



**Universidade Federal de Santa Catarina  
Programa de Pós-Graduação em**

**Ciência dos Alimentos**

**Eliete Auxiliadora Assumpção Ourives**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
DE CONDIMENTOS VEGETAIS (ERVAS  
AROMÁTICAS) EM MEIO DE CULTURA E  
PEITO DE FRANGO PICADO FRENTE A *P.*  
*fluorescens***

**Dissertação de Mestrado**

**FLORIANÓPOLIS-SC**

**1997**

**Eliete Auxiliadora Assumpção Ourives**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
CONDIMENTOS VEGETAIS (ERVAS AROMÁTICAS)  
EM MEIO DE CULTURA E PEITO DE FRANGO  
PICADO FRENTE A *P. fluorescens***

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Cleide Rosana Vieira Batista, PhD.**

**FLORIANÓPOLIS-SC**

**1997**

O93a Ourives, Eliete Auxiliadora Assumpção  
Avaliação da atividade antimicrobiana de condimentos vegetais (ervas aromáticas) em meio de cultura e peito de frango picado frente a *p. Fluorescens* / Eliete Auxiliadora Assumpção Ourives ; orientadora Cleide Rosana Vieira Batista. – Florianópolis, 1997. 180 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, 1997.

Inclui bibliografia

1. 1. *Pseudomonas fluorescens*. 2. Condimentos vegetais – Avaliação. 3. Ervas aromáticas. 4. Agentes antimicrobianos. 5. Carne de Frango.  
I. Batista, Cleide Rosana Vieira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

CDU:663/664

**Eliete Auxiliadora Assumpção Ourives**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
CONDIMENTOS VEGETAIS (ERVAS AROMÁTICAS)  
EM MEIO DE CULTURA E PEITO DE FRANGO  
PICADO FRENTE A *P. fluorescens***

Está dissertação foi julgada e aprovada para a  
obtenção do título de **Mestre em Ciência dos Alimentos**  
no **Programa de Pós-Graduação em Ciência dos alimentos**  
da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 27 de março de 1997

**Prof<sup>a</sup>. Eliane Moretto, Dr<sup>a</sup>.**  
Coordenadora do Programa

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Cleide Rosana Vieira  
Batista, PhD.**  
Orientadora

---

**Prof<sup>a</sup>. Bernadette Dora G.  
Franco, Dr<sup>a</sup>.**  
Membro externo

---

**Prof. Rubem Abreu Machado, Dr.**  
Membro

---

**Prof. Antônio José Simões  
Hamad, PhD**  
Suplente

**Dedico este trabalho**

A meu esposo Luiz Fernando  
Aos meus filhos Melissa, Attílio, Felipe e Luiz Fernando  
A minha mãe Jeovanil (em memória)  
e meu pai Attílio.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço acima de tudo a Deus, pois sem a presença dele nada vale a pena.

À orientadora prof<sup>a</sup>. Cleide Rosana Vieira Batista , pelo acompanhamento e dedicação.

À Universidade Federal de Santa Catarina em especial ao curso de Pós-Graduação em Ciência dos alimentos e todos os professores e funcionários do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES.

À Universidade Federal de Mato Grosso e Departamento de Ciência, TecnoLogia de Alimentos e Nutrição Básica.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

**Em especial,**

Ao amigo e irmão Walter, que compartilha comigo alegrias e tristezas.

Aos meus irmãos João Batista (em memória) e Attílio.

A todos os amigos e familiares que estimularam e acreditaram em mim.

**O que você não pode sentir caminha milhas à sua frente.  
O que você não entende você perde inteiramente.  
O que você não vê, sente, calcula ...  
Você pensa não ser verdade.**

**(Goethe)**

## RESUMO

OURIVES, Eliete A. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana de condimentos vegetais (ervas aromáticas) em meio de cultura e peito de frango picado frente a *P. fluorescens***. Florianópolis-SC, Brasil, 1997. Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 196 pg.

O presente trabalho foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, avaliaram-se os condimentos vegetais (ervas aromáticas) na forma de erva processada (ERV-PRO); de erva *in natura*, (ERV-IN); de óleo resina, proveniente da erva processada (OR-PRO); de óleo essencial, proveniente da erva *in natura* (OE-IN), de diferentes marcas e fornecedores, adquiridos no comércio de Florianópolis-SC. Esta avaliação se deu em relação a sua atividade antimicrobiana frente a uma população padronizada de aproximadamente  $10^6$  UFC/mL de *P. fluorescens* ATCC 13525, a uma concentração de 1% P/V, pela técnica de difusão em ágar, durante o período de 24 horas, na temperatura de 30° C, para uma avaliação preliminar. A atividade antimicrobiana foi avaliada também através da técnica do gradiente de concentração em placa a uma concentração de 1% na temperatura de 30° C e 25° C e através da técnica em caldo com contagem de células a uma concentração de 0.5%, na temperatura de 25° e 4° C, e, somente com o óleo essencial de açafraão, a uma concentração de 0.2%, na temperatura de 4° C, monitorados durante o período de sete dias. Na segunda etapa, avaliou-se o óleo essencial de açafraão a concentração de 0.2% através de uma simulação em peito de frango picado (PFP) em relação a uma população de *P. fluorescens* inoculada e à microbiota natural do frango, sob a temperatura de refrigeração, monitorado pelo período de sete dias. Houve variações no poder de inibição dos condimentos vegetais (ervas aromáticas) testados, relacionadas com a temperatura de incubação, tipo de erva e forma de erva. Em uma concentração de 1% de ERV-PRO, em ordem decrescente de inibição, alecrim > açafraão > orégano > sálvia > tomilho. E na forma de ERV-IN, açafraão > sálvia > orégano, nas duas temperaturas (25° C e 4° C), e alecrim com inibição limitada somente na temperatura de 25° C. Na forma de óleo resina, alecrim > orégano > tomilho > sálvia > açafraão, sendo o alecrim e o açafraão bactericidas e, os demais, bacteriostáticos. Na forma de óleo essencial, açafraão > sálvia > orégano, na temperatura de 30° C. E na temperatura de 25° C, com exceção do açafraão, que continuou predominante, ocorreu mudança na ordem de inibição ficando orégano > sálvia > alecrim, que demonstraram atividade nessa temperatura. O alho porró demonstrou não possuir atividade inibidora, tanto na forma de erva *in natura* como na forma de erva processada frente à bactéria em estudo, na temperatura utilizada. E o alecrim, na forma *in natura*, apenas na temperatura de 30° C, não exibiu atividade inibidora. A sálvia (IN e PRO), o orégano (IN e PRO) e o alecrim (IN) foram bacteriostáticos, e o alecrim (PRO), e o açafraão (PRO) foram bactericidas. O óleo essencial de açafraão na concentração de 0.2% em uma simulação com uma população padronizada de aproximadamente  $10^6$  UFC/g de *P. fluorescens* em carne de frango picada (PFP) proporcionou uma redução acima de 2 Log durante um período de 7 dias sob temperatura de refrigeração (4° C), contudo, mostrou-se inferior quando comparado com a inibição, sob as mesmas condições, obtida em caldo BHI que foi superior a 5 Log. O óleo essencial de açafraão testado sob as mesmas condições frente à microbiota natural do frango, que se mostrou resistente, exibiu uma redução limitada, apenas no dia zero e no dia um diferentemente da amostra a qual se inoculou *P. fluorescens*, que, num contexto geral, durante o período de sete dias, foi caracterizada como uma redução de 2 Log em relação à amostra controle.

## ABSTRACT

OURIVES, Eliete A. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana de condimentos vegetais (ervas aromáticas) em meio de cultura e peito de frango picado frente a *P. fluorescens***. Florianópolis-SC, Brasil, 1997. Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 196 pg.

This work was realized in two stages. On the first stage, it was evaluated the vegetable spices (aromatic herbs) in processed herb form (HER-PRO); *in natura* herb, (HER-IN); resin oil coming from processed herb (RO-PRO); essential oil, coming from *in natura* herb (EO-IN), from different trade mark and supplier, acquired in the market of Florianópolis-SC. This evaluation happened in relation to the antimicrobial activity in a standard population about  $10^6$  UFC/mL of *P. fluorescens* ATCC 13525, in 1% P/V concentration, through agar diffusion technique, for 24 hours, in 30° C temperature, for a preliminary evaluation. The antimicrobial activity was evaluated also through concentration gradient technique in plate with 1% concentration in 30° C and 25° C temperature and through technique in broth with cell counting in 0.5% concentration, 25° C and 4° C temperature, and, only with crocus essential oil, in 0.2% concentration, 4° C temperature, monitored for seven days. On the second stage, it was evaluated tumeric essential oil in 0.2% concentration level through a chopped chest chicken simulation (CCC) in relation to a *P. fluorescens* population inoculated and the chicken natural microbiote under refrigeration temperature monitored for seven days. There were inhibition power variations on tested vegetable spices (aromatic herbs) related with inoculation temperature, herb type and form. In 1% concentration level the HER-PRO in inhibition decreased order: rosemary > sage > tumeric > oregano > thyme. And on the HER-IN form: tumeric > sage > oregano on two temperatures (25° C and 4° C), and rosemary with unlimited inhibition only in 25° C temperature. On resin oil form: rosemary > oregano > thyme > sage > tumeric, being rosemary and tumeric bactericides and the others bacteriostatics. On essential oil form tumeric > sage > oregano in 30° C temperature. And, in 25° C temperature, except tumeric continued to be predominant, there was a inhibition order change for oregano > sage > rosemary that showed activity in this temperature. The leeks demonstrated not to have inhibited activity as *in natura* herb form as processed herb form on the studied bacteria in the used temperature. And, rosemary, *in natura* form, only in 30° C temperature did not show inhibited activity. The sage (IN and PRO), oregano (IN and PRO) and rosemary (IN) were bacteriostatics and rosemary (PRO), and tumeric (PRO) were bactericides. The tumeric essential oil on 0.2% concentration level in a simulation with standard population about  $10^6$  UFC/g of *P. fluorescens* on chopped chicken meat (CCC) caused a reduction above 2 Log. during 7 days under a refrigeration temperature (4° C), however, it showed inferior when compared with inhibition under the same conditions obtained in broth BHI that was superior to 5 Log. The tested tumeric essential oil under the same conditions on a chicken natural microbiote that was resistant showed limited reduction only on the zero and one day, differently from the sample which inoculated *P. fluorescens*, that, in general context, during seven days was characterized as 2 Log reduction in relation to sample control.

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 2.1. Esquema da estrutura da célula bacteriana	55
Figura 2.2. Crescimento e divisão bacteriana em diferentes meios	55
Figura 2.3. Esquema da estrutura de um mucopéptido	57
Figura 2.4. Esquema do processo de síntese da parede celular e local de ação dos antibióticos que nele interferem	58
Figura 2.5. Representação esquemática do desenvolvimento de um endosporo	60
Figura 2.6. Colônias de <i>Pseudomonas spp</i>	94
Figura 2.7. Colônias de <i>P. fluorescens</i> visualizadas em ágar nutritivo	94
Figura 2.8. Colônias de <i>P. fluorescens</i> visualizadas em ágar sangue	95
Figura 2.9. <i>Pseudomonas (alteromonas) putrefaciens</i>	104
Figura 3.1. Padronização da cultura estoque	115
Figura 3.2. Determinação do número de células viáveis da cultura estoque padronizada	116
Figura 3.3. Obtenção de ERV-IN e ERV-PRO sem extração	117
Figura 3.4. Extração de ERV-PRO utilizando aparelho de Soxhlet	118
Figura 3.5. Extração de ERV-IN pelo aparelho de Clevenger	120
Figura 3.6. Atividade antimicrobiana das formas de ervas sobre <i>P. fluorescens</i> : teste de difusão utilizando disco de papel	121
Figura 3.7. Atividade antimicrobiana das formas de ervas sobre <i>P. fluorescens</i> teste do gradiente de concentração	123
Figura 3.8. Atividade antimicrobiana das formas de ervas sobre <i>P. fluorescens</i> Crescimento em caldo com contagem de células	124
Figura 3.9. Aplicação do óleo essencial de açafraão em peito de frango picado	127
Figura 3.10. Contagem de células viáveis nos dias 0,1,3,5 e 7 de incubação	128
Figura 4.1. Rendimento de óleo resina obtido pelo aparelho de Soxhlet	131

Figura 4.2.- Rendimento de óleo essencial obtido pelo aparelho de clevenger	132
Figura 4.3. Efeito inibido de 1%r de ERV-PRO e ERV-IN (Alecrim) pela técnica do gradiente de concentração	135
Figura 4.4. Efeito inibido de 1%r de ERV-PRO e ERV-IN (Sálvia) pela técnica do gradiente de concentração	136
Figura 4.5. Efeito inibido de 1%r de ERV-PRO e ERV-IN (Açafrão) pela técnica do gradiente de concentração	136
Figura 4.6 Efeito inibido de 1%r de ERV-PRO e ERV-IN (Orégano) pela técnica do gradiente de concentração	137
Figura 4.7. Efeito inibidor de 1% de ERV-PRO e óleo resina (Alecrim) pela técnica do gradiente de concentração	139
Figura 4.8. Efeito inibidor de 1% de ERV-PRO e óleo resina (Orégano) pela técnica do gradiente de concentração	139
Figura 4.9. Efeito inibidor de 1% de ERV-PRO e óleo resina (Açafrão) pela técnica do gradiente de concentração	140
Figura 4.10. Efeito inibidor de 1% de ERV-PRO e óleo resina (Tomilho) pela técnica do gradiente de concentração	140
Figura 4.11. Efeito inibidor de 1% de ERV-PRO e óleo resina (Sálvia) pela técnica do gradiente de concentração	141
Figura 4.12. Efeito inibidor de 1% de ERV-IN e óleo essencial (Alecrim) pela técnica do gradiente de concentração	143
Figura 4.13. Efeito inibidor de 1% de ERV-IN e óleo essencial (Sálvia) pela técnica do gradiente de concentração	143
Figura 4.14. Efeito inibidor de 1% de ERV-IN e óleo essencial (Açafrão) pela técnica do gradiente de concentração	144
Figura 4.15. Efeito inibidor de 1% de ERV-IN e óleo essencial (Orégano) pela técnica do gradiente de concentração	144
Figura 4.16. Efeito inibidor de 0,2% de óleo essencial (Alecrim) pela técnica do gradiente de concentração	145
Figura 4.17. Efeito inibidor de 0,2% de óleo essencial (Açafrão) pela técnica do gradiente de concentração	145
Figura 4.18. Efeito inibidor de 0,2% de óleo essencial (Sálvia) pela técnica do gradiente de concentração	146

Figura 4.19. Efeito inibidor de 0,2% de óleo essencial (Orégano) pela técnica do gradiente de concentração	146
Figura 4.20. Efeito inibidor de 0,5% de óleo resina e ERV-PRO pela técnica de contagem de células em meio líquido (caldo) na temperatura	149
Figura 4.21. Efeito inibidor do óleo essencial de ERV-IN frente a <i>P. fluorescens</i> pela técnica de contagem de células em meio líquido	150
Figura 4.22. Ação do óleo essencial de açafirão a concentração de 0,2% , frente a microbiota psicotrófica e <i>P. fluorescens</i> inoculada em peito de frango	152
Figura 4.23. Ação do óleo essencial de Açafirão a concentração de 0,2%, em carne de frango e meio líquido (caldo)	152
Figura 5.1. Intensidade de inibição óleo resina de alecrim	153
Figura 5.2. Intensidade de inibição do óleo resina do açafirão	154
Figura 5.3. Intensidade de inibição óleo resina do alho porró	154
Figura 5.4. Intensidade de inibição do alecrim processado	155
Figura 5.5. Intensidade de inibição do açafirão processado	156
Figura 5.6. Intensidade de inibição do óleo essencial de açafirão	157
Figura 5.7. Intensidade de inibição da sálvia <i>in natura</i>	158
Figura 5.8. Intensidade de inibição do orégano <i>in natura</i>	158
Figura 5.9. Efeito inibidor do açafirão <i>in natura a temperatura</i> de 30°C	160
Figura 5.10. Efeito inibidor do orégano a temperatura de 30°C	161
Figura 5.11. Efeito inibidor do tomilho a temperatura de 30°C	162
Figura 5.12. Efeito inibidor do óleo essencial de açafirão a temperatura de 25°C	168
Figura 5.13. Efeito inibidor do óleo essencial de açafirão a temperatura de 30°C	168

## LISTA DE QUADROS

	PÁGINA
Quadro 2.1. Composição aproximada de alecrim	26
Quadro 2.2. Composição aproximada de cúrcuma	29
Quadro 2.3. Composição aproximada de orégano	31
Quadro 2.4. Composição aproximada da sálvia	34
Quadro 2.5. Composição aproximada do tomilho	36
Quadro 2.6. Sumário de estudos <i>in vitro</i> de atividade antimicrobiana de condimentos vegetais (ervas aromáticas) e seu extratos	37
Quadro 2.7. Estudos <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos vegetais (ervas aromáticas)	45
Quadro 2.8. Óleo essencial de condimentos vegetais (ervas aromáticas) com atividade antimicrobiana.	63
Quadro 2.9. Conteúdo aproximado de óleo essencial de alguns condimentos vegetais (ervas aromáticas)	64
Quadro 2.10. Sumário de estudos da inibição por condimentos vegetais (ervas aromáticas) realizados em alimentos	82
Quadro 2.11. Características gerais da espécie <i>Pseudomonas fluorescens</i> das biovares I,II,III,IV,V.	100
Quadro 2.12. Características da espécie de <i>Pseudomonas fluorescens</i> das biovares I,II,III,IV,V com valores para diagnóstico	101
Quadro 2.13. Compostos voláteis originados de microrganismos encontrados em carne	109

## LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 2.1. Composição aproximada e pH do arroz, frango, talharim e carne vermelha	83
Tabela 4.1. Faixa de transmitância correspondente a população de <i>P. fluorescens</i>	130
Tabela 4.2. Intensidade de inibição de ERV-PRO e óleo resina	131
Tabela 4.3. Intensidade de inibição de ERV-IN e óleo essencial	133
Tabela 4.4. Efeito inibidor entre as médias de ervas na forma <i>in natura</i> e processada em um gradiente de concentração	134
Tabela 4.5. Medida da concentração mínima de inibição (MIC) de erva <i>in natura</i>	135
Tabela 4.6. Medida da concentração mínima de inibição (MIC) de erva na forma processada	136
Tabela 4.7. Efeito inibidor entre as médias de ervas na forma processada e óleo resina em um gradiente de concentração	139
Tabela 4.8. Medida da concentração mínima de inibição (MIC) de erva na forma de óleo resina	139
Tabela 4.9. Efeito inibidor entre as médias de ervas na forma <i>in natura</i> e óleo essencial em um gradiente de concentração	143
Tabela 4.10. Medida da concentração mínima de inibição (MIC) de erva na forma de óleo essencial	143
Tabela 4.11. Porcentagem (%) de inibição de ERV-PRO	148
Tabela 4.12. Porcentagem (%) de inibição de ERV-IN	149
Tabela 4.13. Porcentagem (%) de inibição de óleo resina	149
Tabela 4.14. Porcentagem (%) de inibição de óleo essencial	151

## SUMÁRIO

	PÁGINA
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
2.1. Condimentos vegetais (ervas aromáticas)	17
2.1.1. Histórico	17
2.1.2. Definição	19
2.1.3. Classificação	21
2.1.4. Principais formas	21
2.1.5. Condimentos vegetais (ervas aromáticas) estudados	24
2.1.6. Atividade antimicrobiana de condimentos vegetais (ervas aromáticas) e seus extratos <i>in vitro</i>	36
2.1.7. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos vegetais (ervas aromáticas) <i>in vitro</i>	45
2.1.8. Atividade antimicrobiana de componentes de condimentos vegetais (ervas aromáticas) e seu modo de ação	53
2.1.8.1. Modo de ação de substâncias antimicrobianas	53
2.1.8.2. Ação de alguns antimicrobianos	60
2.1.8.3. Substâncias contidas nos óleos essenciais e modo de ação	62
2.1.9. Efeito da combinação de condimentos vegetais com processos térmicos e pH	68
2.1.10. Efeito da combinação de condimentos vegetais (ervas aromáticas) e outros antimicrobianos	72
2.1.11. Efeito de condimentos vegetais (ervas aromáticas) sobre a estimulação do metabolismo e esporo microbianos	76

2.1.12. Atividade antimicrobiana e antioxidante de condimentos vegetais (ervas aromáticas) em alimentos	81
2.2. Frango e carne de frango	87
2.2.1. Sinopse da evolução do processo de preservação de alimentos	87
2.2.2. Microbiota do frango e da carne do frango	88
2.2.2.1. Contaminação inicial	88
2.2.2.2. Alteração da carne de frango	89
2.2.3. Microrganismo de importância no frango estudado	92
2.2.3.1. Gênero <i>Pseudomonas</i>	92
2.2.3.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	93
2.2.4. Alteração provocada por <i>Pseudomonas spp</i> em alimentos	100
2.2.5. Alteração no sabor e aroma provocado por <i>Pseudomonas spp</i> em carnes estocadas	106
2.2.6. Comportamento de <i>P. fluorescens</i> junto a outros microrganismos em carnes de frango embaladas em uma atmosfera modificada	109
2.2.7. Comportamento de <i>Pseudomonas spp</i> e <i>P. fluorescens</i> frente aos antimicrobianos	111
<b>3. MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>114</b>
3.1. Material	114
3.1.1. Equipamentos e vidrarias	114
3.1.2. Meios de Cultura Solventes e outros	114
3.1.3. Microrganismo-teste	114
3.1.4. Ervas processadas e ervas <i>in natura</i>	114
3.2. Método	115

3.2.1. Coleta da amostra	115
3.2.2. Padronização da cultura estoque	115
3.2.3. Obtenção do extrato aquoso de ervas na forma processada e de ervas na forma in natura	115
3.2.4. Obtenção do Óleo resina	116
3.2.5. Obtenção do óleo essencial	119
3.2.6. Teste da difusão em placas utilizando disco de papel.	120
3.2.7. Teste do gradiente de concentração em placa	124
3.2.8. Teste da atividade antimicrobiana em caldo	125
3.2.9. Atividade antimicrobiana do óleo essencial em peito de frango picado.	127
3.2.10. Análise estatística dos dados	128
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>131</b>
4.1. Padronização do Inoculo	131
4.2. Teste de Difusão em Placas de Agar utilizando disco de papel	131
4.2.1. Erva Processada e Óleo resina	131
4.2.2. Erva <i>in natura</i> e Óleo essencial	133
4.3. Teste do Gradiente de Concentração em Placas em diferentes formas de ervas.	135
4.3.1. Ervas processadas e Ervas in natura	135
4.3.2. Óleo Resina	139
4.3.3. Óleo essencial	143
4.4. Teste de atividade antimicrobiana em meio caldo	149

4.4.1. Ervas processadas e in natura	149
4.4.2. Óleo Resina	150
4.4.3. Óleo essencial	151
4.5. Atividade antimicrobiana do óleo essencial em peito de frango picado.	153
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>155</b>
5.1. Avaliação do rendimento e atividade antimicrobiana de ervas através da técnica de difusão em placa.	155
5.2. Avaliação do efeito inibidor das formas de ervas pela técnica do gradiente de concentração em placa.	161
5.3. Avaliação da atividade inibidora através de contagem de células bacteriana em meio caldo	172
5.4. Avaliação da atividade inibidora do óleo essencial de açafraão em peito de frango picado	177
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>181</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>183</b>

# 1. INTRODUÇÃO

Em função das propriedades antimicrobianas e antioxidantes dos condimentos vegetais (ervas aromáticas), muitos trabalhos de pesquisa revisados neste estudo, demonstram que tanto as *ervas in natura* e processada, quanto o seu óleo resina e óleo essencial, extraídos ou seu constituinte isolado e identificado, tal como verificado nos trabalhos realizado por ABDU & ABDU-ZEID, 1972; INATANI, 1982, FARAG et al, 1989; podem exercer um importante papel na preservação dos alimentos, contribuindo, desta forma, na manutenção de sua qualidade afirma BAHK et al 1990 e AURELI et al, 1992.

