285-289, 2005.

BAYOMI, S. Bacteriostatic effect of some spices and their utilization in the manufacture of yoghurt. **Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel**. s.l. v.14, p. 21-26, 1992.

BEIRÃO, H. et al. Processamento e industrialização de moluscos. In: SEMINÁRIO E WORKSHOP TECNOLOGIAS PARA APROVEITAMENTO INTEGRAL DO PESCADO,1., 2000. Campinas. **Anais...** Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes, ITAL, 2000. p. 38-84.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 7-E, 10 jan. 2001.

BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana in vitro e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. 2006. 94 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim. 2006.

CHAO, S.C.; YOUNG, D.G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oils Research**. s.l. n.12, p. 630-649, 2000.

CORDEIRO, D. **Qualidade do mexilhão *Perna perna* submetido ao processo combinado de cocção, congelamento e armazenamento**. 2005. 82p. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005

CUNHA NETO, A.; SILVA, S.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de

Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.22, p.263-271. 2002

DANTAS, R.A. **Avaliação microbiológica e físico-química de vôngole (*anomalocardia Brasiliana*) e siri (família portunidae) embalados em diferentes atmosferas e armazenados sob refrigeração e congelamento**. 2009. 208p Dissertação de Mestrado do Programa de Ciência de Alimentos, Universidade Federal da Bahia. Salvador. 2009.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), FAOSTAT Agriculture Data. Disponível em: < <http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 10 abr. 2010.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FURLAN, E.F. **Vida útil dos mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos**. 2004. 106p. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004

GUIMARÃES, A.G. **Contaminação do molusco *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791), por *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, na região Norte da Baía de Todos os Santos**. 2002. 120p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2002.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology** v.124, p.91-97, 2008.

HARPAZ, S. *et al.* Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). **J Food Prot** , v. 66, n. 3, p. 410-7, Mar 2003.

KRUGER, M.F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. 2006. 74f. Dissertação (Pós-graduação em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J.; NYCHAS, G. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of oregano essential oil, thymol and carvacol. **Journal of Applied Microbiology**.v.91, n.453-462. 2001.

MAGNANI, A.L. **Efeito do cravo (*Syzygium aromaticum*) sobre *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* em salame tipo italiano.** 2001. 42p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2001.

MARINO, M. et. al., Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n.3, p. 187-195. 2001

MENDONÇA, A.T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *S. aureus* em ricota cremosa.** 72f. 2004. Tese (Pós-graduação em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras. Lavras. Minas Gerais. 2004.

PEREIRA, M.A. et al. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. n.37, v.159-163. 2006

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G., SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia.**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun., 2008.

PEREIRA, C. S.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) *in natura* e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, p.562-566, 2004.

PIRES, E.F.; SHINOHARA, N.K.S.; RÊGO, J.C., LIMA, S.C.; STAMFORD, T.L.M. Surtos de toxinfecções alimentares em unidades de alimentação e nutrição. **Higiene Alimentar**. v. 16: p. 20-24. 2002.

SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. **Lebensm.-Wiss. u.-Technolol.** v.36, p. 467-473, 2003.

SANTOS, J.C. **Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais sobre microorganismos patogênicos do vôngole (*Anomalocardia brasiliiana*) durante o armazenamento sob refrigeração.** Dissertação (Pós-graduação em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3ª ed. São Paulo: Livraria Varela. 536 p. 2007.

SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. **Int J Food Microbiology**, v. 79, n. 1-2, p. 35-45, Nov 2002.

SOUZA, E.; STAMFORD, T.; LIMA, E.; TRAJANO, V; Orégano (*Origanum vulgare* L., lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Higiene Alimentar** 132: 40-45, 2005.

TANGERINO, L.M.B. **Estudo das propriedades antimicrobianas de copolímeros derivados do eugenol**. 2006. 172f. Dissertação (Pós-graduação em Materiais para Engenharia) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá. Minas Gerais. 2006.

TRABULSI, L.R., et al. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**. v.8, p.508-513. 2002

VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Livraria Varela. 388p. 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de óleos essenciais de cravo e orégano se apresentou como uma ferramenta eficaz para a conservação de vôngole armazenado sob refrigeração.

Estudos futuros podem avaliar a influência destes óleos na aceitabilidade deste produto pelo consumidor.