A atividade antimicrobiana e antioxidante devem-se, em alguns casos à ação de uma só substância, dentre as várias substâncias que pode constituir os condimentos vegetais (ervas aromáticas) na forma *in natura*, processada, óleo resina e óleo essencial, e essa ação, também em determinados casos, é favorecida pelo sinergismo dos vários constituintes presentes na planta, apresentando, às vezes, maior eficácia quando comparadas a alguns anti-sépticos químicos, conforme é elucidado nos trabalhos de RAMASWAMY & BONERJEE, 1948; WU et al, 1982; COLLINS & CHARLES, (1987)

Nessa perspectiva, investigadores como SHELEF et al, 1980; FARBOARD et al 1976; DEANS & RTTCHIC, 1987; SALEEM & EL-DELAIMY, 1982; AURELI et al, 1992; EVERTING & DEIBEL 1992 , entre outros, estudaram a ação antimicrobiana de ervas, tais como: sálvia, alecrim, pimenta da Jamaica, contra microrganismos como: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas sp.* e *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria spp* e *Listeria monocytogenes*.

A contaminação de superfície de carnes, como as de frango, por microrganismos tem sido um grande problema quando as mesmas são estocadas em climas subtropicais ou quando estão sujeitas as condições de temperatura alta em áreas industriais, e que, conseqüentemente, chegam ao consumidor com uma vida de prateleira bem mais reduzida. Outro aspecto relevante são as carnes de aves mecanicamente desossadas em que ocorre estresse por ações física e química severas durante a operação de desossa, devido ao esforço da alta pressão e violento rompimento do tecido. E também o aproveitamento de sobras no qual se reúne uma mistura de várias peças da ave com diferentes características como o pH, propenso à ação química e microbiológica que adversamente afeta a vida de prateleira desses produtos (MAC NEIL et al 1973; GUERREIRO & TAYLOR, 1995).

Muitos trabalhos de pesquisa referem-se a respeito da problemática da estabilidade de estocagem de materiais em temperatura de refrigeração e congelamento, e ainda sobre a alta população microbiológica inicial em carnes desossadas mecanicamente e de produtos

oriundos de aproveitamento de sobras, evidenciando, como população predominante, os microrganismos psicrotróficos e psicotolerantes, como o grupo das bactérias *pseudomonas*.

Métodos inexansivos de redução do número da população microbiana vêm sendo realizados, tais como, descontaminação com sprays contendo cloro, o uso de polifosfatos, Hidroxianisol butilatado (BHA) e também o uso de extratos de ervas como alecrim, sálvia, tomilho, etc.

Considerando-se que as bactérias do gênero *Pseudomonas* fazem parte dos mais importantes microrganismos capazes de causar deterioração em alimentos e serem um grupo freqüentemente encontrado em aves, acrescido da necessidade de novas fontes alternativas de tecnologia visando à conservação e manutenção da qualidade de alimentos, este trabalho tem como objetivo geral estudar a eficiência dos condimentos vegetais (ervas aromáticas) frente a microbiota selecionada de frango, em particular, *P. fluorescens*, . Assim, propõe-se (1) avaliar a atividade antimicrobina dos condimentos vegetais (ervas aromáticas) na forma de erva processada (ERV-PRO); erva *in natura* (ERV-IN); óleo resina (OR-PRO) e óleo essencial (OE-IN) frente à *P. fluorescens* ATCC 13525 em diferentes temperaturas; (2) Selecionar dentre as ervas na forma de ERV-PRO; ERV-IN, OR e OE, em diferentes temperaturas em condições de laboratório, qual o melhor inibidor frente a *P. fluorescens*; (3) Testar o melhor inibidor selecionado no item (2) frente à microbiota natural do peito de frango picado (PFP) e frente a uma simulação em (PFP), com a inoculação de uma população padronizada de *P. fluorescens*; (4) Comparar o poder de inibição obtido em laboratório (caldo BHI) com o poder de inibição obtido em alimento (peito frango picado - PFP) quando uma população padronizada de *P. fluorescens* for inoculada.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Condimentos Vegetais (ervas aromáticas)**

#### **2.1.1. Histórico**

Os condimentos vegetais (ervas aromáticas) são conhecidos e utilizados pelos povos do Oriente desde os tempos imemoriais. Circulando entre regiões banhadas pelos Oceanos Índico e Pacífico e chegando à casa dos Imperadores e das famílias modestas, adquirindo estatuto de produtos indispensáveis à vida destes povos, quer por ligações a rituais, quer como tempero de alimentos destinado a quebrar os efeitos negativos no apetite de uma dieta monótona, geralmente à base de arroz cozido, como remédios (drogas) indicados pelos médicos e físicos do tempo para curar a maioria das doenças. (MENDES, 1993).

Pode-se dividir a história do uso dos condimentos vegetais (ervas aromáticas) pelo homem em quatro períodos: o da Antigüidade; outro das civilizações clássicas dos gregos e romanos; um terceiro da Idade média, que inclui as grandes explorações e o colonialismo; e o dos tempos modernos. (GIACOMETTI, 1989). Há quem defenda que a primeira utilização das ervas aromáticas nas margens do Mediterrâneo teria sido como perfume. Outros autores defendem a idéia de que a principal, e talvez a primeira utilização das ervas aromáticas no Ocidente, teria sido para embalsamar cadáveres (múmias), praticado pelos egípcios, através da elaboração de grandes quantidades de líquidos perfumados, anti-sépticos, gomas e diversas matérias de origem vegetal para serem adicionados aos cadáveres; entretanto, sem discutir prioridades, a utilização egípcia das ervas aromáticas veio a refletir-se mais tarde no aumento do seu consumo na Europa, quando elas passaram a ser utilizada para conservar as carnes ou para mascarar o cheiro que estas exibiam quando se iniciava um processo de putrefação. (ROSENGARTEN, 1969; MENDES, 1993, FARREL, 1995).

Com o tempo, o consumo foi alargando-se e as ervas aromáticas passaram também a ser utilizada como tempero e como conservante de carnes que passavam apenas pelas mãos e mesas dos ricos senhores das cortes, por causa dos elevados preços que atingiam. O seu valor era tão alto que possuir reservas de ervas aromáticas, nesse tempo, era tão importante como ter ouro, pagava-se em pimenta -

a mais famosa da época, e por isso se conhecem vários escritos de testamentos em que, especificadamente, deixam-se ficar a herdeiros determinados valores ou pesos destas preciosas mercadorias. (ROSENGARTEN,1969; GIACOMETTI, 1989; MENDES, 1993, FARREL, 1995).

O comércio das ervas aromáticas fez, nesses recuados tempos, a riqueza e opulência das cidades de Veneza e Gênova e dos seus mercadores que garantiam a sua distribuição na Europa e administrava as quantidades disponíveis de forma a não provocar um aviltamento dos preços. Os senhores feudais submetidos a invernos rigorosos e guerras intermináveis tinham uma alimentação pouco variada, baseada, sobretudo em carnes salgadas, e, assim, quando os mercadores de Veneza começaram a trazer para a Europa as ervas aromáticas ditas “especiarias do Oriente”, o sucesso foi imediato. Estas substâncias aromáticas, com esse poder de disfarçar o desagradável cheiro das carnes mal conservadas e melhorar o cheiro das iguarias em geral, tornaram-se indispensáveis na mesa dos senhores feudais. (ROSENGARTEN, 1969; GIACOMETTI, 1989; MENDES, 1993, FARREL, 1995)

De acordo com os mesmos autores anteriormente citados, as ervas aromáticas eram tão caras devido a uma boa razão, elas eram adquiridas na Índia por mercadores árabes, e levadas de camelo por uns 5.000 quilômetros até Suez, no Egito. Lá, compradas por mercadores venezianos, atravessavam o mar Mediterrâneo e percorriam o Adriático inteiro até Veneza, sendo que, só a partir daí, eram vendidas para os retalhistas alemães e italianos, que as faziam chegar aos castelos feudais. Constituíam um negócio tão rentável que animou várias gerações de aventureiros a procurarem um acesso direto à fonte, pelo oceano. Foram gastos quase 500 anos nessa procura, e o mérito coube a Vasco da Gama, que finalmente conseguiu chegar até a Índia pelo mar em 1499. Na busca deste caminho marítimo, em direção à Índia, na perspectiva de aquisição de ervas aromáticas, foram sendo descobertas as costas da África, os Açores, as ilhas de Cabo Verde, a América e, um ano depois do feito de Vasco da Gama, o Brasil.

Enfim, as ervas aromáticas foram importantes em todas as civilizações, juntas aos povos do Egito, Roma, Arábia, Grécia clássica e também aos povos do Brasil, trazidas pelo Português LUIZ DE ABREU SILVA, em fins do século XVII, com o plantio no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Essa importância nunca esmoreceu através dos séculos e, no final da década de setenta, a busca de agentes para substituir os nitritos despertou um renovado interesse tanto pelas especiarias como

pelos seus extratos e, em anos recentes, explodiu no mundo inteiro, sendo muito mais utilizadas tanto a nível industrial como doméstico em aromas para pizzas e molhos de tomates, em carnes e pescados, vermouths, aguardentes, licores, bebidas não alcoólicas, em bolos, doces e sorvetes, perfumes, sabonetes, etc. (BURCKARD, 1984; GIACOMETTI, 1989; OLIVEIRA 1992; MENDES, 1993).

### 2.1.2. Definição

A designação *especiaria* (ou *espécia*, como ainda hoje se diz em alguns locais do nosso País), provém de *Species, ei* (substância, mercadoria), nome que os antigos latinos davam aos arómatos e às drogas. Os franceses davam-lhe âmbito mais amplo e aplicavam este nome a produtos alimentares estimulantes do apetite ou a drogas medicinais de origem exótica. Não existe uma uniformidade de critérios quanto à aplicação do vocábulo *especiaria*, optando uns por um âmbito restrito e atribuindo-os apenas às especiarias orientais, seguindo outros uma definição mais lata e incluindo nela diversos produtos estimulantes do apetite que não têm qualquer relação com as características de especiarias orientais. (MENDES, 1993)

O 1º Congresso Internacional para a Repressão de Fraudes, reunido em Geneve em 1908, definiu as especiarias como “substâncias vegetais de origem, indígena ou exótica, aromática ou de sabor ardente, picante, empregadas para realçar o gosto dos alimentos ou adicionar, a estes, princípios estimulantes que fazem parte da sua constituição. A sua importância comercial varia muito de país para país e cada uma delas deve definir-se em particular.”

A American Spice Trade Association define as especiarias de uma forma mais global, considerando-as como “produtos vegetais desidratados utilizados fundamentalmente no tempero dos alimentos”, incluindo assim as especiarias no sentido clássico, as ervas e os vegetais desidratados de tempero como a cebola, o alho ou a salsa. Similarmente, a U. S. Food and Drug Administration (FDA) tem uma ampla definição para as especiarias - com uma importante exceção: eles excluem todos os vegetais desidratados, como o alho, cebola em pó, aipo em pó das especiarias listadas. De acordo com essa definição, a especiaria é “uma substância

vegetal aromática em pedaço, quebrada, picada, da forma que é usada primeiramente para dar sabor aos alimentos antes de contribuir nutricionalmente”.

BREITEN (1985), em trabalho preparado a pedido da Códex Alimentarius (FAO/OMS), definiu as especiarias como “produtos aromáticos de origem vegetal destinado a temperar, aromatizar ou modificar o aroma ou a cor dos alimentos e das bebidas.” Porém, segundo o HETAH (1978), os ramos tenros das plantas que se usam para temperar os alimentos (salsa, coentro, etc.) são classificados como ervas e todos os outros produtos retirados das plantas aromáticas e utilizados com o mesmo objetivo são chamados de especiarias, com algumas exceções, e condimentos são produtos destinados a temperar os alimentos, mas que são adicionados depois destes serem servidos.

A International Standard Organization (ISO), estabeleceu uma definição mais geral : reuniu no mesmo grupo as especiarias e os condimentos (ISO/DIS 676), definindo-os como “produtos vegetais naturais ou suas misturas, isentos de matérias estranhas, utilizados para dar sabor e aroma e para temperar os alimentos”, considerando que o termo é aplicável tanto aos produtos inteiros como depois de reduzidos a pó.

A Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação, 3ª revisão, 12/42 (ABIA, 1978), define “os condimentos ou temperos como produtos constituídos de uma ou de diversas substâncias sápidas, de origem natural, com ou sem valor nutritivo, empregados aos alimentos com o fim de modificar ou exaltar o seu sabor”.

Segundo o Instituto Adolfo Lutz (1986), “condimentos são produtos de origem vegetal que compreendem certas plantas ou parte delas, contendo substâncias aromáticas, sápidas, corantes, aperitivas, com ou sem valor alimentício, empregado com o fim de exaltar, melhorar ou modificar as propriedades organolépticas dos alimentos.”

### **2.1.3. Classificação**

Botanicamente, as ervas são procedentes de plantas muito diferentes que crescem em diversos solos e climas, podendo ser classificadas em: raízes, rizomas, talos, frutos, sementes, folhas, flores, caroço e baga (CRUZ, 1984). Porém, histologicamente e quimicamente são classificadas como muito heterogêneas (PARRY, 1979).

Uma vez que as especiarias apresentam características distintas e não se encontra um critério universalmente aceito para defini-las, utilizam-se diversos critérios para classificá-las, tais como: quanto à origem, quanto à parte utilizada e quanto aos princípios ativos. Quanto a sua origem, as especiarias são classificadas em: origem asiática - Sul da Índia e Ceilão (pimenta, cardamomo, canela de ceilão), Sul da China (canela da china), Arquipélago Malaio (noz moscada, gengibre, cúrcuma, cravo, maça ou maçais); Origem americana (América tropical) (baunilha, malagueta); Origem africana (Amomo); Origem europeia e da Ásia do Norte (coentro, cominho, mostarda). Quanto à parte utilizada, podemos classificá-las em: Órgãos subterrâneos (gengibre, cúrcuma); Tecidos corticais (canela de ceilão ou verdadeira, canela da china e outras ou falsas canelas); Botões florais (cravinho); Frutos completos (pimenta preta, malagueta, baunilha, cardamomo); Partes do fruto ou sementes (pimenta branca, noz moscada, maça, coentro, cominho). Quanto aos princípios ativos dominantes, podemos classificá-las em: Especiarias pungentes ou picantes (pimenta branca, pimenta preta, malagueta); Frutos aromáticos (noz moscada, maça, cardamomo); Cascas aromáticas (canela verdadeira, falsas canelas); Especiarias com alto teor de eugenol (cravinho, pimenta da caiena); Especiarias coradas (cúrcuma) (MENDES, 1993).

### **2.1.4. Principais formas de condimentos vegetais**

As ervas aromáticas existem em uma variada forma, e podem ser avaliadas como toda ou picada, ou como extrato - ex., óleo essencial e óleo resina. Extratos de ervas aromáticas são mais formulados para produzir produtos secundários, tal como essências, emulsões, ervas líquidas solúvel, ervas secas solúvel, ervas

encapsuladas, ervas quentes resistentes e ervas basicamente gordas; cada forma de erva aromática é preparada por diferentes métodos, e são feitos com o propósito único mais conveniente para uma aplicação particular ou outra; várias formas de ervas aromáticas estão descritas a seguir. (HEATH & REINECCIUS, 1986 apud DZIEZAK, 1989).

As ervas aromáticas inteiras, tais como pimenta da Jamaica e folhas de louro, fornecem sabor e aroma, bem como o efeito visual e textura, que não são obtidos como extratos. Geralmente, as ervas inteiras têm a estrutura celular intacta e a presença do antioxidante natural protege os importantes constituintes aromáticos de volatilização e oxidação. Entretanto, as ervas inteiras liberam o aroma mais devagar, também são de valor em outras aplicações. (DZIEZAK, 1989).

As ervas aromáticas trituradas são moídas a Grau de fineza requerido pelo processo do alimento. Comparadas às ervas aromáticas picadas, elas são incorporadas mais uniformemente dentro da mistura do alimento. Elas também liberam seu aroma mais facilmente porque o aroma contido nas células é rompido durante a moagem. Entretanto, apesar desses atributos, as ervas finas trituradas têm uma limitada vida de prateleira; elas estão sujeitas à oxidação, perda do aroma, e degradação sob estocagem. (DZIEZAK 1989). HEATH & REINECCIUS, 1986 recomendam que elas sejam estocadas não mais do que três meses em práticas de manufaturas. Em aplicações industriais, as ervas aromáticas trituradas são geralmente utilizadas para fornecer visual aparente e são freqüentemente complementadas com óleo essencial ou óleo resina. Os problemas com vida de prateleira e pouco aroma são minimizados em outras formas de triturar as ervas aromáticas, criomofilizando as ervas. MetodoLogia em que operações de moagem são conduzidas a - 100° F, oposto ao ambiente de moagem em 200° F, e envolve a alimentação de ervas inteiras e nitrogênio líquido simultaneamente dentro da zona de moagem. Ervas criomofilizadas têm retenção do aroma, gosto volátil e cor. (DZIEZAK , 1989).

Os extratos de ervas aromáticas servem como alternativa para ervas inteiras e trituradas e fornecem a estabilidade requerida no produto formulado. Óleos essenciais e óleos resinas são feitos por encomenda para produtos específicos apropriados que requerem para solubilizar e dispersar, o aroma, o gosto e a cor. Eles têm padrão para gosto, cor e atributos físicos e são Microbiologicamente estéreis. (PRAKASH, 1995; FARREL, 1995)

De acordo com PARSONS, 1984, os óleos essenciais são compostos aromáticos voláteis presentes em muitos condimentos vegetais (ervas aromáticas), e fornecem as características do gosto e aroma das ervas. Em algumas ervas, eles se formam unicamente como um resultado da reação enzimática natural ocorrida quando o tecido da planta é molhado e apertado por maceração. Eles são removidos de materiais da planta primeiramente por destilação a vapor, embora alguns possam ser pelo frio, destilação seca, ou destilação a vácuo. (FARREL, 1995).

O óleo essencial oferece um número de vantagens: eles não contribuem na cor do produto final, é usualmente uniforme na qualidade do gosto, e é livre de taninos e enzimas. Entretanto, ele freqüentemente fornece um perfil de gosto incompleto porque nele não está incluído o composto não volátil. Isto é bem notado no óleo essencial de gengibre e pimenta, que fornece mais gosto nessas ervas aromáticas, mas faltam a pungência contribuída pelos não voláteis, gingerol e piperina, respectivamente. Além disso, alguns óleos essenciais oxidam rapidamente devido às frações terpenos e sesquiterpenos, e é destruído o antioxidante natural presente nas ervas aromáticas. (DZIEZAK 1989).

Os óleos resinas são materiais viscosos extraídos de ervas aromáticas trituradas com solventes voláteis - fornecem um perfil mais completo de gosto que os óleos essenciais. Elas consistem de óleos essenciais, resinas orgânicas solúveis, e outros compostos não voláteis, tal como componentes quentes como a piperina em pimenta; fixativos, na semente de anis, antioxidante natural em alecrim e sálvia, e pigmentos na paprika e açafrão da terra. (DELINE, 1985). O mercado de óleo resina inclui numerosos produtos formulados para particular aplicação, exemplo: óleos resinas, que são especificamente para aplicações em cozimento, e mistura de óleo resina e óleo essencial, que é feita para completar mais e fornecer ao aroma e gosto característicos da erva natural (DZIEZAK 1989).

Derivado de óleo resina ou óleo essencial inclui líquidos solúveis, desidratados solúveis e óleos resinas encapsuladas. Líquidos solúveis, também chamados de temperos solubilizáveis, são mistura de óleo resina e óleo essencial, Polisorbato 80 e goma. Eles são avaliados em óleos solúveis ou na forma dispersa em água, e são freqüentemente usados em sorvetes, massa de biscoito, salmoura de pickles, sopas enlatadas, salsichas e bebidas. Desidratados solúveis, algumas vezes chamados de dispersas ou laminadas ervas aromáticas - é o óleo resina que são laminadas sobre uma desidratação carregada tal como xarope de milho sólido, dextrose e sal. (HEATH

& REINECCIUS, 1986). Os desidratados solúveis são utilizados para dar gosto em carnes processadas e mistura de bolo. Os óleos resinas encapsulados são preparados por secagem em emulsão de água e amido posteriormente colocados em câmaras quentes, sendo que a água vaporiza por gotejamento em vaporizador, como o amido envolve a partícula óleo resina. Os óleos resinas encapsulados são largamente utilizados em alimentos secos, que são preparados por reconstituição com água.

### 2.1.5. Condimentos vegetais estudados

#### **ALECRIM**

*Rosmarinus officinalis L.*

**Família : Labiatae**

#### **Generalidades:**

Alecrim é pequenos arbustos vivazes, perenes, verdes, nativos de muitas cidades européias com margem no mar mediterrâneo (FARREL, 1995). É freqüentemente encontradas próximas a áreas costeiras bem expostas ao sol e arejadas, com solos secos, arenosos e até pedregosos, precisando de proteção no inverno e prosperando bem em climas frescos (PRAKASH, 1995; MARANCA, 1992). Complementando, PRAKASH (1995) menciona que o forte aroma das folhas do alecrim está associado com o tipo de clima quando em crescimento. Atualmente é cultivado comercialmente na Algéria, França, Espanha, Portugal, Iugoslávia, Alemanha, Itália, Marrocos, România, Rússia, Tumsia, Turquia, Norte da África, e em pouca produção nos Estados Unidos. (FARREL, 1995; PRAKASH, 1995).

O alecrim possui numerosas folhas opostas, pequenas e persistentes, coriáceas, lineares, estreitas, sésseis, espessas; de coloração verde do lado de fora e branca acinzentada na página inferior, com as margens enroladas para o lado de baixo e comprimento de aproximadamente 6 a 25 mm, podendo ser até 4 ou 5 vezes maior em certas variedades e condições de vegetação. Seu sabor é fortemente resinosos, amargos, parecidos com cânfora, especialmente quando a planta cresceu em ambiente árido. (PARRY, 1969; PRASKASH, 1995; FARREL, 1995; MARANKA,

1992; GIACOMETTI, 1989). Possui caule lignificado, ereto e ramificado, que pode alcançar altura de até dois metros, porém, quando cultivado, possui porte menor, aproximadamente de 60 cm. Floresce em grupo no final do ramo, e o perfume é intenso, combinando aroma e gosto das folhas, do caule e das flores. As flores têm cor, azul-claro e seu comprimento é de aproximadamente 12 mm, juntadas em racemos curtos, axilares ou terminais, o fruto consta de quatro aquênios. (PRASKA, 1995; MARANKA, 1992; GIACOMETTI, 1989; FARREL, 1995).

De acordo com MARANKA (1992), para cultivo, o alecrim prefere ambiente seco e ensolarado, nunca úmido ou frio, terreno bem drenado e solto, ou bem arado e revolvido, preferivelmente com o pH alto, com bom conteúdo em calcário. A multiplicação pode ser feita por sementes, em canteiro, desbastando a planta quando atingir 15 cm de altura; com idade de dois anos, as mudas são transplantadas para lugar definitivo; usa-se também multiplicação do alecrim através de estacas ou brotos enraizados, destacando-as da planta mãe nos meses secos. Neste caso o transplante é feito em viveiro com irrigação, retiradas para plantio definitivo também após dois anos de idade. A colheita é feita quando a planta atinge um metro de altura. Segundo PRASKA (1990), quando as folhas são destinadas à culinária, faz-se necessário à secagem logo após a colheita, para evitar a perda de óleo essencial, pois sendo secas cuidadosamente em lugar escuro, arejado, bem ventilado, as folhas retêm a cor verde clara. São frescas, com gosto e aroma amargo-doce.

O rendimento do óleo essencial das folhas é acima de 2% com um odor característico de cânfora. Quimicamente, os constituintes do óleo são 16-20% borneol, 27-30% cineol, 10% cânfor, 2-7% acetato de bornil e baixas porcentagens de  $\alpha$ -pineno, canfeno, terpineol e verbenone. O borneol é responsável pela pungência, odor canforado e gosto amargo; o cineoleno pelo frescor, semelhante a eucalipto; o  $\alpha$ -pineno é responsável pela queimadura, semelhante ao pinho; o cânfor contribui com um frescor, penetrante, semelhante à menta; e o acetato de bornil pelo frescor doce, suave, semelhante a pinho. Os óleos resinas são semisólidas com uma coloração marrom esverdeada, contendo 10 - 15mL de óleo volátil por 100g. Geralmente, 2,5kg de óleo resina são equivalentes a 45,45kg de folhas de alecrim frescas ou secas. De acordo com os padrões internacionais (U.S.), o produto não pode conter mais do que 9% de cinzas totais, 1% de ácido insolúvel e 9% de mistura, e não pode ter menos que 1mL de óleo volátil por 100g. A composição

aproximada de alecrim encontra-se sumariada no quadro 2.1 (FARREL, 1995; PRAKSH, 1995).

Água	9,3 g
Calorias	331 kcal
Proteína	4,9 g
Lipídios	15,2 kg
Carboidratos totais	64,1 g
Fibras	17,7 kg
Cinzas	6,5 g
Cálcio	1280 mg
Íon	29 mg
Magnésio	220 mg
Fósforo	70 mg
Potássio	955 mg
Sódio	50 mg
Zinco	3 mg
Niacina	1 mg
Ácido ascórbico	61 mg
Vitamina A	3128 IU
Outras vitaminas	insignificante

Quadro 2.1. Composição aproximada de alecrim (100g, porção comestível)

Fonte : FARREL, 1995; PRAKSH, 1995.

## **AÇAFRÃO DA ÍNDIA**

*Cúrcuma Longa L.*

**Família : Zingiberaceae**

### **Generalidades:**

Cúrcuma é uma monocotiledônea pertencente à família das Zingiberáceas, como o gengibre, originária de uma vasta área do Sueste asiático de contornos mal definidos. Alguns autores consideram que ainda não foram encontradas formas selvagens desta planta, outros aceitam que esta espécie seja um triplóide da Cúrcuma aromática Salisb, que seria originária da Índia desde o Leste dos Himalaias até ao Sri-Lanka, ponto de vista que está longe de ser unanimemente aceito. O sistema repetido de propagação vegetativa através de pedaços de rizoma fez esquecer que a planta produz, em certos casos, sementes viáveis, desde que se façam germinar em condições muito favoráveis. (MENDES, 1993; FARREL, 1995).

A cúrcuma é uma planta rizomatosa vivaz que, em cultura, se conduz como anual e tem como órgãos mais valorizados os rizomas onde se encontra a matéria corante já referida e eles próprios constituem a especiaria, depois de secos, ou

depois de secos ou moídos. Os rizomas são de dois tipos distintos quanto à forma: o primeiro é chamado cúrcuma redonda - os rizomas primários ou principais, que ocupam a parte central da planta e ficam logo abaixo do local onde se dá a emissão das folhas, são arredondados ou ovóides com cerca de 5 cm de comprimento e 2,5cm de diâmetro máximo e deles saem em número variável; o outro chamado cúrcuma longa, são rizomas mais alongados, cilíndricos, ligeiramente arqueados, que depois se ramificam em porções de segunda ou terceira ordem, se o tempo permitir, formando no seu conjunto uma massa que se alonga na terra num círculo centrado nas folhas. (MENDES, 1993; FARREL, 1995).

Os rizomas, tanto os arredondados como os alongados, são resinosos, granulados, de coloração alaranjada ou vermelha, finamente estriados longitudinalmente à superfície, com anéis transversais salientes, mais ou menos próximos uns dos outros, conforme o crescimento do rizoma, e os rizomas arredondados têm uma coloração castanha escura e os rizomas alongados são normalmente esverdeados, porém os dois exalam um cheiro forte característico depois de cortados e têm um sabor quente bem próximo do gengibre. Dos rizomas saem raízes cilíndricas que se ramificam várias vezes formando um enredado muito denso nas camadas do terreno próximas da superfície, e das partes rizomatosas saem rebentos aéreos que chegam a atingir mais de 1m de altura e cada um desses rebentos chega a ter dezenas de folhas. (MENDES, 1993).

As folhas têm uma longa bainha que envolve o rebento, e as bainhas das folhas interiores terminam por uma lígula que também, abraça em parte, o rebento. O limbo é lanceolado, acuminado no extremo, de enervação transversal muito marcada, tem cor, verde-escuro, e a zona da bainha próxima da lígula apresenta margens ciliadas. A inflorescência, quando se forma, aparece na extremidade dos rebentos aéreos a que se fez referência, emerge na extremidade, mas o escapo fica, na base, envolvido pelas bainhas das folhas. As flores estão reunidas em espigas sub-cilíndricas e surgem em grupos de duas inseridas na axila da mesma bráctea elíptico-lanceolada e acuminada. As flores desabrocham todas praticamente ao mesmo tempo e dura muito pouco. O cálice é curto e irregularmente dentado e a corola é tubular na base abrindo depois para as partes superiores, separando-se em três peças de tamanhos diferentes e mostrando uma forma irregular. Têm dois estaminódios laterais brancos ou cremes. Os estames são curtos, o ovário é ínfero e trioculor. Os frutos são raros ou nunca aparecem. (MENDES, 1993).

A cúrcuma é uma planta de pleno sol, isto é, a cultura não deve ser feita com sombra, e de preferência, não cultivá-la consorciada com outras culturas que lhe façam sombra. Possui uma grande necessidade de água. Em contrapartida, o seu sistema rizomatoso facilita-lhe resistir, com certo sucesso, a períodos longos de carência de água, porém com reflexos no crescimento e na produção de rizomas, já que em uma situação desse tipo a planta pode até perder a parte aérea e viver durante muito tempo à custa da água contida nos rizomas, que, dessa forma, deixam de se formar, crescer e contraem-se por efeito da perda da água. Os terrenos destinados à cultura da cúrcuma devem ser leves e com uma elevada percentagem de matéria orgânica. (MENDES, 1993).

Em relação à cultura, o processo geralmente utilizado é o da propagação vegetativa, recorrendo a pedaços de rizoma com uma ou duas gemas. Para proceder-se à multiplicação, partem-se os rizomas em pedaços contendo as duas gemas e sob esta forma se plantam, enterrando os rizomas em terrenos previamente preparados, com cerca de 5 a 10 cm de profundidade, de tal forma que as plantas que venham a surgir fiquem a um passo de 1m ou de 1,20m. As plantas começam a emergir a superfície do solo após uma a duas semanas. Depois de cinco a seis meses, ela começa a formar os rizomas e cerca de 10 meses após a plantação, as folhas e outras partes aéreas da planta começam a amarelar e secar, fase em que os rizomas já podem ser colhidos. (MENDES, 1993).

A cúrcuma apresenta 5% de óleo essencial, que consiste principalmente de turmerone, ácidos livres, borneol, cineol, felandrene, curcumina e zingerone, possui coloração amarela-alaranjada e um forte aroma. É utilizado, geralmente, como produto de descoloração no processo de manufatura de óleos resinas. O seu odor é de terra, irritante, quente, oriental, e o seu gosto amargo, pungente, aromático e de terra. O óleo resina da cúrcuma tem uma coloração marrom-avermelhada, líquido pesado, com valores de cor de  $14 \pm 1\%$ . Geralmente 3,86 kg de óleo resina de cúrcuma é equivalente a 45,45kg de cúrcuma picada fresca. De acordo com os padrões internacionais (U.S.), pelo menos 95% do produto triturado não devem conter não mais que 8% de cinzas totais, 0,5% de ácidos insolúveis, 9,5% de fibras e 10% de mistura, 3,5mL de óleos voláteis por 100g e apresenta entre 5 e 6% de curcumina. A composição aproximada de cúrcuma encontra-se sumariada no quadro 2.2. (FARREL, 1995).

Água	11,4 g
Calorias	1480 kcal
Proteína	7,8 g
Lipídios	9,9 g
Carboidratos totais	64,9 g
Fibras	6,7 g
Cinzas	6,0 g
Cálcio	182 mg
Íon	41 mg
Magnésio	193 mg
Fósforo	268 mg
Potássio	2525 mg
Sódio	38 mg
Zinco	4 mg
Ácido ascórbico	26 mg
Niacina	5 mg
outras vitaminas	insignificantes

Quadro 2.2. Composição aproximada de cúrcuma (100g, porção comestível)

Fonte : FARREL, 1995.

## ORÉGANO

*Origanum vulgare L.* ou *Origanum spp*

**Família : Labiatae**

### Generalidades

O orégano é originário da bacia do Mediterrâneo, particularmente da Grécia, Itália e Espanha, vegeta espontaneamente em toda a Europa. Planta de pequeno porte cresce ao máximo à altura de setenta centímetros, desenvolve caule curto lenhoso, muito ramificado; a haste lateral deita-se sobre o solo e emitem raízes fazendo com que a planta se alastre sobre o terreno. As hastes são anuais, se não forem colhidas, secam. As folhas pequenas medindo um centímetro de comprimento são pilosas nas duas faces e de cor verde-acinzentada. As flores em pequenos racemos terminais são de cor rosada com manchas roxas. A cor da erva seca é pálida, verde acinzentada, com um aroma forte, aromático, canforado e gosto pungente, levemente amargo. (GIACOMETTI,1989; MARANCA, 1992; FARREL, 1995; PRAKACH, 1995).

De acordo com GIACOMETTI, 1989; MARANCA, 1992, mencionam que não se deve confundir o orégano com a manjerona, que pertence à outra espécie, apesar de possuírem características botânicas semelhantes. A manjerona *Origanum majorana L.*, conhecida em inglês como *sweet marjoram*, é de sabor mais suave que

o orégano, pois seus princípios ativos são distintos e é uma planta anual de porte menor do que o orégano, sempre propagada por sementes. No Brasil, sobretudo no sul, denomina-se o orégano de manjerona. Existe uma outra espécie, a *O. onites* L., conhecida em inglês como *pot marjoram*, que é uma planta ornamental cultivada em vaso e de porte menor do que as descritas acima, nativas da região oriental da bacia do Mediterrâneo.

Tanto o orégano quanto a manjerona são propagados por sementes, porém o orégano é facilmente multiplicado por meio de mudas enraizadas das touceiras. Ambos exigem bom solo e bastante calor e a melhor qualidade nas folhas consegue-se em invernos secos e ensolarados, livres de geadas. O orégano é plantado em linha no centro de canteiros estreitos de 60 centímetros de largura, com um sulco de irrigação entre dois canteiros para irrigação por infiltração. A distância entre mudas é de 50 centímetros, pois o orégano se alastra sobre todo o canteiro. Cada dois anos as plantas são reformadas com poda rigorosa e adubação com esterco bem curtido. Uma plantação é produtiva durante cinco anos, quando é replantada. A manjerona é plantada em linhas ou em sementeiras com transplantação das mudinhas. O corte é feito em ramos com uns 20 e 30 cm de comprimento e preferivelmente sem brotação terminal, porque as folhas muito novas tornam-se negras, o que deprecia o produto. (GIACOMETTI, 1989; MARANCA, 1992; FARREL, 1995; PRAKACH, 1995).

A planta contém óleo volátil, óleo fixo, proteínas e minerais, e o óleo volátil contribui muito no gosto do orégano. Em alguns óleos de orégano, o timol é o principal ingrediente que proporciona o aroma e gosto, e em outros o carvacrol é predominante. O orégano é freqüentemente confundido com variedades de tomilho, entretanto facilmente distinguível do último, que tem um alto conteúdo fenólico, na maior parte carvacrol. Essa parcial confusão existe porque muitas outras variedades de orégano contêm variada percentagem de timol. Quimicamente o orégano contém acima de 50% de timol, 7-8%  $\alpha$ -pineno, cineol, acetato de linalil, linalol, dipentene, *p*-cimene e  $\beta$ -cariofileno. O óleo resina do orégano possui coloração marrom esverdeada, é semi-sólido e líquido viscoso com um conteúdo de 17-20mL de óleo volátil em 100g. Geralmente 1,74kg de óleo resina equivalem a 45,45kg de orégano fresco triturado e orégano seco. De acordo com os padrões internacionais (U.S.) o orégano não pode conter mais do que 9,5% cinzas totais, 2,0% de ácidos insolúveis, 11% de mistura, e não menos do que 2mL de óleos voláteis pôr 100g. A composição

aproximada de orégano encontra-se sumariada no quadro 2.3. (FARREL, 1995; PRAKSH, 1995).

Água	7,2 g
Calorias	306 kcal
Proteína	11 g
Lipídios	10,3 g
Carboidratos totais	64,4 g
Fibras	15,0 g
Cinzas	7,2 g
Cálcio	1576 mg
Íon	44 mg
Magnésio	270 mg
Fósforo	200 mg
Potássio	1669 mg
Sódio	15 mg
Zinco	4 mg
Vitamina A	6903 IU
Niacina	6 mg
outras vitaminas	insignificantes

Quadro 2.3. Composição aproximada de orégano (100g, porção comestível)

Fonte : FARREL, 1995; PRAKSH, 1995.

## **ALHO PORRÓ**

*Allium Porrum L.*

**Família : Liliaceae**

### **Generalidades**

O alho pórro é conhecido no Egito desde os tempos de Moisés e dos Faraós. Nos dias de hoje os alhos pórros são derivados do alho selvagem, que cresceram por toda Europa, norte da África, Oriente e Grã Bretanha, e que são ainda recentes no comércio destes e dos Estados Unidos. Existem muitas diferentes variedades: pequena, gigante, magra e expeça. O alho porró tornou-se popular, nos Estados Unidos somente dentro desta última década. (FARREL, 1995).

O alho porró é um resistente bianual, com um espesso bulbo, base branca e um grupo de folhas envolvidas e apertadas que crescem a uma altura de 75 cm e uma espessura acima de 5 cm. Seu aroma é muito semelhante a outras espécies de alho, mas, o gosto é mais delicado. Tem um porte de caule longo, um cordão de numerosas flores rosa. (FARREL, 1995).

O rendimento de óleo de alho porró é muito baixo, e não excede de 0,02%. SCHREYEN et al (1976), citado por FARREL, 1995, identificaram 16 componentes

do óleo por destilação a vapor e concluíram que profanotiol, alil, metil, sulfido, metil propil sulfido, dipropil disulfido, e metil propil trissulfido são primariamente responsáveis pela distinção do odor semelhante de alho porró, depois da existência ativa por enzimas alin, metilalin e cicloalin.

De acordo com as normas internacionais (U. S.) para especificações de alho porró desidratado, requer que o produto contenha não mais que 3% e não menos que 1% de mistura. Uma porção de alho porró desidratado equivale a 13 porções de alho porró fresco. Nos Estados Unidos e Europa é considerado e, primeiramente utilizado, como um vegetal, mas quando desidratados se torna um importante condimento em sopas, salsichas, carnes, etc. (FARREL, 1995)

## **SÁLVIA**

*Sálvia offinalis L.*

**Família : Labiatae**

### **Generalidades**

A sálvia é originária de regiões secas e pedregosas do sul da Europa, e é encontrada em estado silvestre nas colinas da Dalmática, na Itália e na Iugoslávia. É um arbusto de pequeno porte, cresce no máximo até os 30 centímetros, com caule lenhoso e duro e ramos flexíveis anuais, de cor acinzentada e aspecto aveludado. As flores são roxas ou azuis, e existem muitas variedades que possuem folhas arroxeadas. A propagação da sálvia se faz por sementes ou por estacas, com uns 15 centímetros de comprimento, postas a enraizar em areia lavada. A semeadura ou o plantio das mudas é feito em linhas distantes uns 60 centímetros e as mudas são espaçadas com 30 centímetros entre si na linha. Um quilo de sementes pode produzir de 10 a 15 mil mudas, suficientes para meio hectare. A sálvia prefere solos férteis, bem drenados e de pH em torno de 6,5. (GIACOMETTI,1989; MARANCA, 1992; FARREL, 1995; PRAKACH, 1995).

A colheita dos ramos inicia-se antes da floração e cerca de um ano após o plantio cortam-se os ramos com 15 a 25 centímetros de comprimento. A colheita é realizada a cada seis meses, desde que os ramos estejam em condições de corte. Para destilação se aconselha colher na inflorescência com flores completamente abertas, pois dessa forma o rendimento é maior em quantidade e em qualidade,

especialmente se o cultivo foi realizado em solos um pouco áridos e em pleno sol. (GIACOMETTI,1989; MARANCA, 1992).

A sálvia, como condimento vem sendo substituído pelo orégano e nunca foi muito usada no Brasil, apesar da influência da cozinha europeia sobre a comida brasileira. As folhas secas são muito aromáticas e são muito utilizadas em salsichas, carne de porco e frango, indústrias de enlatados de carne, principalmente na Europa e nos Estados Unidos. E as folhas frescas são utilizadas para aromatizar saladas, pickles, queijos e carnes de carneiros, cabrito, coelho e pato, emprega-se também em sopas de tomate, lentilha e macarrão, como também em combinação com alecrim e tomilho em molhos. (GIACOMETTI,1989)

O óleo essencial, devido às características do gosto e do aroma, é produzido por destilação a vapor das folhas colhidas frescas. O rendimento é acima de 2,5%, embora se possa encontrar um rendimento menor, pois irá depender das condições climáticas de crescimento, colheita e local de origem. A cor é amarela pálida, e o odor é fortemente, aromáticos, doces, frescos e quentes, canforado, eucalipto, e muito persistente, com um aroma e gosto ardentes. Quimicamente, o óleo contém 40 a 60% tujone, 15% cineol, acima de 16% de borneol, acima de 4% esterres de bornil,  $\alpha$ -pineno, salveno e *d*-camfor. O óleo da sálvia, procedente da Grécia, tem um aroma de eucalipto, enquanto o óleo da sálvia inglesa tem um odor com características da cânfora. E a sálvia espanhola possui um aroma que está entre o odor característico da sálvia inglesa e da grega. O óleo resina da sálvia é de coloração verde amarronsada e apresenta líquido expeço e consistente, contém óleo volátil de 25 a 30 mL por 100g. 3,4 kg de óleo resina é equivalente a 45,45kg de sálvia fresca picada. Segundo as normas internacionais (U.S.), a sálvia não pode conter mais que 10% de cinzas totais, 1% ácido insolúvel e não mais que 10% de mistura e não pode conter abaixo de 1,5mL de óleo volátil por 100g. A composição aproximada de sálvia encontra-se sumariada no quadro 2.4. (FARREL, 1995; PRAKSH, 1995).

Água	8,0 g
Calorias	315 kcal
Proteína	10,6 g
Lipídios	12,7 g
Carboidratos totais	60,7 g
Fibras	18,1 g
Cinzas	8,0 g
Cálcio	1652 mg

Íon	28 mg
Magnésio	428 mg
Fósforo	91 mg
Potássio	1070 mg
Sódio	11 mg
Zinco	5 mg
Vitamina A	5900 IU
Ácido ascórbico	32 mg
Niacina	6 mg
outras vitaminas	insignificantes

Quadro 2.4. Composição aproximada de orégano  
(100g, porção comestível)

Fonte : FARREL, 1995; PRAKSH, 1995.

## **TOMILHO**

*Thymus vulgaris* L.

**Família : Labiatae**

### **Generalidades**

O tomilho é um pequeno arbusto silvestre das montanhas do oeste da região do Mediterrâneo. O gênero *thymus* é botanicamente bastante complicado, com 66 espécies nativas da Europa, das quais 35 são de interesse comercial, todas com sabores e aromas diferentes. O tomilho é um arbusto compacto que cresce no máximo 25 centímetros de comprimento, de hastes eretas, duras e um pouco lignificadas, coberta de pêlos brancos, com numerosas folhas pequenas, com menos de 1 cm, cesso, de forma oval e coloração verde-escuro, de margens reflexas, algo aveludadas na face inferior. As flores são brancas, lilás ou levemente purpúreas, são dispostas em rodinhas compactas na parte apical dos muitos ramos que formam a moita e constituem pequenas espigas ralas, destacando-se sobre o verde-cinzento das folhas, os frutos são pequenos e duros, ovais, lisos. (GIACOMETTI,1989; MARANCA, 1992; FARREL, 1995; PRAKACH, 1995).

Cresce melhor a pleno sol e prefere solos pouco ácidos, e podem ser plantadas a partir de sementes colocadas em sementeiras, estacas semilenhosas ou seções enraizadas da planta. O plantio é feito com o espaçamento de 90 centímetros, e dentro da linha adotam-se 30 centímetros. Renovam-se os plantios a cada três anos, pois, com a idade, as plantas tornam-se lenhosas com menos produção de folhas. A colheita se faz quando se inicia a floração, geralmente de setembro a outubro no Brasil central, cortam-se os ramos, e colhe-se o material. (GIACOMETTI,1989; MARANCA, 1992)

As folhas e flores são usadas como condimento, mas a planta inteira, sem a raiz, é utilizada para a extração do óleo essencial. O odor é quente, remanescente da sálvia. O óleo essencial do tomilho é um líquido vermelho amarelado, com ricos aromas doces, quentes e pungentes. O principal constituinte do óleo é o timol, outros componentes são o carvacrol, *l*-linalol, *l*-borneol, geraniol, álcool amil,  $\beta$ -pineno, *p*-cimeno, cariofileno, terpineol e canfeno. O óleo resina do tomilho é verde escuro a marrom, viscosas, semi-sólidas, com um conteúdo de óleo volátil de 50mL por 100g. Geralmente 1,81kg de óleo resina são equivalentes a 45,45kg de tomilho fresco ou desidratado. De acordo com as normas internacionais (U.S.), não pode conter mais que 14% de cinza total, 5% de ácidos insolúveis e 9% de mistura e não abaixo do que 0,8mL de óleo volátil por 100g.

A composição aproximada de tomilho encontra-se sumariada no quadro 2.5. (FARREL,1995;PRAKSH,1995).

Água	7,8 g
Calorias	276 kcal
Proteína	9,1 g
Lipídios	7,4 g
Carboidratos totais	63,9 g
Fibras	18,6 g
Cinzas	11,7g
Cálcio	1890 mg
Íon	124 mg
Magnésio	220 mg
Fósforo	201mg
Potássio	814 mg
Sódio	55 mg
Zinco	6 mg
Vitamina A	3800 IU
Niacina	5 mg
outras vitaminas	insignificantes

Quadro 2.5. Composição aproximada de tomilho  
(100 g, porção comestível)

Fonte : FARREL, 1995; PRAKSH, 1995.

### 2.1.6. Atividade antimicrobiana de condimentos vegetais e seus extratos *in vitro*

De acordo com SHELEF, 1986 a atividade antimicrobiana de condimentos vegetais é primeiramente examinada em meio de cultura igual, como realizado com os testes de preservativos. É utilizado, aumento da concentração de condimentos, definição da população de cultura pura do microrganismo-teste, temperaturas ótimas para incubação, efeitos inibitórios são avaliados por observações de turvações ou medidas da zona de inibição, enumeração microbiana e peso do micélio. Muitos estudos envolvem microrganismos patogênicos, microrganismos deterioradores de alimentos e microrganismos fermentadores de alimentos, bem como em diferentes lugares do mundo, incluindo: Japão, Rússia, Grécia, Índia e outros, e fatores como microrganismo-teste, meio de cultura, condições de incubação, preparação dos condimentos e procedimento de incorporação, são importantes observações a serem estudadas. Dados *in vitro* de vários estudos de diversos condimentos vegetais (ervas aromáticas) encontram-se sumariados no quadro 2.6.

Condimentos vegetais (ervas aromáticas)	microrganismo inibido	Referência
Alho	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i>	Johnson&Vaughn 1969 Powers et al. 1975 Karaioannoglou 1977 Mantis et al. 1978 Dankert et al 1979
Cebola	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Sharma et al. 1979
Canela	<i>A. parasiticus</i>	Bullerman 1974
Pimenta preta e branca	<i>Clostridium botulinum</i>	Huhtanen 1980
Cravo	<i>P.cerevisiae</i> , <i>L. plantarum</i>	Zaika & Kissinger 1979
Alecrim	<i>S. aureus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>S. typhimurium</i>	Farboard 1976
Cravo Pimenta da Jamaica Aniz	<i>Aspergillus spp</i>	Hitokoto et al 1980
Cravo Canela Mostarda Pimenta da Jamaica Cebola Orégano	<i>Aspergillus spp</i> , <i>Penicilliu spp</i>	Hitokoto et al 1980
Orégano	<i>Salmonella</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>Aspergillus toxigênicos</i>	Julseth & Deibel 1974 Beuchat 1976 Llewellyn et al 1981
Tomilho	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>Aspergillus toxigenicos</i>	Beuchat 1976 Llewellyn et al 1981
Sálvia	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	Shelef, et al 1980
Alecrim	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	Shelef, et al 1980
Folhas de louro Noz moscada	<i>C. botulinum</i>	Huhtanen 1980
Cravo Canela Mostarda Pimenta da Jamaica Alho Orégano	<i>Aspergillus micotoxigenicos</i> , <i>Penicillium</i>	Azzouz & Bullerman 1982
Sálvia	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>S.typhimurium</i>	Shelef et al 1984
Alecrim	<i>Salmonella</i>	Torres et al 1986
Tília	<i>S. typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	Goonul & Karapinar 1987
Canela cravo	<i>Listeria monocytogenes</i>	Back, et al 1990
Cravo Orégano Sálvia	<i>Listeria monocytogenes</i>	Everting & Deibel 1992

Quadro 2.6. Sumário de estudos *in vitro* de atividade antimicrobiana de condimentos vegetais (ervas aromáticas) e seu extratos

WEBB & TANNER (1945) estudaram a sensibilidade de Leveduras (*Zygosacmyces priorianus*, *Oidium lactis*, *Torula sphaerica*, *Saccharomyces cerevisiae* *Mycoderma vini*, *Saccharomyces hansenii*, *Shizomycetes mellacei*, *Zygosaccharomyces pastori*) frente à infusão em água de dez tipos de condimentos

(canela, cravo, pimenta da Jamaica, folha de louro, mostarda, páprica, gengibre, pimenta vermelha, pimenta preta, noz moscada). Verificaram que a infusão de canela, cravo e pimenta da Jamaica preveniram o crescimento dessas leveduras na concentração de 1:50 quando cultivadas em meio de cultura caldo, entretanto, um décimo percentual das mesmas, quando cultivadas em Agar, inibiu marcadamente, mas não preveniu o crescimento das Leveduras-teste. A infusão de noz moscada, folhas de louro, pápricas, gengibre e pimenta vermelha e preta não preveniram o crescimento e precisou de concentrações acima de 10% para prevenir o crescimento dessas Leveduras.

De acordo com RAMASWAMY & BONERJEE (1948), a ação antioxidante da Cúrcuma é compatível com a ação antioxidante do BHT e BHA e ácido cítrico, aditivos utilizados em alimentos. Em níveis de 0,5 a 1,0% a cúrcuma reduz consideravelmente a formação de peróxidos em óleo de amendoim durante testes de estabilidade realizados.

Dentro de condições controladas de laboratório AL-DELAIMY & ALI (1970) estudaram extratos vegetais de cebola, alho, nabo, pimentão verde e rabanete como inibidores de bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus*, *salmonella typhosa*, *Shigella dysenteriae*). 1-4% por volume de extrato de cebola inibiram completamente o crescimento de todas as bactérias testadas. Entretanto, 4% por volume de extrato de alho inibiram *S. dysenteriae* e *S. aureus* a uma população de  $10^6$  UFC/mL, mas, *S. Typhosa* e *E. coli* não foram completamente inibidas; a inibição foi de 95,3% e 48,3%, respectivamente. Porém, quando se testou uma população bacteriana de  $10^4$  UFC/mL, o extrato de alho decresceu substancialmente o número de colônias em todas as bactérias-teste. 4% do extrato de nabo, pimentão verde, rabanete não apresentaram definida ação antibacteriana frente às duas populações ( $10^6$  UFC/mL e  $10^4$  UFC/mL) das bactérias-teste, muito pelo contrário, a atividade desses extratos estimulou o crescimento de algumas delas.

ABDOU & ABDOU-ZEID (1972) avaliaram a atividade antimicrobiana de extrato vegetal e extrato alcoólico utilizando diferentes tipos de solventes (Éter, Éter de petróleo, clorofôrmio, Etil acetato e Etanol) de *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum frutescens*, *Eruca sativa*, *Allium kurrat* frente a bactérias Gram positiva e Gram negativa. Verificaram os autores que *Allium cepa*, *Raphanus sativus* foram eficazes sobre *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas pyocyaneus*, enquanto que o extrato vegetal de *Capsicum*

*frutescens* e *Eruca sativa* foram ativos somente sobre *E. coli*, *S. typhi* e *Bacillus subtilis*, já o extrato de *Allium kurrat* foi ativo sobre *E. coli* e *B. subtilis*. Em relação à inibição com o extrato alcoólico, *Allium sativum* teve como melhor solvente no isolamento de substâncias inibidoras o éter, e que a inibição de *B. subtilis* >que *S. typhi* >que *P. pyocyaneus* >que *E. coli*. O *Allium cepa*, apesar de que os outros solventes tiveram sucesso, o mais inibidor foi o extraído com éter, com inibição *E.coli* > *P. pyocyaneus* > *S. typhi* > *B. subtilis*; entretanto para o *Raphanus sativus*, os solventes orgânicos, éter, éter de petróleo e clorofórmio foram ineficientes, e o isopropil e etanol tiveram êxito somente sobre *E. coli*. *Capsicum frutescens* teve como o melhor solvente o éter somente sobre *E. coli*, os demais não tiveram êxito sobre nenhuma das bactérias testadas. Os componentes inibidores ativos de *Eruca sativa* não foram isolados por nenhum dos solventes utilizados, pois os testes de inibição frente a essas bactérias-teste não provocaram nenhuma inibição. *Allium kurrat* teve êxito somente o extrato com éter, inibindo *E. coli* e *B. subtilis*.

BULLERMAN (1974), estudou o efeito inibidor da canela sobre aflatoxinas produzidas por *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 e NRRL 3000, constatando que o efeito do extrato alcoólico de canela sobre o crescimento e produção de aflatoxina produzida pela estirpe NRRL 2999 em meio de cultura glicose nitrato de amônia foi similar ao obtido com canela picada em caldo extrato de levedura e sacarose. O crescimento foi reduzido com concentrações de extrato de 0,2-2%, mas, concentração de 0,02% não reduziu o crescimento. Entretanto, as concentrações de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foram todos significativamente reduzidos com concentrações baixas de extrato de canela e essas reduções ficaram entre 74% a 89%. E, 0,2% de canela, inibiu a produção de aflatoxina entre 98% a 99%, a concentração de 2%, a aflatoxina produzida foi inibida por mais de 99%.

JUSELTH & DEIBEL (1974) estudaram 9 tipos de condimentos vegetais (pimenta da Jamaica, canela, folhas de louro, aipo em flocos, cebolinha desidratada, manjerona, alho granulado, orégano e salsa em flocos) em diferentes concentrações (0,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), detectando que existe uma variação grande entre os diferentes condimentos, bem como dentro da mesma espécie. Os mesmos autores verificaram que quando células de *Salmonella* foram inoculadas em meio de cultura de pré-enriquecimento contendo pimenta da Jamaica, canela, alho e orégano, uma definida inibição do crescimento desse microrganismo foi observada.

De acordo com FARBOARD et al (1976), o extrato de alecrim a concentração de 1% em meio de cultura exerce efeito inibidor sobre *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas fluorescens*, e que quando a mesma concentração utilizada frente a *Salmonella typhimurium* e *S. aureus* uma redução maior é observada comparado aos outros microrganismos-teste, 43,2 e 99,9% de inibição, respectivamente, evidenciando uma sensibilidade maior desses microrganismos em relação aos outros. Em concentração de 0,1%, obteve-se um definido efeito bactericida, com uma redução de 2-Log quando o extrato foi esterilizado separadamente do meio de cultura e incubado com o meio de cultura por 9 horas, apenas com cultura pura de *S. aureus*, que não foi observado quando os outros microrganismos foram testados. Os mesmos autores detectaram também que concentrações de 0,07% e 0,09% aumentam a Lag fase desse organismo-teste. Entretanto, quando o meio de cultura e o extrato de alecrim foram esterilizados juntos aumentou o efeito letal do extrato, e observou-se que concentrações de 0,06% e 0,07% resultavam em uma redução de 2 a 4 Log em contagens após 9 horas de incubação, e que concentrações de 0,08% resultou completa inativação de células de *S. aureus* após 8 horas de incubação; tal efeito foi atribuído a uma reação química entre o extrato de alecrim e os constituintes do meio de cultura, que resultou na extração total dos componentes do extrato de alecrim na fase aquosa.

HUHTANEN (1980) monitorou 33 espécies de extrato alcoólico de condimentos frente à inibição de *Clostridium botulinum* em meio de cultura. Mace (revestimento exterior da semente de *Myristica fragans*) e schiote (*annato*, *Bixa orellana*) foram os mais inibitórios, com MIC de 31 ppm. Porém, muito ativas também foram às folhas de louro (*Laurus nobilis*), pimenta preta e pimenta branca (*Piper nigrum*) e noz moscada (semente de *M. fragans*), todas com MIC de 125 ppm. e menos ativos foram Alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cravo (*Eugenia caryophyllata*), orégano (*Origanum vulgare*), Açafrão da Índia (*Cúrcuma longa*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e páprika (*capsicum annum*), todos apresentaram MIC de 500ppm.

HITOKOTO et al (1980) estudaram o efeito inibitório de 29 condimentos em pó sobre o crescimento e produção de toxina de 3 espécies de *Aspergillus* toxigênicos (*A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*) em meio de cultura. Cravo, semente de anis estrelado e pimenta da Jamaica inibiram completamente o crescimento desses fungos, ao passo que os outros condimentos testados inibiram mais somente a

produção de toxina. De acordo com estes autores, o tomilho causou 10 a 90% de inibição de crescimento das três espécies de *Aspergillus*, mas apresentou quase completa inibição (86 - 100%) de sua produção de toxinas. Semente de cominho, folhas de aipo e folhas de sálvia causaram parcial (0 - 88%) inibição de crescimento e produção de toxina de *A. ochraceus* e *A. versicolor*, entretanto a semente de cominho causou completa inibição de produção de ochratoxin de *A. ochraceus*. Folhas de estragon produziram completa inibição de sterigmatocystin produzido por *A. versicolor*, mas somente uma inibição parcial do crescimento das três espécies de *Aspergillus* e toxinas produzidas por *A. flavus* e *A. ochraceus*. Aneto (*Anethum graveolens* L.), Açafrão da Índia (*Curcuma longa*), Manjerona, folhas de manjeriço, semente de anis, cominho fruta e semente de coentro apresentaram completa inibição de Ochratoxin A produzida por *A. ochraceus* e parcial inibição do crescimento e produção de toxina de *A. flavus* e *A. versicolor* e do crescimento de *A. ochraceus*.

Resultados semelhantes ao de HITOKOTO et al (1980) foram também reportados por AZZOUZ & BULLERMAN (1982), que estudaram o efeito de 16 condimentos: cravo (*Eugenia caryophyllus*), canela (*Cinnamomum zeylanicum* B.), mostarda (*Sinapis alba* L.), pimenta da Jamaica (*Pimenta*), Orégano (*Origanum*), tomilho (*Thymus*), Açafrão da Índia (*Curcuma longa* L.), anis (*Pimpinella onisum*), páprika (*Capsicum annum*), pimenta vermelha (*Fred Cayenne*), pimenta preta (*Piper nigrum* L.), pimenta branca (*Piper White*), folhas de Sálvia (*Sálvia*) e alecrim (*Rosmarinus*), e pó de alho (*Allium cepa* L.) e cebola (*Allium sativum*) e, dentre estas, apenas cravo, canela, mostarda, pimenta da Jamaica, cebola e orégano a níveis de 2% em meio ágar batata dextrose inibiram completamente todos os sete fungos micotoxigênicos testados (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, espécies de *Penicillium*, *Penicillium patulum*, *P. roquefortii*, *P. citrinum*). Entretanto, o cravo e a canela foram os mais poderosos, inibindo por períodos de tempos superiores a 21 dias, em relação à mostarda, cebola, pimenta da Jamaica e orégano, que tiveram vários graus de inibição.

SHELEF et al (1980) estudaram a sensibilidade de 22 bactérias Gram positivas e 24 bactérias Gram negativas frente a condimentos como sálvia, alecrim e pimenta da Jamaica. Em uma concentração de 2% de condimentos em meio de cultura, os autores concluíram que, em geral, as bactérias Gram positivas foram mais sensíveis que as bactérias Gram negativas (*Acetobacter*, *Acinetobacter*,

*Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus* (5 espécie), *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia* (2 espécie), *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Pediococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* (4 espécies), *Salmonella*, *Sarcina*, *Serratia*, *Staphylococcus* (9 espécies), *Streptococcus* (3 espécies), *Vibrio* (3 espécies). E a sálvia mostrou ter uma alta atividade antimicrobiana seguida do alecrim.

De acordo com os mesmos autores, quando a sálvia e o alecrim foram testadas em concentrações mais baixas (0,3%) acrescidas em meio de cultura inibiram 21 organismos Gram positivos, 9 dos quais enteropatogênicos, tal como *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* coagulase positivo e duas espécies de *Kanagawa* positiva de *Vibrio parahaemolyticus*. Entretanto, a pimenta da Jamaica foi a menos efetiva, requerendo uma concentração maior que 0,5%. Verificaram também uma recuperação de crescimento na concentração de 0,3% de sálvia e alecrim, que foram bacteriostáticos nessa concentração, porém em uma concentração de 0,5%, os dois foram bactericidas.

Os autores concluíram ainda que em uma combinação de concentrações inibitórias de alecrim e sálvia o efeito antibacteriano aumenta, evidenciando que existe um efeito sinérgico, entre os componentes ativos das mesmas. Em 1984, SHELEF et al continuaram os estudos com a sálvia sobre bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella typhimurium* a uma população de  $10^8 - 10^9$  UFC/mL em meio de cultura caldo nutritivo, e os resultados obtidos tiveram sucesso, pois a inibição em meio de cultura caldo foi alta com MIC de 0,4 - 1%, sendo 0,1% *B. cereus*, 0,4% *S. aureus*, 0,5% *Pseudomonas sp.* e 1% *S. typhimurium*.

TORRES et al (1986) reportam os efeitos inibidores do extrato etanólico e extrato aquoso de alecrim sobre sete espécies de *Salmonella* isoladas de frango (*S. agona*, *S. anatum*, *S. derby*, *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. saint paul* e *S. typhimurium*), determinando a presença do princípio ativo bactericida do alecrim nos extratos aquoso e etanólico, sua concentração com efeito inibidor "in vitro", e a ocorrência de um possível sinergismo entre o extrato de alecrim e os componentes do meio de cultura (caldo triplica de soja). Os autores concluíram que o princípio ativo do alecrim concentra-se no extrato etanólico e que este efeito é obtido quando o extrato é esterilizado junto com o caldo de soja triplico, ocorrendo um sinergismo entre o extrato e os componentes do meio de cultura utilizado para teste.

GONUL & KARAPINAR (1987) verificaram o efeito inibidor de flores de tília e de seu extrato alcoólico frente a três bactérias patogênicas, *S. typhimurium*, *S. aureus* e *V. parahaemolyticus*. *S. aureus* foi o mais sensível que os outros microrganismos, e o seu crescimento foi inibido a um nível de 0,1% de flores de tília com um inoculo inicial de  $10^5$  -  $10^6$  células/ mL. *S. typhimurium* foi inibida a uma concentração de 0,5 e 1,0% quando o inoculo inicial era de  $10^5$  e  $10^6$  células/mL, respectivamente. Os valores de MIC para *V. parahaemolyticus* foi de 5%, 2% e 1% quando o inoculo inicial era de  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  células/mL, respectivamente. Flores de tília a 5% mostraram leve efeito inibidor sobre *S. typhimurium* com uma população de  $10^7$  células/mL, porém o crescimento de *S. aureus* e *V. parahaemolyticus* foi completamente inibido. Em relação ao extrato alcoólico de flores de tília, os autores deduziram que pouca quantidade, equivalente a 10 000 ppm (1%) foi suficiente para inibir *S. typhimurium* em todos os níveis de inoculo, e que resultados similares ocorreram com *V. parahaemolyticus*, que foi inibido completamente pelo extrato alcoólico a 5000 ppm (0,5%) a uma população de  $10^5$  células/mL; todavia, ao contrário da situação observada com os dois microrganismos anteriormente citados, *S. aureus* mostrou ser menos sensível ao extrato alcoólico de flores de tília quando o inoculo inicial era de  $10^5$  células/mL.

De acordo com BEUCHAT & GOLDEN (1989), descrevem, em uma extensa revisão, que muitas bactérias patogênicas “food borne” são sensíveis a extrato de *Allium spp* - *A. sativum* (cebola), *A. cepa* (alho) e *A. porrum* (alho porró), e que essa sensibilidade varia com estirpe dentro do estudo e das condições ambientais impostas. Segundo os mesmos, microrganismos de significância em Saúde Pública são afetados por certos componentes presentes nesses temperos, agentes como *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, Fungos micotoxigênicos.

BACK et al (1990), através de construção de curvas de crescimento pelos dados avaliados conforme um modelo Logístico calculando-se o crescimento paramétrico, estudaram o comportamento de *Listeria monocytogenes* estirpe V7 frente à concentração de 0,5% de especiarias selecionadas (alho, cebola, mostarda, canela e cravo) em duas temperaturas 35°C e 4°C. De acordo com os dados apresentados pelos autores citados, o Alho, a cebola e a mostarda, cada um teve efeito bacteriostático sobre *L. monocytogenes*, entretanto a canela e o cravo foram

os mais inibitórios em relação aos outros condimentos avaliados, e o cravo teve efeito bacteriostático e bactericida mais pronunciado que a canela e os demais.

EVERTING & DEIBEL (1992), utilizando o método do Gradiente de concentração em placas descrito por SHELEF, monitoraram 13 condimentos vegetais para verificar o efeito inibitório no crescimento de 3 estirpes de *Listeria monocytogenes* a uma temperatura de 24° C. Os autores detectaram que entre os 13 condimentos monitorados, o cravo e o orégano foram os mais inibitórios com valores de MIC de 0,5 a 07% (p/v), seguidos pela sálvia e alecrim MIC de 0,7 a 1,0%; e noz moscada MIC 1,1 a 1,4%, porém pimenta preta, pimentão, canela, alho, mostarda, páprica, salsa e pimenta vermelha a uma concentração a concentração de 3% não inibiram o crescimento de *L. monocytogenes*. Segundo os resultados obtidos por Everting & Deibel, quando testaram o efeito do cravo, do orégano e da sálvia, que foram os mais inibitórios, sobre o crescimento e sobrevivência de *L. monocytogenes* Scott A em meio de cultura caldo sob temperatura controlada a 24° C e 4°C, a uma concentração de 0,5 e 1,0%, cravo foi bactericida e o orégano foi bacteriostático a esta bactéria nas duas temperaturas de incubação, porém a sálvia nessas duas concentrações foi bactericida a 4° C e bacteriostática a 24° C.

### 2.1.7. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos vegetais *in vitro*

A associação de frações de óleos essenciais com a atividade antimicrobiana de condimentos vegetais (ervas aromáticas) é reconhecida há muito tempo. Existem dados desde 1920 sobre estudos com extração de óleos essenciais a partir de ervas condimentares e teste de sua atividade frente a vários microrganismos, elucidada SHELEF (1986). Alguns estudos realizados *in vitro* estão apresentados no quadro 2.7.

óleo essencial de ervas condimentares	microrganismo inibido	autores
Orégano, Tomilho	<i>V. parahaemolyticus</i>	Beuchat 1976
Sálvia	<i>B. cereus</i>	Shelef et al 1984

Alecrim	<i>S. aureus</i>	Farboard et al 1976
Cebola	<i>Candida albicans</i>	Yamada & Azuma 1977
Canela, cravo	<i>A. parasiticus</i>	Bullerman et al 1977
Estragon	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>S. hemolyticus</i>	Yasphe et al. 1979
Estragon Tomilho Alecrim Eucalipto	<i>Aspergillus spp</i> <i>Penicellium</i>	Benjamin et al. 1983
Manjeriçao Cravo	18 Bacterias Gram + e - Fungos patogênicos	Prasad et al. 1986
Sálvia Alecrim Tomilho Cravo Estragon Cominho	<i>P. fluorescens</i> <i>E. coli</i> <i>Serratia mercescens</i> <i>S. aureus</i> <i>Micrococcus spp</i> <i>Sarcina spp</i> <i>B. subtilis</i> <i>Mycobacterium phlei</i> <i>S. cerevisiae</i>	Farag et al. 1989
Cravo Canela Orégano Pimenta Tomilho	<i>Listeria monocytogenes</i>	Aureli et al. 1992

Quadro 2.7. Estudos *in vitro* da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos vegetais (ervas aromáticas)

WEBB & TANNER (1945) estudaram a inibição e prevenção de crescimento em óleos essenciais de canela, cravo, mostarda, anis, pimenta da Jamaica, pimenta preta e branca, folhas de louro frente a espécies de leveduras. Os autores observaram que quando utilizaram a técnica do óleo homogeneizado com o ágar e disposto em placas de Petri, com a inoculação na superfície, os óleos de canela, cravo e mostarda foram germinicidas a uma concentração acima de 1% e os óleos de anis, pimenta da Jamaica e alho foram germinicidas a uma concentração acima de 5%, e os óleos de folha de louro e gengibre foram mais bacteriostáticos em todas as concentrações, e os óleos de pimenta branca e preta estimularam o crescimento das leveduras. Todavia, quando os autores os testaram pela técnica *cup-plate* (difusão em Agar utilizando cilindros) os óleos de canela, cravo, pimenta da Jamaica e folhas de louro mostraram ser germinicidas, com uma forte e específica ação desinfetante sobre as leveduras. *Monilia candida* e *Mycoderma lactis* sobreviveram em contato com o óleo de anis, porém o contato com os outros foi letal.

MARUZZELLA & HENRY (1958) testaram a atividade antibacteriana de 35 óleos voláteis, 6 óleos fixos, 5 infusões dos óleos, 95 combinações dos óleos,

utilizando a técnica de difusão em disco de papel frente a cinco bactérias (*Salmonella typhosa*, *Micrococcus citreus*, *Proteus morgani*, *Bacillus brevis* e *Micrococcus pyogenes* variedade *albus*). Concluíram que os óleos de eucalipto, canela e orégano vermelho exibiram uma grande atividade junto aos óleos voláteis de cedro de madeira e mirra bem como todos os fixos, porém os óleos infusos não apresentaram atividade. Das 95 combinações de óleos voláteis avaliadas que mostraram aumento de atividade foram: eucalipto + canela tipo needle, eucalipto + canela tipo baga de junípero zimbro, eucalipto + canela tipo niaouli, entretanto quando óleos fixos e infusões de óleos foram combinados com óleos voláteis, a atividade foi marcadamente diminuída.

NAGY & TENGEDY (1967) utilizando extração de arraste a vapor e a técnica de diluição em tubos com contagem bacteriana com 2 horas e 8 horas de incubação, notaram a ação inibidora de óleos voláteis de *Artemísia tridentata* e *Artemísia nova* sobre bactérias (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Neisseria sicca* e *Staphylococcus aureus*), concluindo que a resposta bacteriana ao aumento de atividade de óleos voláteis varia significativamente de acordo com a espécie de bactéria testada. Segundo os autores, entre as quatro espécies testadas, *E. coli* foi a mais resistente aos óleos, seguida por *N. sicca*, *B. subtilis* e *S. aureus* e que os óleos de *Artemísia tridentata* possuem o mesmo grau de ação antibacteriana que os óleos obtidos de *Artemísia nova*.

JOUBERT et al (1970), baseados no método da microatmosfera de Kellner et Kober em placas de Petri, realizaram a aplicação de óleos essenciais de orégano e tomilho e dos seus constituintes carvacrol e acetato de borneol em desinfecção de ambientes domésticos e de ambientes de laboratórios.

NARASIMHA & NIGAM (1970) testaram a atividade antimicrobiana de cinco diferentes óleos essenciais de *Eugenia bracteata*, *Eugenia jambolana*, *cúrcuma zedoeira*, *Rosmarinus* e *Ocimum Var thyriflorum* usando o método *cup-plate* (difusão em placas de ágar através de cilindro) frente *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella aerogenes*, *Escherichia coli*, *staphylococcus aureus*, *S. albus*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Streptococcus  $\beta$ -hemofílico* provenientes de amostras de leite, soro, mão e saliva. De acordo com os autores, os microrganismos mais suscetíveis foram *S. aureus*, *S. albus*, *V. cholerae* e *E. coli*, e o mais resistente foi *C. diphtheriae*, observando que o poder desinfetante dos óleos é afetado consideravelmente pela adição de substâncias orgânicas e que ocorreu influência da

matéria orgânica sobre a atividade bactericida de *ocimum Var thyriflorum* frente a *V. cholerae*.

KAR & JAIN (1971), estudaram cinco óleos essenciais e as combinações desses óleos, *Apium graveolens*, *Mesua ferrea*, *Mililusa tomentosa*, *Vateria indica* e *Ferula narthex* pelo método da difusão em disco de papel. Esses óleos e suas combinações foram monitorados frente a 15 microrganismos patogênicos e não patogênicos. Os autores concluíram, neste monitoramento, que os óleos de *V. inidica* e *M. tomentosa* exibiram atividade frente a *Salmonella thphi* e *Streptococcus faecalis*; *A. graveolens* e *M. ferrea* frente a *Pseudomonas solanacearum*; *F. narthex* frente a *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas pyogenes* e *Pseudomonas solanacearum*. Contudo, as combinações realizadas com os óleos na razão de 1:1 não apresentaram efeito pronunciado, e muitos dos óleos testados exibiram efeito bacteriostático.

DAYAL & PUROHIT (1971) elucidam sobre as propriedades antifúngicas dos óleos essenciais da semente de *Xanthoxylum alatum*, rizomas de *Pavonia odorata* e *kemphera golanga*, erva de *andropogon iwaramcusa* e folhas de *justitia procumbans*, raiz de *ophiorrhiza mungos*, folhas de *xanthium strumarium* e sementes de *anethum sowa* frente a *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Microsporum canis*, *Candida tropicalis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *candida tropicalis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*. Os resultados mostraram que todos os óleos testados possuem atividade inibidora sobre todos os fungos testados, porém, *Justitia procumbans* exibiu uma atividade máxima frente a *T. mentagrophytes* (zona de inibição 41 mm a 1:10) e o próximo antifungico de importância foi o do óleo de *Pavonia odorata* frente a *A. terreus* (zona de inibição 38 mm).

NARASINHA & RAO (1972) estudaram 10 óleos essenciais de *Eugénia henyana*, *Lantana indica*, *Polyalthia longifolia*, *Apium graveolens*, *Leucas aspera*, *Ocimum conum*, *Cúrcuma zeodeira*, *Anethum sowa*, *Atalantia monophylla* e *Citrus curantium* frente a fungos *Trichophyton mentagrophytes*, *trichopyton rubrum*, *Epidermophyton floccossum* e *Candida albicans*. Concluíram que na diluição 1:1000 o óleo de *Ocimum canum* e *Citrus curantium* teve efeito fungicida sobre *T. metagrophytes*; o óleo de *Leucas aspera* e *Atalantia monophylla* foi observado na diluição 1:250. Poucas colônias cresceram no caso da *Leucas aspera* na diluição 1:500, sendo completamente inibidas na diluição 1:1000. Crescimento médio foi notificado no caso do óleo de *Polyalthia longifolia* na diluição 1:50 e poucas colônias,

criaram, entretanto o óleo de *Eugenia henyana* mostrou um crescimento médio na diluição 1:250. O óleo de *Lantana indica*, *cúrcuma zeodeira* e *Anethum sowa* foram efetivos unicamente na diluição 1:50.

NADAL (1973) utilizou no seu estudo óleos essenciais de plantas pertencentes à família *Myrtaceae* que tem o eugenol como o maior constituinte. Folhas de Louro 55 -65% de total de fenóis incluindo eugenol, chavicol e metil eugenol; Baga de pimenta 65-89% do total de fenóis incluindo eugenol e éter de metil eugenol; Folha da pimenta 67-90% do total de fenóis, principalmente o eugenol; Cravo 91-95% do total de fenóis, incluindo principalmente eugenol e algum acetato de eugenol. O autor utilizou também no estudo o fenol isolado: eugenol, chavicol, metil eugenol e acetato de eugenol, e como controle fenóis com atividade antimicrobiana chamada Obtusastylene e dihydroobtusastylene. Os microrganismos usados para teste foram: *Staphylococcus aureus* (12715), *Bacillus subtilis* (esporo suspenso B 453), *Escherichia coli* (U.P.R.), *Proteus vulgaris* (U.P.R.), *Pseudomonas aeruginosa* (10145), *Mycobacterium smegmatis* (10143) e *Candida albicans* (102331). De acordo com os resultados obtidos pelo autor, os óleos essenciais e seus constituintes fenólicos foram efetivos frente a todos os microrganismos testados; necessitando de MIC entre 10 a 100µg para prevenir a multiplicação celular, ressaltando que o óleo essencial de folhas de louro e os fenóis isolados, eugenol e chavicol foram os mais ativos, com MIC de 10µg.

BEUCHAT (1976) estudou a velocidade de crescimento do *Vibrio parahaemolyticus* em meio de cultura contendo óleo essencial de orégano, tomilho e sassafrás em duas concentrações (10 e 100µg/mL). Os resultados obtidos pelo autor, demonstram que os todos os óleos testados na concentração de 10µg/mL não exibiram qualquer efeito inibidor, contudo, quando se utilizou uma concentração de 100µg/mL, os três óleos testados foram inicialmente bactericidas, sendo que o óleo de orégano foi fortemente letal, seguido pelo tomilho e sassafrás. O crescimento de *V. parahaemolyticus* foi evidenciado após um extenso período de incubação. Em 1977, BULLERMAN et al, baseados em estudos anteriores, determinaram os componentes específicos da canela e do cravo sobre crescimentos de fungos. E detectaram que o óleo de cravo, óleo de canela, bem como os seus componentes ativos, aldeído cinâmico e eugenol, inibiam o crescimento e produção de toxina,

sendo que os óleos de cravo e canela foram inibidores a 200 - 250 ppm, o aldeído cinâmico a 150ppm e o eugenol a 125 ppm

MORRIS & SEITZ (1979), com a intenção de determinar a concentração mínima de inibição de aromas químicos e óleos essenciais adicionados em sabão comum, monitoraram 521 materiais utilizados em sabões, e verificaram que 44% foram inibitórios frente a um dos três organismos testados, 15% foi efetivo a todos os três (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*). De um número seletivo (212) dos materiais positivos, subseqüentemente monitorados frente a um lipofílico diphtheroid organismo (*Corynebacterium sp.*) 64 materiais (30%) foram positivos frente aos 4 organismos testes . Entretanto, 9 únicos materiais (4%) tiveram um MIC muito baixo (50 ppm) comparado ao sabão bacteriostático comum. Os autores realizaram um teste de descontaminação de mãos com um sabão contendo o mais ativo do material de fragrância, ao qual não obtiveram uma redução na contagem bacteriana total.

YASHPHE et al (1979) investigaram, pela técnica de difusão em disco de papel (disco 6mm) e diluição em tubos, a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Artemisia alba* (estragon) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa*, *Shigella sonnei* e *Streptococcus hemolyticus*. Os autores concluíram que os óleos inibiram o crescimento de todas as bactérias testadas, todavia, *Streptococcus hemolyticus* foi o mais sensível de todos, apresentando MIC 0,4mg/mL *S. aureus*; MIC 0,1 mg/mL *E. coli*; MIC 0,05 mg/mL *S. typhosa*, *S. sonnei*, *S. hemolyticus*. Para detectar o constituinte principal de atividade, o óleo foi injetado em uma coluna cromatográfica, cinco frações foram coletadas e 1mg de cada testada pelo método do disco de papel utilizando, como representantes Gram-negativo e Gram-positivo, a *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, os resultados indicaram que a fração 3 (56mm) possui significativa atividade antibiótica em relação às outras, fração 1 (6mm), fração 2 (14mm), fração 4 e 5 (16mm). A fração 3 foi identificada em coluna cromatográfica como um álcool santolina.

BENJAMIN et al (1983), utilizando o método da microatmosfera de Kellner & Kober modificado, estudaram as propriedades antifúngicas de seis óleos essenciais que possuem diferentes composições químicas *Artemisia alba* (estragon), *Thymus capitatus* (tomilho), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) frente a 39 tipos de estirpes (13 do grupo *Penicillium*, 9 de *Aspergillus* e 17 outros). Os resultados elucidam que o óleo de tomilho foi o mais efetivo, seguido pelo

estragon, alecrim e eucalipto (tomilho >>>estragon>> alecrim >eucalipto). Em relação ao método modificado aplicado, o autor destaca que o mesmo possui excelente vantagem sobre o convencional. Pois, permite estudar várias estirpes utilizando à mesma placa de Petri; a inoculação radial oferece a vantagem de estimar o efeito inibidor pela medida da extensão do crescimento e compara as várias estirpes sobre a mesma condição de sua sensibilidade.

CONNER & BEUCHAT (1984) monitoraram 32 diferentes tipos de óleos essenciais sobre o efeito inibidor frente a 13 microrganismos deterioradores de alimentos (*Brettanomyces anomalus*, *Candida lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Hansenula anomala*, *Kloeckera apiculata*, *Kluyveromyces elongisporus*, *Metchnikowia pulcherrima*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis glabrata*), utilizando a técnica de difusão em disco de papel. Deste monitoramento, os óleos essenciais que tiveram maior efeito inibidor, observado pelos valores médio do tamanho da zona de inibição a concentração de 10% para as 13 leveduras foi o de pimenta da Jamaica (17mm), canela (18mm), cravo (19mm), cebola (29mm), alho (11mm), orégano (24mm), alfavaca e segurelha (17mm) e tomilho (29mm) foram os mais efetivos. Contudo, os autores relatam que o óleo essencial de cebola provocou uma forte inibição no crescimento das leveduras a concentrações mais baixas, a concentração de 1% (25ppm).

PRASAD et al (1986) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes espécies de *Ocimum* (manjeriço) proveniente de diferentes regiões (França, Índia e Niazbol) contra 18 espécies de bactérias Gram positivas e Gram negativas e fungos patogênicos e não patogênicos, utilizando o óleo essencial do cravo para comparar com *Ocimum sanctum*, pois ambos possuem como constituinte principal o eugenol. As espécies de manjeriço testadas foram: *Ocimum basilicum* (França) constituinte principal Linalol; (Índia) constituinte principal metil chavicol; (Niazbol) constituinte principal metil cinnamote; *Ocimum kilimandscharicum* (Niazbol) constituinte principal camphor e *Ocimum sanctum* (Niazbol) constituinte principal eugenol.

De acordo com o autor, todas as bactérias Gram positivas foram sensíveis ao óleo essencial de *O. basilicum* (Niazbo); *O. sanctum* e de Cravo. *Citrobacter spp* e *S. welteureden* foram sensíveis a *O. basilicum* (França), mas somente *S. welteureden* foi sensível a *O. basilicum* (Índia). *Citrobacter spp*, *Salmonella sp* e *S. welteureden*

foram sensíveis a *O. basilicum* (Niazbon); *Citrobacter spp*, *Enterobacter spp* e *S. welteureden* foram sensíveis a *O. sanctum* e *Enterobacter spp*, *Salmonella spp* e *S. welteureden* e *S. saitpaul* foram sensíveis ao óleo de cravo. Em relação aos fungos testados, *O. basilicum* (Niazbo) inibiu a todos, entretanto *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *microsporum canis*, *trychophyton mentagrophyte* e *T. rubrum* foram resistentes a todas as outras espécies de óleos testados.

FARAG et al (1989), através da técnica da difusão em disco de papel e determinação de MIC, utilizando concentrações baixas (0,25 - 12mg/mL), estudaram o efeito inibitório de seis óleos essenciais de condimentos (sálvia, alecrim, cominho, cravo, tomilho e estragon) frente a três estirpes de bactérias Gram negativas (*Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*) e quatro bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus spp*, *Sarcina spp* e *Bacillus subtilis*), uma bactéria ácida (*Mycobacterium phlei*), e uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae*).

Os autores concluíram que as concentrações utilizadas foram suficientes para prevenir o crescimento microbiano e que, em geral, as bactérias Gram positivas foram mais sensíveis que as Gram negativas, as zonas de inibição dos diferentes crescimentos microbianos produzido por vários óleos essenciais foram similares àqueles produzidos pelos seus componentes básicos. De acordo com os mesmos, os óleos essenciais foram aqueles que tiveram maior atividade antimicrobiana comparados aos outros óleos. Eles tiveram uma relação entre a estrutura química do componente principal no óleo essencial sob investigação e a atividade antimicrobiana.

FARAG et al (1989), através de cromatografia Gás-Líquido, determinaram a composição do óleo essencial de tomilho, cominho, cravo, alcaravia, alecrim e sálvia, concluindo que os componentes principais desses óleos foram: timol, cuminaldeído, eugenol, carvone, borneol e tujone, respectivamente. Segundo os mesmos, o potencial antifúngico desses óleos foi investigado frente *Aspergillus parasiticus* e causou completa inibição, tanto do crescimento micelial como na produção de aflatoxina, e a efetivação seguiu a seguinte seqüência: Tomilho > Cominho > Cravo > Alcaravia > Alecrim > Sálvia. Os autores concluíram também que os componentes principais dos óleos essenciais testados produziram efeito inibidor à concentração mínima igual a aqueles obtidos com o óleo essencial.

AURELI et al (1992), utilizando duas técnicas diferentes, difusão em disco de papel e curva de inibição em um sistema de solução salina, analisaram a atividade antimicrobiana de 32 óleos essenciais de condimentos vegetais comumente utilizados em indústrias de alimentos, frente a quatro estirpes de *Listeria monocytogenes* (LL 201-origem humana, Scott A-origem humana, L12-isolada de queijo, L28- Dr. B. M. Hill) e uma estirpe de *Listeria innocua* (PF59-isolada de queijo). De acordo com os autores, dos 32 óleos testados, 14 apresentaram atividade e 5 foram os mais efetivos (cravo, canela, orégano, pimenta e tomilho) e três dos 5 óleos de maior atividade (cravo, tomilho e orégano) foram testados a concentrações mais baixas ocorrendo decréscimo de atividade.

Na curva de inibição, realizada para melhor avaliar a atividade, na qual foram testados os cinco óleos mais ativos citados anteriormente, os autores observaram que o óleo de pimenta apresentou melhor atividade em uma hora de exposição do que os outros que apresentaram atividade mais lenta na primeira uma hora, e que essa atividade parece depender da estirpe, como demonstra o declínio em células viáveis de *L. monocytogenes* L12 e Scott A, atenuado em comparação com as outras estirpes. Os autores chegaram à conclusão que *L. monocytogenes* é inibida pela atividade do óleo essencial em um sistema permitindo crescimento bacteriano e também em um sistema de solução salina, sendo este significativo para *Listeria* e outros microrganismos, que são capazes de sobreviverem em longos períodos de tempo sem se multiplicarem.

## **2.1.8. Atividade antimicrobiana de componentes de condimentos vegetais e o seu modo de ação.**

### **2.1.8.1. Modo de ação de substâncias antimicrobianas**

Estudos “*in vitro*” permitem o conhecimento do mecanismo de ação de uma substância antimicrobiana em nível celular e molecular, isto é, na intimidade do microrganismo; a partir desses dados pode-se estabelecer a classificação dessas substâncias antimicrobianas segundo seu mecanismo de ação. Para ser eficaz como antimicrobiana, a substância deve ter no microrganismo um alvo específico - sobre o qual vai atuar - e ser capaz, de ter acesso a ele com facilidade. (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985, KURYLOWICZ, 1981; LACAZ, 1969)

Conforme os autores citados anteriormente, em geral, as substâncias antimicrobianas exercem sua ação: 1 - durante o processo de crescimento ou de divisão celular; 2 - sobre os mecanismos enzimáticos envolvidos na síntese de moléculas essenciais às células dos microrganismos; 3 - na “montagem” de suas unidades estruturais; que pode ocorrer: A - Lesão da parede celular; B - Alteração da permeabilidade celular; C - Alteração das moléculas de proteínas e de ácidos nucléicos; D - Inibição da ação enzimática; E - Antimetabólitos; F - Inibição da síntese de ácidos nucléicos.

As enzimas são substâncias de natureza protéica que catalisam as reações de síntese molecular e que participam de algumas reações que promovem a constituição organizada e final da célula do microrganismo. As enzimas são alvos freqüentes das substâncias antimicrobianas capazes de atingir o local onde se encontram e de reagir quimicamente com elas. A reação promovida pela enzima bloqueada - impedida de exercer sua atividade biológica - não vai se desenvolver; caso essa reação seja essencial para o crescimento e multiplicação do microrganismo, o efeito antimicrobiano irá manifestar-se. (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

Quando uma enzima que participa normalmente do processo de divisão celular de uma bactéria é inibida, observa-se redução na velocidade (efeito bacteriostático) ou bloqueio (efeito bactericida) da multiplicação do microrganismo. Em condições ideais, costuma ocorrer duplicação do número de células bacterianas de 20 em 20 minutos; as substâncias antimicrobianas vão prolongar esse intervalo de tempo, retardando a evolução do processo. As substâncias antimicrobianas que atuam como inibidoras enzimáticas ligam-se, com grande afinidade, as enzimas específicas, que exercem funções particulares, essenciais para o crescimento celular; este, por conseguinte, torna-se mais lento, ou é interrompido. Muitos agentes antimicrobianos que inibem a síntese protéica ligam-se, irreversivelmente, a enzimas contidas no ribossomo, estrutura complexa intracitoplasmática constituída por proteínas e ácidos nucléicos, e outros atuam em enzimas encontradas na membrana citoplasmática. (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

Para que uma substância antimicrobiana exerça sua atividade é, antes de tudo, indispensável que ela seja capaz de atingir o alvo específico sobre o qual é capaz de atuar. Como a grande maioria das atividades metabólicas das células se

desenvolve no interior do citoplasma, é necessário que essas substâncias antimicrobianas que ali atuam estejam aptas a atravessar a parede celular e a membrana citoplasmática dos microrganismos. Os agentes antimicrobianos, de um modo geral, atravessam com maior facilidade a membrana simples das bactérias Gram positivas do que a dupla membrana das bactérias Gram negativas. Alguns microrganismos são resistentes a determinados antimicrobianos cujo alvo tem localização intracelular, pelo fato desses agentes não conseguirem ultrapassar adequadamente sua membrana citoplasmática; outros não têm necessidade de penetrar no citoplasma para exercer sua atividade, já que seu alvo de ação está localizado na parede celular ou na membrana citoplasmática. (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

Além das substâncias antimicrobianas com atividade antienzimática, há outros que atuam de forma diferente, interagindo diretamente com a membrana citoplasmática e prejudicando a capacidade dessa estrutura de controlar o fluxo fisiológico de moléculas de dentro para fora e de fora para dentro da célula do microrganismo. A capacidade de ação de uma substância antimicrobiana está intimamente relacionada com seu potencial tóxico, este existe desde que o alvo da substância antimicrobiana seja uma via metabólica ou uma estrutura comum à célula bacteriana. (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

A inibição das reações geradoras de energia pode ser especialmente prejudiciais e muitos agentes afetam as enzimas participantes destas vias importantes (ex. o sistema da glicólise, o ciclo de Krebs e o sistema citocromo). O cianeto, por exemplo, inibe o citocromo-oxidase, o fluoreto inibe a glicólise, os compostos do arsênio trivalente bloqueiam o ciclo de ácidos tricarbóxicos, enquanto que o dinitrofenol rompe as fosforilações oxidativas. Os agentes oxidantes fortes (exemplo: os haLogênio e o de hidrogênio) podem danificar os constituintes celulares em tal extensão que as bactérias não conseguem mais realizar suas funções metabólicas normais. (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

- **Atuação na síntese da parede celular**
- **Parede celular**

As células bacterianas (Figura 2.1, adaptada de NETO, 1985) são dotadas de envoltório semi-rígido, denominado, parede celular que é responsável pela conservação da forma do microrganismo. Sem a parede celular, a bactéria dotada de elevada pressão osmótica interna não conseguiria manter sua arquitetura. Em meio isotônico, inibindo-se a formação da parede celular, as bactérias adquirem forma esférica, e passam a receber o nome de esferoplastos, protoplastos ou formas L. Em meio hipotônico - provido apenas de frágil membrana citoplasmática, o protoplasto explode (Figura 2.2, adaptada de NETO, 1985). (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

Dados de Interesse
a) da estrutura Parede Celular Membrana Citoplasmática
b) do metabolismo Síntese de Ácidos Nucleicos Síntese de Proteínas

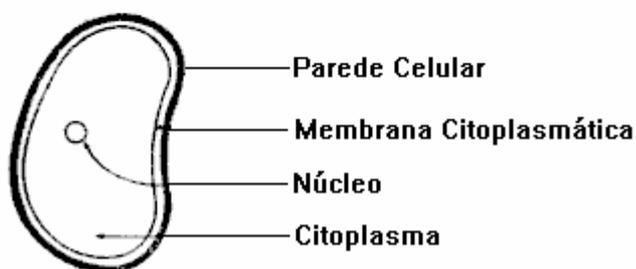


Figura 2.1. Esquema da estrutura da célula bacteriana

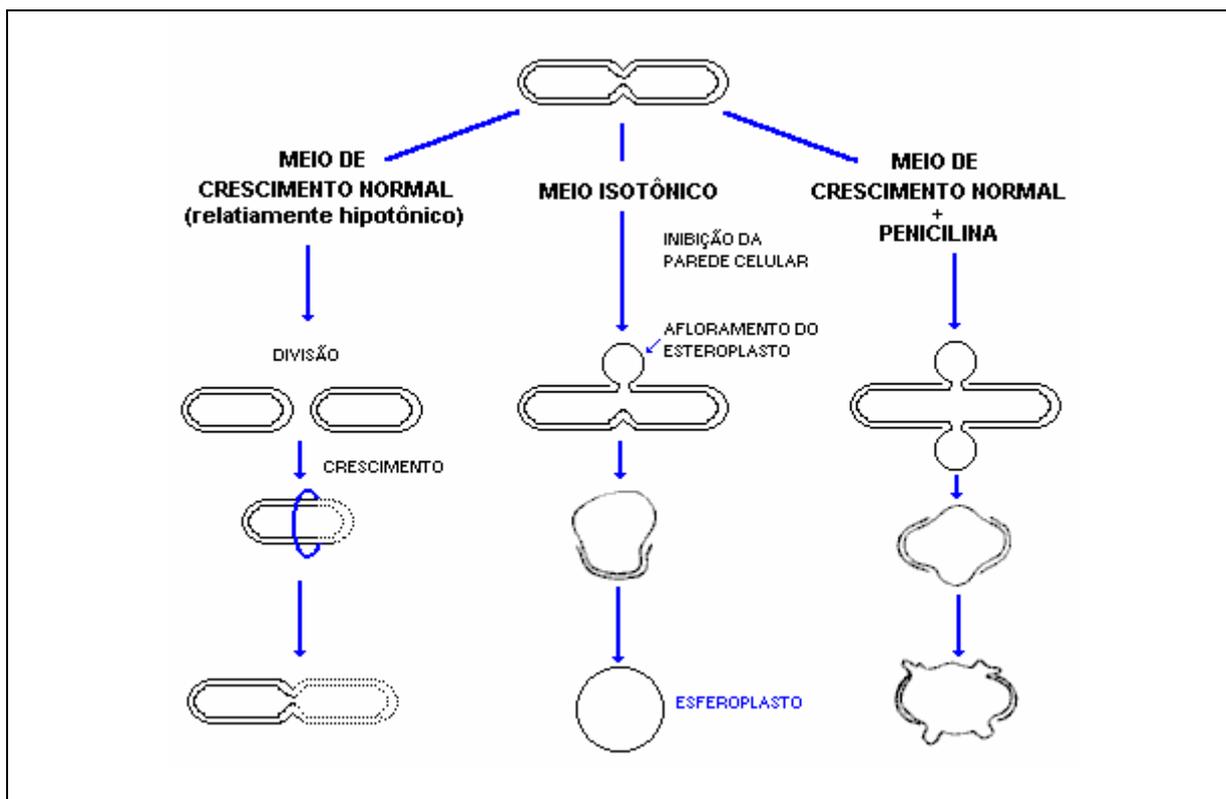


Figura 2.2. Crescimento e divisão celular bacteriana em diferentes meios.

A parede celular possui diversos componentes: sua “camada basal” é constituída por mucopéptide<sup>1</sup>, que tem como componentes dois aminoaçúcares (ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina) e quatro péptides (l-alanina, ácido d-glutâmico, l-lisina ou ácido diaminopimélico e d-alanina) (Figura 2-3 adaptada de NETO, 1985). Os aminoácidos alternam-se na formação de múltiplas cadeias lineares (a), sendo os quatro péptides ligados ao ácido N-acetilmurâmico (b). Essas cadeias são solidárias entre si (c) através de pontes cruzadas responsáveis, por conseguinte, pela estrutura supermolecular do mucopéptide. Esses enlaces cruzados, conhecidos como *transpeptidação*, estabelecem-se com a participação enzimática da *transpeptidase*. (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

A síntese da parede celular efetiva-se em 4 estágios distintos (Figura 2.4, adaptada de NETO, 1985). De início, os precursores da parede celular (aminoaçúcares e péptides) são sintetizados e agrupados no citoplasma (a); a

<sup>1</sup> Polímero complexo de características variáveis segundo a espécie considerada, que inclusive participa, em proporções também variadas, da estrutura da parede celular (60% cocos Gram positivos e menos de 10% nos bacilos Gram negativos).

seguir, esses fragmentos do mucopéptide atravessam a membrana citoplasmática à custa de mecanismo transportador de natureza lipídica (b); depois, já no exterior (c), esses precursores sofrem polimerização, formando cadeias lineares; finalmente, por transpeptidação, configura-se a estrutura final do mucopéptide (d). (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

- **Mecanismo de ação**

A formação da parede celular pode ser inibida por qualquer antimicrobiano que seja capaz de interferir na síntese do mucopéptide, como decorrência segue-se formação insuficiente da parede celular com a formação de protoplasto, forma suscetível a lises, ruptura e dissolução da bactéria, desde que a pressão osmótica do meio em que se encontra não seja a mesma do seu citoplasma (Figura 2.4, adaptada de NETO, 1985). (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

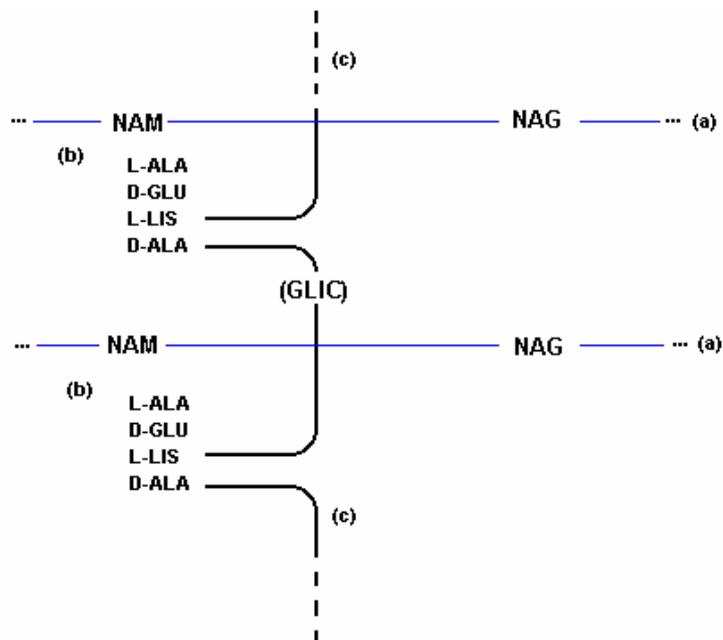


Figura 2.3 - Esquema da estrutura do mucopéptide

- **Interferência na função da membrana citoplasmática**
- **Membrana citoplasmática**

Todas as células vivas são providas de uma membrana citoplasmática, que é limitante, relativamente frágil, e que constitui o seu envoltório essencial. Essa membrana serve como barreira de permeabilidade seletiva, exercendo controle sobre a composição interna da célula. (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

- **Mecanismo de ação**

Uma vez alterada a estrutura da membrana citoplasmática, o conteúdo da célula sofre mobilização para o exterior. Dependendo da extensão das alterações da integridade da membrana citoplasmática, íons, moléculas pequenas ou mesmo macromoléculas podem evadir-se do conteúdo intracelular, disso decorrendo variável prejuízo do seu metabolismo. Compreende-se, pois, que os antimicrobianos que atuam através desse mecanismo são letais para os microrganismos sensíveis, isto é, são bactericidas, pois estas substâncias destroem a permeabilidade seletiva da membrana permitindo o vazamento de constituintes celulares como nitrogênio, fósforo e também alteração de enzimas presentes nas camadas da membrana. (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

- **Interferência na síntese dos ácidos nucléicos**
- **Síntese de ácidos nucléicos**

As informações genéticas, necessárias para a vida da célula, são mantidas pelo ácido desoxirribonucléico (ADN), sendo todo o patrimônio genético conservado e preservado em cada divisão celular (Figura 2.4, adaptado de NETO, 1985). (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

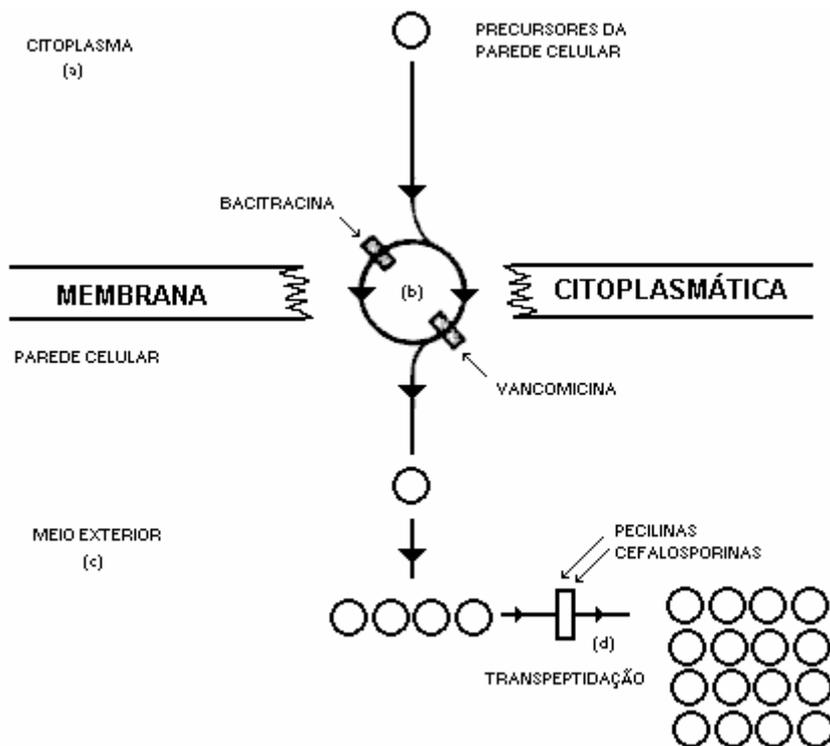


Figura 2.4. Esquema do processo de síntese da parede celular e local de ação dos antibióticos que nele interferem.

Duas categorias de substâncias inibem a síntese de ácidos nucleicos: (1) compostos que interferem na formação das unidades constitutivas dos ácidos nucleicos, ou seja, as purina e pirimidina-nucleotídeo, e (2) compostos que bloqueiam a polimerização dos nucleotídeos. O papel vital do ADN e ARN nas funções normais da célula sugere que qualquer interferência com sua formação e atividade deverá prejudicar seriamente a célula. (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

- **Interferência nas moléculas de proteínas e nos ácidos nucleicos**

A viabilidade de uma célula está associada com a manutenção das proteínas e dos ácidos nucleicos em seu estado normal, a desnaturação da proteína, por exemplo, pode lesar irreparavelmente a célula. A inibição da síntese de proteínas leva a formação de proteínas anormais, como decorrência os microrganismos deixam de crescer e tornam-se incapazes de se multiplicarem, e essas substâncias são bacteriostáticas. (BLOCK & LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981).

### 2.1.8.2. Ação de alguns antimicrobianos

Os ácidos benzóicos e parabenos atuam sobre a molécula não dissociada, e neste estado de não dissociação, estes compostos são solúveis na membrana celular e atuam como ionóforos de prótons; como ionóforos facilitam a filtração de prótons no interior da célula e, deste modo, incrementam a produção de energia das células para manter seu habitual pH interno, e com a alteração na atividade da membrana celular, o transporte de aminoácidos fica prejudicado. GOULD et al (1983). Os benzoatos atuam do mesmo modo que os proprianatos e sorbatos frente aos microrganismos inibindo a absorção das moléculas do substrato pelas células. A Figura 2.5 mostra a germinação de endósporos mais sensíveis ao benzoato.

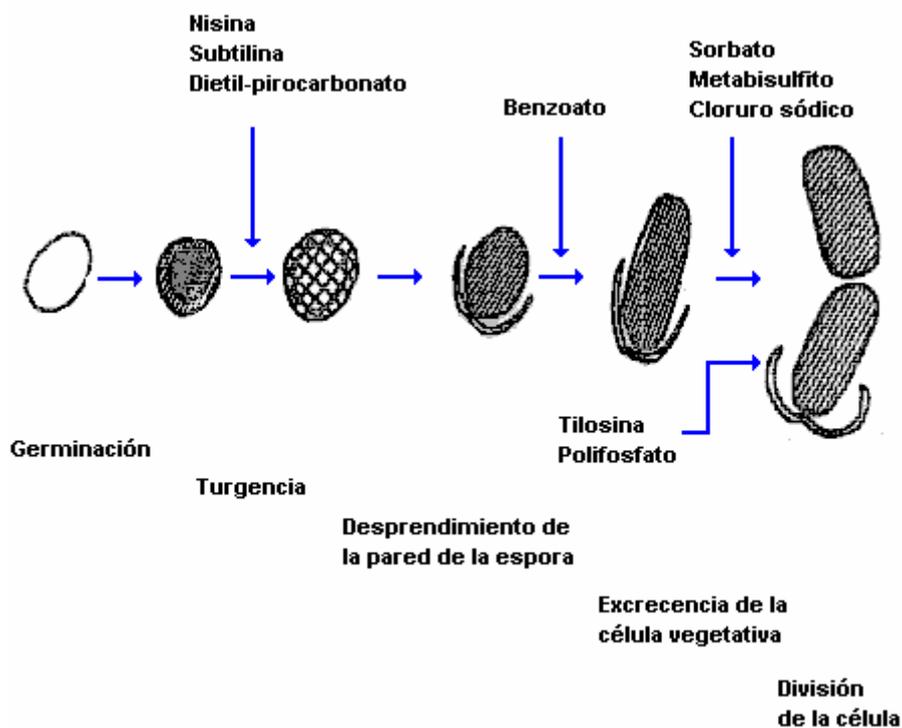


Figura 2.5. Representação esquemática do desenvolvimento de um endosporo para dar células vegetativas que mostra as fases reprimidas por concentrações mínimas inibitórias de alguns conservadores de alimentos

De modo igual aos ácidos lipófilos, os sorbatos, benzoatos e proprianatos inibem as células microbianas mediante os mesmos mecanismos gerais, que implica

a força protonmotriz (PMF)<sup>2</sup> - os íons Hidrogênio (prótons) e os íons hidroxila estão separados por uma membrana citoplasmática, originando os primeiros, que se encontram fora da célula, um pH ácido, maior que os últimos, que se encontram no interior da célula, originam um pH próximo à neutralidade. O gradiente da membrana criado deste modo representa o potencial eletroquímico que a célula emprega no transporte ativo de alguns compostos, como por exemplo, os aminoácidos. Os ácidos lipófilos débeis comportam-se como protonóforos. Depois de difundir através da membrana, a molécula não dissociada se ioniza no interior da célula e reduz o pH intracelular. Isto dá como resultado um debilitamento do gradiente através da membrana, de modo que o transporte de aminoácidos fica prejudicado. (RONNING & FRANK, 1987/1988).

A atividade antimicrobiana do sulfito é devido ao seu poder redutor, que permite reduzir a tensão de oxigênio a um valor abaixo do quais os microrganismos aeróbios não são capazes de crescer, apresentando também ação direta sobre algum sistema enzimático e ainda pelo fato de que SO<sub>2</sub> é tóxico para algumas enzimas que diminuem o crescimento dos microrganismos por inibirem as enzimas essenciais. (AS & IGRAN, 1949).

O Cloreto de sódio e Açúcares possui modo de ação similar frente aos microrganismos. A dissolução do sal em água (solução salina) a concentrações de 0,85% a 0,90% produz um meio isotônico para os microrganismos não marinhos, e a quantidade de NaCl e água são iguais a ambos os lados da membrana celular, a água se espalha através da membrana celular em ambas as direções.

### **2.1.8.3. Substâncias contidas nos óleos essenciais e modo de ação**

Conforme BEUCHAT & GOLDEN (1989); MULLER (1989), a atividade antimicrobiana de extratos de diversos tipos de plantas e partes das plantas utilizadas como agentes flavorizantes em alimentos e bebidas são reconhecidos há muitos anos. Entre seus componentes incluem-se os alcalóides, piperina e piperidina da pimenta, taninos e ácidos orgânicos, como o ácido benzóico do cravo e da canela. As substâncias antimicrobianas de numerosas ervas são os próprios óleos essenciais, mistura de diferentes produtos voláteis, que incluem hidrocarbonetos,

---

<sup>2</sup> Quantidade de energia disponível em uma membrana celular com gradiente de prótons

álcoois, cetonas, aldeídos, fenóis e éteres fenólicos, ácidos e seus ésteres, e muitos dos hidrocarbonetos, álcoois e cetonas são terpenóides. Entre eles os de largo espectros de efetividade incluem: *Allium spp* - *A. sativum* (cebola), *A. cepa* (alho) e *A. porrum* (alho porró), com componente Alicina e alístatina, Timol e carvacrol presentes no orégano e tomilho, aldeído cinâmico presente na canela, eugenol presente no cravo. Dados sobre conteúdo de alguns óleos essenciais e a reorganização dos componentes antimicrobianos em uma seleção de condimentos vegetais estão sumariados no quadro 2.8 e 2.9.

CONDIMENTOS VEGETAIS AROMÁTICAS		COMPONENTE ANTIMICROBIANO
NOME VULGAR	NOME CIENTÍFICO	
01. Anis	Pinpinella anisum L.	cresol, aldeído anísico, ácido benzóico
02. Alcarávia	Carum carvi L.	carvona
03. Alho	Allium sativum e Raphanus sativus, Allium porrum	alicina, alístocrina, acreolina
04. Alecrim	Rosmarinus officialis	cineol, borneol, alcanfor, ácido carnosólico
05. Aipo	Apium graveolens	senadólido, anidrido, sedanônico
06. Cravo da Índia	Caryophyllus aromaticus L.	eugenol, acetato de eugenilo, éter de metil-eugenol, ácido benzóico.
07. Cebola	Allium cepa	feniletil, mostarda, essências allílicas, de butílico, de croton.
08. Canela da china	Cinnamum cassias Nees	aldeído cinâmico, aldeído benzóico, metil-ortocuramaldeído, éster de ácido cinâmico, ácido salicílico, eugenol.
09. Canela de ceilão	Cinnamum zeylanicum Nees	aldeído cinâmico, acetato cinâmico, eugenol.
10. Cominho	Cominum cyminum L.	aldeído cumínico, carvacrol, linalol, borneol, cineol
11. Cardamomo	Elettaria cardamomum White e Meton	cineol, borneol, ascaridol
12. Cúrcuma	cúrcuma longa L.	borneol, cineol
13. Estragão	Artemisia dracunculus	metilchavicol
14. Gengibre	Zingiber officinale Roscoe	citrol, borneol, gengerol
15. Louro	Lourus nobilis L.	cineol, eugenol, aceto eugenol metil-eugenol, garaniol
16. Levística	Clevisticum officiale	carvacrol, butilftalina, perpeno, terpinol.
17. Mostarda	Sinapis alba e Brasica nigra	isotiacioneto de alilo
18. Manjerona	Mayorana hortensins	terpenos, terpineno, pipeno, sabineno, terpineol
19. Noz moscada	Myristica fragans	eugenol, isoeugenol, geraniol
20. Orégano	Origanum vulgare	timol, carvacrol
20. Pimentão	Capisum annum L.	capsaicina (saponina esteroide)
21. Pimenta	Piper L.	piperina, piperidina, citrol
22. Pimenta da jamaica	Piper olioica L.	eugenol citrol
23. Tomilho	Thymus Vulgaris	timol, carvacrol, safrol, broneol
24. Sálvia	Salvia officialis	cineol, tuyona, borneol, carmasol, ácido carmasólico

Quadro 2.8. Óleo essencial de condimentos vegetais (ervas aromáticas) com atividade antimicrobiana.

FONTE: ALZUGARY; COSTA (1975); MATOS (1989); MULLER, G. (1981); GERHARDT, V. (1975); GIACOMETTI, D.C. (1989); entre outros autores.

Condimentos	Conteúdo aproximado de óleo essencial (%)	Componentes antimicrobianos
Cebola	0,3 - 0,5	Alicin
Mostarda	0,5 - 1,0	Alil isotiocianeto
Canela	0,5 - 2,0	Cinamaldeido
Cravo	16 - 18	Eugenol
Sálvia	0,7 - 2,0	Timol e eugenol
Orégano	0,8 - 0,9	Timol e Carvacrol
Alecrim	1,0	Borneol, canfor, cineol
Açafrão da terra	3,5	Curcumina
Tomilho	1,0	Timol
Alho porró	0,002	Alicin

Quadro 2.9. Conteúdo aproximado de óleo essencial de alguns condimentos vegetais (ervas aromáticas)

A este respeito, KATAYMA & NAGAI (1960) avaliaram a atividade antibacteriana de 32 compostos terpenóides contidos no coentro e noz moscada, relacionando a estrutura do terpeno puro e sua atividade antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Proteus morgani*. De acordo com os autores, todos os compostos terpenóides analisados, apenas seis apresentaram atividade antibacteriana, que foram: eugenol, carvacrol, timol, isoborneol, vaniline e salicilaldeido a uma concentração de 0,05% ou menos em ágar. Todos esses seis compostos continham um grupo hidroxila que mostrou ter aumentado a atividade antimicrobiana. DOBRYNIN et al (1976), sobre fracionamento em extrato acetônico de folhas secas de *Sálvia officinalis* L., detectaram duas substâncias que foram isoladas por cromatografia em uma coluna de sílica gel com um potencial de atividade frente à *S. aureus*. SABRI et al (1989), isolaram, com extração com álcool de petróleo o componente aegyptinones A (1) e B(2) da raiz de *sálvia aegyptiaca* L. e testaram à atividade antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, o qual demonstrou ter potente atividade frente a esses microrganismos testados.

MOROZUMI (1978) isolou e purificou a substância O-metoxicinamaldeido da canela em pó. O composto isolado mostrou ser inibidor de crescimento de fungos e produção de micotoxina produzida pelos mesmos. A substância inibiu completamente o crescimento de *Aspergillus parasiticus* e *A. flavus* a 100 µg/mL e *A. ochraceus* e *A. versicolor* a 200 µg/mL. De acordo com os dados exibidos pelo autor, a inibição da produção de aflatoxina B1 foi acima de 90%. A substância mostrou também um forte efeito inibidor sobre o crescimento de 5 espécies

dermatofitoses (*Microsporium canis* com MIC 3,12 a 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ). O autor testou também frente as bactérias, porém, das várias bactérias patogênicas testadas, somente *Clostridium botulinum* e *S. aureus* foram inibidos, mas o MIC foi consideravelmente alto em relação aos obtidos quando testado nos fungos.

HITOKOTO et al (1980), também avaliaram o crescimento de três espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus* e detectaram que o eugenol extraído do cravo e timol extraído do tomilho, exibiu completa inibição de crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus vesicolor* a uma concentração de 0,4 mg/mL e que, a concentração de 2 mg/mL, anetol, extraído da semente de anis estrelado inibiu o crescimento de todas as três espécies testadas. MIYAO (1975), reporta que o eugenol foi potencialmente efetivo frente a 6 espécies microbianas isoladas de salsichas tipo vienna, e que quando as salsichas foram testadas em uma solução sanificante com 50% de etanol e 2% de eugenol por 10 segundos, prolongou sua vida de prateleira a 10° C por 12 dias.

KURITA, et al (1981) examinaram e compararam a atividade antifúngica de 40 espécies de componentes de óleos essenciais; Aldeídos aromáticos e alifáticos, álcoois, compostos fenólicos, compostos éter e hidrocarbonetos frente a 7 espécies de fungos (*Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Trichophyton rubrum* (H), *Fonsecaea pedrosoi* (T), *Aspergillus nidulans*, *Penicillium frequentans*, *Penicillium cyclopium*). Os resultados apresentados relatam que Cinamaldeído teve a atividade antifúngica mais alta entre os aldeídos alifáticos examinados, e o perilaldeído e o citral tiveram também uma boa atividade, entretanto citronelal, octanal, nonanal e decanal foram todos muito pobres em atividade. A atividade antifúngica da carvone, uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada, foi considerada baixa em relação ao perilaldeído e citral, um aldeído  $\alpha,\beta$ -insaturado, porém foi muito mais alta que o canfor, uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturado. Dos aldeídos aromáticos, o cuminaldeído foi o que apresentou maior atividade, já em relação aos álcoois, os resultados indicam que, de um modo geral, os álcoois primários dos óleos essenciais têm maior atividade que os secundários e terciários. Em relação aos compostos fenólicos, os autores concluíram que o timol exibiu atividade igual ao p-n-propilfenol; o eugenol teve maior atividade que o guaiacol, que teve maior atividade que o creosol, ao passo que o isoeugenol mostrou mais atividade que o eugenol.

WU et al (1982) isolaram das folhas do alecrim um extrato natural com propriedades antioxidantes maior que comparados ao Butileno Hidroxianisole (BHA) e igual ao Butileno Hidrotolueno BHT (antioxidantes sintéticos usados em alimentos). Dois compostos, Carnosol e ácido ursólico, foram identificados por infravermelho, espectrométrica de massa e núcleo e ressonância magnética. De acordo com os resultados apresentados pelos autores, o composto Carnosol, isolado do alecrim (*Rosmarinus officinallis*), mostrou ser uma ativa substância antioxidante, entretanto o outro componente isolado, o ácido úrsólico, não apresentou efeito antioxidante. INATANI, et al (1982) isolaram um outro componente antioxidante das folhas de alecrim (*Rosmarinus officinallis*), ao qual deram o nome de Rosmanol. Os resultados elucidaram que essa substância isolada quando testada exibiu poder antioxidante equiparado ao carnosol.

Em 1987, COLLINS & CHARLES isolaram as mesmas substâncias antioxidantes, ácido ursólico e carnosol, das folhas de alecrim e compararam os seus poder inibidor com o BHA e BHT, antioxidantes comumente usados em alimentos frente à inibição de crescimento de seis espécies de bactérias e leveduras (*S. aureus*, *E. coli*, *Lactobacillus brevi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhociotorula glutinis* e *Kheyveromyces bulgaris*). Os autores reportam que na concentração utilizada (150 µg/mL), carnosol inibiu todos os microrganismos testados. BHA provou ser mais eficiente do que o ácido ursólico, porém o ácido ursólico mostrou ser mais eficiente do que o BHT. Na concentração de 50 µg/mL, o carnosol causou um decréscimo significativo no crescimento tanto nas bactérias como nas Leveduras, contudo, BHA foi mais efetivo frente às leveduras do que às bactérias, de modo que carnosol provou ser útil como antioxidante e também contribuiu na retardação do crescimento de microrganismos putrefatores em alimentos.

Em estudos realizados por OKA (1964), sobre mecanismos de inibição de preservativos, OKA apresentou uma relação entre a concentração de compostos fenólicos e a inibição de crescimento. De acordo com o autor, a adsorção do preservativo sobre a célula bacteriana, que é o essencial para a inibição, depende fundamentalmente de três fatores: 1 - concentração do preservativo; 2 - célula microbiana, 3 - água no meio. Segundo ele, a ação preservativa de condimentos vegetais (ervas aromáticas) em alimentos pode ser afetada por essa concentração, pois o mesmo avaliou, através de uma comparação, a atividade inibidora de vários compostos sobre o crescimento de células de *S. cerevisiae*, entre eles, timol, o

principal componente do óleo essencial da sálvia, foi aproximadamente 4 vezes mais efetivo que o ácido sórbico.

De acordo com SHELEF (1986), os condimentos vegetais (ervas aromáticas) afetam todas as fases do crescimento microbiano: A fase lag é prolongada, a velocidade de crescimento durante a fase Logarítmica é reduzida, e o número total de células é reduzido. Essas conclusões reportadas por SHELEF, também concordam com as conclusões reportadas por BACK, et al (1990) e EVERTING & DEIBEL (1992).

BACK, et al (1990) demonstraram que o Alho, a cebola e a mostarda, cada um teve um efeito bacteriostático sobre *L. monocytogenes* V7, manifestado pelo aumento do período Lag, tempo de geração ou ambos. A cebola afetou o tempo de geração mais que o período Lag de *L. mopnocytoenes*, e em culturas incubadas a 35° C, a cebola causou crescimento máximo. A mostarda afetou o período Lag de *L. monocytogenes* mais que outros crescimentos paramétricos, aumentando o período Lag; a canela na cultura de *L. monocytogenes* incubada a 4° C e 35° C afetou todo crescimento paramétrico desfavoravelmente e o período Lag aumentou. O cravo, em cultura de *Listeria* incubada a 35° C, decresceu o período Lag e o crescimento máximo, e aumentou o tempo de geração. EVERTING & DEIBEL (1992) avaliaram o comportamento de estirpes de *Listeria monocytognes* (SCOTT A) frente a três condimentos (cravo, orégano e sálvia) em três concentrações (0,1; 0,5 e 1,0%) em duas temperaturas (24° C e 4° C) e de acordo com os mesmos, a concentração de 0,1%, os condimentos retardaram superficialmente o crescimento de *L. monocytogenes* em ambas as temperaturas de incubação, entretanto todos os três condimentos efetivamente controlaram o crescimento do organismo a concentração de 0,5 e a 1,0 %, e o cravo, nessas duas concentrações, apresentou efeito bactericida frente a *L. monocytogenes*.

Conforme JAY (1994), de um total de 21 compostos examinados que conferem sabor, aproximadamente à metade teve concentração mínima inibitória (MIC) de 1000 ppm ou menos, tanto frente a bactérias como frente a fungos, e todos foram sensíveis ao pH, aumentando seu poder de inibição conforme diminuía o pH e a temperatura de incubação. O diacetil, um dos agentes mais eficazes que confere sabor, responsável pelo odor da manteiga, foi mais eficaz a bactérias Gram-negativas e fungos do que frente a bactérias Gram-positivas. De acordo com o

mesmo autor, quando se testou em ágar para contagem, a pH 6,0 e incubação a 30° C, todos exceto 1 de um total de 25 bactérias Gram-negativas e 15 de um total de 16 microrganismos entre leveduras e bolores, foram inibitórios a uma concentração de 300 ppm. Em pH 6,0 e incubação a 5° C e, ágar nutriente, < 10 ppm foi suficiente para inibir *P. fluorescens*, *P. geniculata* e *E. faecalis*, entretanto, nas mesmas condições, exceto pela incubação realizada a 30° C, para inibir esses e a outros microrganismos foram necessários aproximadamente 240 ppm.

O autor concluiu, desse experimento, que o diacetil elimina a utilização da arginina por reagir com as proteínas fixadoras da mesma das bactérias Gram-negativas, e a maior resistência das bactérias Gram-positivas é devido à carência de proteínas periplásmicas fixadoras similares à que possui uma maior reserva de aminoácidos. O agente l-carvona e o agente d-carvona, que proporcionam aromas diferentes, ambos são antimicrobianos, sendo que l-isómero mais eficaz que o isómero dextrógeno, contudo, a uma concentração de 1000 ppm ou menos, ambos são mais eficazes frente a fungos que frente às bactérias. Finalacetaldeído demonstrou que inibe *S. aureus* a uma concentração de 100 ppm e a *Candida albicans* a uma concentração de 500 ppm, e o mentol inibe *S. aureus* a uma concentração de 32 ppm, porém *E. coli* e *C. albicans* somente a uma concentração de 500 ppm, e a vanilina e a etil-vanilina são inibidoras, em especial de fungos, a uma concentração < 1000ppm. (JAY & RIVERS, 1984).

### **2.1.9. Efeito da combinação de condimentos vegetais com processos térmicos e pH**

ANDERSON et al (1953) estudaram a ação inibidora de 12 óleos essenciais frente a *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces globiformis* e Leveduras putrefadoras n° 7D<sup>3</sup>. Em caldo dextrose a pH 7,2 revelaram uma larga variação na efetivação dos diferentes óleos testados. Dos 12 óleos essenciais testados, os óleos de mostarda, cebola, alho e canela exibiram maior atividade inibitória. Todavia quando o pH do caldo dextrose foi reduzido a 4,0; 4,5 e 5,0, a ação inibidora de muitos dos óleos foi aumentando,

---

<sup>3</sup> isolado por ANDERSON et al (1951) de pickles fresco processado

entretanto um único organismo, Levedura putrefadora n° 7D requereu uma concentração mais alta de óleo essencial a níveis baixos de pH.

BEUCHAT (1976) examinou a sobrevivência do *Vibrio parahaemolyticus* em suco de tomate adicionado de óleo essencial de orégano e tomilho em pH ajustado a 4,4 - 6,5, incubado a 10, 22 e 35° C. A presença de células viáveis de *Vibrio parahaemolyticus* não foi detectada no suco de tomate a pH 4,4 após 24 horas a 10 e 22° C ou após 4 horas a 35° C. Entretanto, após 24 horas não ocorreu uma redução em contagem de células viáveis do suco de tomate a pH ajustado a 5,6 - 6,5.

FARBOARD et al (1976) analisaram o efeito de diferentes concentrações de extrato de alecrim sobre a sobrevivência de *staphylococcus aureus* adicionados em carne de frango desossada mecanicamente e estocados a 5° C por 12 dias, observando que contagens de *Staphylococci* coagulase positivo em controle e amostras contendo 0,1 e 1% de extrato de alecrim permaneceram relativamente constantes durante o período de estocagem, entretanto, em relação à contagem total não foi evidenciado efeito bacteriostático e um aumento de 4 Logs em contagem total foi observado após 12 dias de estocagem a 5°C.

Os autores concluíram que o efeito bacteriostático não foi devido à influência do extrato de alecrim, mas à baixa temperatura e competitividade dos microrganismos psicotróficos, porém não descartaram o problema da insolubilidade do alecrim em água e o aumento na fase sólida do substrato, pois quando aumentaram a concentração de alecrim a 5% ocorreu um efeito bactericida sobre *S. aureus*, atribuindo à alta concentração do alecrim na fase aquosa, concluindo que o efeito sinérgico entre extrato de alecrim, baixa temperatura de estocagem e repressão pelo crescimento de microrganismos psicotróficos não pode ser omitido.

WITT et al (1979), após vários testes laboratoriais, observaram que o óleo essencial de cebola bem como o óleo essencial de alho inibiu a toxina produzida por *Clostridium botulinum* tipo A, ressaltando que a inibição não foi causada exclusivamente pela ação dos óleos essenciais testados, mas dependeu diretamente da temperatura de incubação. Contudo, para a toxina produzida pelo *Clostridium botulinum* tipo B após 2 períodos de incubação (7 e 14 dias), os autores relatam que durante os primeiros 7 dias ocorreu uma diferença na toxina produzida (sistema com

óleo de alho e cebola) e o controle, porém, após 14 dias de incubação, a diferença foi insignificante.

SALEEM & AL-DELAIFY (1982), realizando estudos da atividade inibitória do extrato de cebola frente a *Bacillus cereus*, perceberam que o extrato do bulbo de cebola estocado a -18° C inibiu mais o crescimento de *B.cereus* do que o extrato de bulbos de cebola estocados a 15 - 35° C por 6 meses, e que a grande atividade dos extratos foi encontrada quando foram extraídos e deixados a 30° C por 4 horas antes da filtração, pois quando o macerado foi realizado a 4° C, 6 horas foram necessárias para atingir seu grande teste de atividade. Observaram também, que a exposição do extrato a uma temperatura de 80-90° C por um tempo de 5 minutos destrói completamente a atividade antibacteriana do extrato de bulbo de cebola.

BACK, et al (1990) estudaram o comportamento de *Listeria monocytogenes* estirpe V7 frente à concentração de 0,5% de especiarias selecionadas (alho, cebola, mostarda, canela e cravo) em duas temperaturas, 35°C e 4° C, com o objetivo de avaliar a reação do patógeno na presença desses condimentos quando o alimento é refrigerado ou quando o alimento é estocado a temperaturas elevadas. Os autores concluíram que o tipo e o tamanho da inibição dependem da espécie de condimento utilizado e da temperatura de incubação, pois a canela e o cravo inibiram *L. monocytogenes* bem mais que os outros condimentos, sendo que o cravo exibiu um pronunciado efeito bactericida e bacteriostático.

De acordo com os autores mencionados anteriormente, a refrigeração sinergicamente aumenta a inibição de *L. monocytogenes* por alguns dos condimentos avaliados. Alho, cebola e mostarda, cada um tem efeito bacteriostático sobre *L. monocytogenes*, que foi manifestado pelo aumento do período Lag, tempo de geração ou ambos. O efeito do alho sobre o crescimento paramétrico de *L. monocytogenes* variou a diferentes temperaturas de incubação, entretanto, a cebola afetou o tempo de geração (2.6-1.9, a 4°C e 35°C, respectivamente) mais que o período Lag de *L. monocytogenes*, e em culturas incubadas a 35°C, a cebola causou crescimento máximo e decresceu por 1.2 ordens de magnitude. A mostarda afetou o período Lag de *L. monocytogenes* mais que o outro crescimento paramétrico; o período Lag aumentou 4.7 e 2.4 em culturas incubadas a 4°C e 35°C, respectivamente, concluindo que a refrigeração aumentou o efeito inibidor de

mostarda frente a *L. monocytogenes*, mas o aumento não foi evidenciado para o alho e a cebola.

Os mesmos autores elucidaram ainda que a canela na cultura de *L. monocytogenes* incubada a 4°C e 35°C afetou todo o crescimento paramétrico desfavoravelmente; o efeito combinado de canela e temperatura de refrigeração sobre *L. monocytogenes* difere com o crescimento paramétrico, consideravelmente, mas o período Lag aumentou sinergeticamente pela combinação. O cravo, em cultura de *Listeria* incubada a 35° C, decresceu o período Lag e crescimento máximo, e aumentou o tempo de geração, entretanto, a 4° C o cravo inativou *L. monocytogenes*, concluindo-se que a combinação do efeito de baixa temperatura e a presença de cravo foi bactericida sobre *L. monocytogenes*.

EVERTING & DEIBEL (1992) avaliaram o comportamento de estirpes de *Listeria monocytogenes* (SCOTT A) frente a três condimentos (cravo, orégano e sálvia) em três concentrações (0,1; 0,5 e 1,0%) em duas temperaturas (24°C e 4°C). De acordo com os mesmos, a concentração de 0,1% os condimentos retardaram superficialmente o crescimento de *L. monocytogenes* em ambas as temperaturas de incubação, entretanto todos os três condimentos efetivamente controlaram o crescimento do organismo a concentração de 0,5 e a 1,0 %, e o cravo, nessas duas concentrações, apresentou efeito bactericida frente a *L. monocytogenes*; a 0,5% o cravo teve > 2 Log redução em UFC após 14 dias a 4°C e por 24h a 24°C, e a 1,0% o cravo teve > 5 Log de redução em UFC após 7 dias a 4°C e após 3 horas a 24° C; já o orégano foi bacteriostático nessas duas concentrações (0,5 e 1,0%), a contagem de microrganismo variou pouco durante o período total de incubação a 4° C e a 24° C, porém a sálvia, a concentração de 0,5 e 1 0%, exibiu um efeito bacteriostático sobre o organismo a 24° C. Mas quando se testou essas duas concentrações a 4° C, os resultados foram drasticamente diferentes, >3 Log e >5 Log decresceu em UFC com 0,5 e 1,0%, respectivamente, após 21 dias de incubação. Os resultados mostram que a temperatura de refrigeração aumentou o poder de inibição da sálvia, mas não do cravo e do orégano, pois quando 0,5 e 1,0% do cravo foram testados, os microrganismos morreram mais rapidamente a 24° C que a 4° C.

### **2.1.10. Efeito de Combinações de condimentos vegetais e outros antimicrobianos.**

Segundo SHELEF, 1986, os condimentos vegetais (ervas aromáticas) ajudam mais outros antimicrobianos em controlar o crescimento microbiano em alimentos. SHELEF elucida que combinações de condimentos vegetais (ervas aromáticas) com ácidos, que aumentam a dissociação, e com sal ou açúcar, que reduzem a atividade de água, são de especial interesse na preservação de alimentos. Condimentos vegetais classificados como “savory” (dar sabor), como a sálvia e o orégano, por exemplo, são freqüentemente combinados com sal, enquanto aquele termo “sweet” (doce), como por exemplo, noz moscada, gengibre, anis são combinados com açúcar.

Em estudos realizados por MORI et al (1974), citado por SHELEF, 1986, foi observado um efeito desejável pela combinação de ácido sórbico com o óleo essencial de canela, coentro, aneto e aipo. ANAND & JOHAR, 1957, citados também por SHELEF, 1986, em testes realizados em polpa de manga, mostraram que na presença de sal (16%) 0,3% de canela e 0,2% de cravo tiveram uma efetividade em inibição de germinação de esporos de fungos e que somente com 3% de canela e 0,6% de cravo obteve-se efetividade na ausência de sal, demonstrando que a canela e o cravo sozinhos tiveram efetividade, porém foram mais efetivos quando combinados com uma concentração de sal.

MAC NEIL et al (1973) realizaram experimentos em duas linhas de processamento comercial de carnes de frango desossada mecanicamente, com materiais tal como polifosfatos, butilato hidroxianisole (BHA), ácido cítrico e extrato de alecrim (RSE) com o objetivo de manter os níveis do ácido tiobarbiturico (TBA) baixo, bem como reduzir o número de bactérias presentes. Os autores elucidam que amostras de carne tratadas com os componentes exibiram substancialmente valores baixos de TBA em relação às amostras não tratadas, e que 0,05% de RSE e BHA + ácido cítrico foram o mais efetivo seguido pelo polifosfato e 0,01% de RSE. Todas as amostras que tiveram tratamento simulado com os compostos tiveram baixa contagem bacteriana na primeira semana de estocagem a 3°C em relação às amostras não tratadas, entretanto, este efeito benéfico não foi evidenciado em armazenagem além da primeira semana. A mudança no gosto foi avaliada por um painel sensorial utilizando o teste da multicomparação, o teste de Ducan's, e

apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre tratamento, tempo de estocagem e juizes, e os autores verificaram que as amostras tratadas com 0,01% de RSE tiveram melhores resultados comparados a outros tratamentos, inclusive o controle não tratado.

Conclui-se, então, que os compostos testados por MCNEIL e colaboradores foram efetivos mantendo os valores de TBA baixos, baixa contagem em placa por um período limitado e melhoraram o gosto da simulada carne de frango desossada mecanicamente, entretanto verifica-se que um dos problemas apontados pelos autores neste estudo foi à inabilidade para se determinar o nível atual do material tratado no final da carne de frango desossada mecanicamente, pois alguns dos materiais foram expelidos da máquina junto com o osso e a fração desperdiçada.

Em estudos realizados por MORI et al (1974), foi observado um efeito desejável pela combinação de ácido sórbico com o óleo essencial de canela, coentro, aneto e aipo.

KURITA & KOIKE (1982) avaliaram o efeito antimicrobiano de vários componentes de óleos essenciais na presença de várias concentrações de cloreto de sódio (NaCl) frente a microrganismos isolados do ar e cultura pura de fungos (*Aspergillus oryzae*; *A. niger*; *A. ochraceus*; *Penicillium citrinum*; *P. viridicatum*; *P. cyclopium*; *Fusarium graminearum*; *Aureobasidium pullulans* e *Paecilomyces lilacinus*). Os autores reportaram que em uma concentração de 15% de NaCl, várias espécies de microrganismos cresceram somente após 7 a 10 dias de incubação a 27°C e que quando a concentração de NaCl foi de 3%, permitiu o crescimento de várias espécies de microrganismos em menos dias de incubação a 27°C.

Todavia, na presença de 7-10% de NaCl, cinamaldeído, citral ( $\alpha$ ,  $\beta$  - aldeído alifático insaturado), citronelos, perilalcool e geraniol (álcool primário), todos exibiram potente efeito a uma concentração abaixo de 1mg. Cinamaldeído e eugenol foram também potentes, porém L-mentol teve potente efeito somente a 2mg. Citroneol, D-carvone, vanilini e linalol tiveram efeito médio, e 1,8-cineole, anetole e safrole foram quase inefetivos a uma concentração de 2mg. Hidrocarbonetos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, camfene,  $\beta$ -mircene,  $\beta$ -cariofiline p-cimene) foram inefetivos até a concentração de 2ppm. Esses resultados de KURITA & KOIKE sugerem que certos componentes de óleos essenciais são efetivamente aplicáveis para preservar alimentos contendo mais que 7% de NaCl.

KURITA & KOITE, através dos resultados encontrados com a combinação dos componentes dos óleos essenciais e 7 a 10% de NaCl, baseando-se no fato de que certas ervas contêm relativamente bastante óleo essencial, resolveram, do ponto de vista prático, testar a ação de algumas ervas comumente utilizadas como condimentos no Japão (folhas frescas de louro, pimenta japonesa e cereja) em uma comida japonesa, o “missô” (uma pasta de feijão). Ao contrário do missô desprovido de condimentos, no qual ocorreu crescimento de colônias, no missô que continha as folhas dos condimentos, não se desenvolveram colônias após o período de uma semana. Estes resultados obtidos sugerem que certas plantas com alto conteúdo em óleo essencial, quando aplicadas, podem preservar alimentos que contenham 10% ou mais de NaCl.

AZZOUZ & BULLERMAN (1982) avaliaram a combinação de diferentes níveis de Sorbato de potássio e cravo frente a *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *Penicillium spp.* *Penicillium citrinum*, *P. roqueforti*, *P. patulum*. Os autores verificaram que essa combinação aumentou o efeito inibidor sobre o crescimento de todos os microrganismos testados, indicando uma possível ação sinérgica entre eles. Os fungos foram testados com diferentes níveis de sorbato (0,1%; 0,2%; 0,3%) em combinação com 0,1% de cravo e o efeito foi aditivo em todos os instantes, e, em alguns instantes, foram mais sinérgicos.

BIOZZO et al (1989) combinaram diferentes concentrações de óleo essencial de cravo (0,4%) dispersas em uma solução de açúcar, e testou o efeito da ação antimicrobiana combinada frente a vários microrganismos como: *Candida albicans*, *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*s e cinco estirpes de *S. aureus*. A *Candida albicans* foi inoculada a uma população de  $10^4$  UFC/mL e os demais a uma população de  $10^7$  UFC/mL. Os autores reportaram que o efeito de 0,4% de óleo de cravo suplementado com 63% de açúcar quando dispersos em meio de cultura em caldo exibiu um pronunciado efeito inibidor, inibindo todos os microrganismos inoculados após 2-7 minutos de exposição.

Contudo, os resultados demonstraram que a ação antimicrobiana não foi devido ao açúcar, e sim devido ao óleo de cravo, embora se verificasse que o efeito antimicrobiano (bacteriostático antes que bactericida) foi grandemente excedido pela concentração de açúcar, o qual provocou uma rápida ação bactericida do óleo de cravo, pois o óleo de cravo é praticamente insolúvel em água e muito bem disperso em um veículo antes do uso. Notou-se, neste experimento, que o óleo de cravo foi

facilmente disperso em uma solução de açúcar a uma concentração de 63%, proporcionando uma suspensão que permaneceu estável durante vários dias, que foi atribuído à alta viscosidade devido à concentração de açúcar, e essa estabilidade proporcionada é bastante comprida para sua utilização prática; observou-se também que uma rápida movimentação produz a re-dispersão do óleo de cravo. BIOZZO et al (1989)

SHELEF et al (1984) analisaram o efeito inibidor da sálvia e 1,5% de sal, sozinhos e em combinação, sobre o crescimento de *Bacillus cereus* em arroz e carne. A sálvia foi utilizada em uma concentração de 0,5% para o arroz e 2,0% para a carne. Os autores observaram que quando testaram somente o sal obteve-se uma redução em número de células após 24 horas, entretanto, quando se testou somente a sálvia, a redução na contagem de células em arroz e carne foi de 2,6 e 2,1 ciclos Logarítmicos, respectivamente, e que uma combinação de sal e sálvia aumentou mais o efeito inibidor, reduzindo a contagem em número de células em arroz e em carne por 3,5 e 2,6 ciclos Logarítmicos.

Os mesmos autores continuaram a avaliação com base nos testes de combinação do sal e da sálvia, testando o efeito do conteúdo de água sobre a inibição do crescimento de *Bacillus cereus* em alimentos como frango e talharim, contendo 0,5% de sálvia e em carne contendo 2,5% de sálvia. Foram realizadas amostras diluídas e amostras não diluídas dos alimentos para controle e comparação com amostras que continham sálvia. Os autores chegaram à conclusão que enquanto na ausência de sálvia a velocidade de crescimento nos alimentos não diluídos foi apenas levemente mais rápida do que em amostras de alimentos diluídos, contudo a inibição foi observada nas amostras diluídas contendo sálvia de frango, talharim e carne.

### **2.1.11. Efeito de condimentos vegetais sobre a estimulação do metabolismo e esporos microbianos.**

Em estudos realizados, é reportado que condimentos vegetais (ervas aromáticas) dentro de condições favoráveis estimulam a atividade metabólica em microrganismos e que as bactérias ácidas lácticas demonstraram ser relativamente resistente ao efeito inibidor dos condimentos vegetais que outros microrganismos

Gram positivos. (SHELEF et al, 1980; SALZER, 1977; ZAIKA & KISSINGER, 1979). SALZER et al (1977) observaram um efeito inibidor da pimenta a uma concentração de 0,08 a 0,2% em salsichas frescas sobre *Escherichia coli* enquanto que o *Lactobacilli* requeria uma concentração de 0,3% para ser inibido. Ademais, alguns condimentos vegetais exercem um efeito estimulador sobre esses microrganismos, que resulta no aumento de crescimento e produção de ácido.

WRIGHT, et al (1954) avaliaram o efeito de oito condimentos vegetais (cominho, noz moscada, sementes de cardamomo, gengibre, canela, tomilho, três espécies de mostarda - *Brassica alba*, *B. juncea*, *B. nigra*); óleo essencial de noz moscada e canela, óleo resina de gengibre e óleo essencial solubilizado contendo agentes emulsificantes de cominho, noz moscada, cardamomo, gengibre e canela, sobre a fermentação de leveduras. De acordo com os autores, baixos níveis de condimentos exibiram efeito promovido sobre a produção de gás em simples suspensão de levedura-açúcar e também em meio mais complexo incluindo farinha, levedura, tiamina, uma mistura sintética contendo asparagine, tiamina, piridoxina, ácido nicotino e sais inorgânicos.

Entretanto em níveis altos, particularmente a canela retardou a evolução de produção de gás em simples suspensão de levedura-açúcar, e o gás promovido do efeito dos condimentos foi impedido pela farinha de mostarda com forte inibição de crescimento da levedura. Em relação ao óleo essencial, pouca ou nenhuma aceleração da atividade foi encontrada, e no caso da canela, retardou a produção de gás. O gás, fator promovido, ficou estável na presença dos condimentos após extração com éter, autoclavagem, tratamento com óxido de etileno e prolongada fervura, e não foi encontrado em cinzas ou em carvão vegetal clarificado filtrado pela fervura dos condimentos, porém foi encontrado nos resíduos do líquido do sobrenadante após centrifugação da suspensão dos condimentos, o qual se verificou um baixo progresso do fator gás durante a centrifugação, particularmente na suspensão fervida de cominho. (WRIGHT, et al,1954)

KISSINGER & ZAIKA (1978) estudaram o efeito de uma mistura de condimentos (pimenta preta, noz moscada, pimenta da Jamaica, pimenta vermelha, cravo, canela, gengibre e mostarda) sobre o salsichão do Líbano e os seus principais ingredientes (pimenta negra, pimenta da Jamaica, noz moscada), na produção de ácido junto a uma cultura Starter contendo *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus cerevisiae* em um meio líquido. Os autores verificaram que esses

condimentos estimularam a produção de ácido pelos organismos contidos na cultura Starter, embora alguns condimentos contidos no salsichão do Líbano, ser conhecidos por terem propriedades antimicrobianas. A mistura de condimentos estimulou o *L. plantarum* mais do que o *P. cerevisiae* quando foram cultivados separadamente. Produção máxima de ácido foi obtida em amostras que continham pimenta preta, pimenta da Jamaica, e o salsichão do Líbano misturado com condimentos a concentração de 12g/l, porém, a nível de 8g/l, conseguiu-se a produção máxima de ácido pela noz moscada. A conclusão dos autores foi de que a pimenta preta, a pimenta da Jamaica, a noz moscada e o *Salsichão do Líbano*, misturados com condimentos não estimularam o crescimento da população do organismo da cultura starter, mas estimularam a produção de ácido por essa bactéria e o multi-componente de mistura de condimentos exerce um grande efeito que estimula a produção de ácido pela bactéria starter do que o condimento individualmente.

ZAICA, et al (1978) analisaram o efeito de condimentos (pimenta preta, noz moscada, pimenta da Jamaica, pimenta vermelha, cravo, canela, gengibre, mostarda) e diferentes concentrações de NaCl sobre a fermentação de salsichão do Líbano, pois essa combinação mostrou afetar o curso da fermentação durante a manufatura do salsichão do Líbano. De acordo com os resultados exibidos pelos autores, a mistura desses nove condimentos utilizados na formulação do salsichão aumentou a fermentação, e que tanto nos condimentos esterelizados como nos condimentos não esterelizados, o aumento provocado é o mesmo, comprovando que o efeito estimulante não foi devido aos microrganismos contaminantes.

Similar efeito estimulante dos condimentos foi observado quando o salsichão foi preparado por uma flora natural fermentadora e por adição de cultura starter uma mistura de *Pediococcus cerevisiae* e *Lactobacillus plantarum*. Todavia, quando se aumentou a concentração de NaCl de 1 a 7%, conseguiu-se uma redução na fermentação com um concomitante decréscimo na produção de ácido láctico, sendo que o uso abaixo de 2% de NaCl resulta em uma salsicha pobre em textura. Os autores concluíram neste experimento que salsichas contendo 7% de NaCl apresentaram muito pouca fermentação na ausência de condimentos e apresentaram aumento na fermentação quando os condimentos foram adicionados, e em uma avaliação da fermentação, textura, cor e palatabilidade de salsichas contendo 2 a 3% de NaCl, foi mais bem aceito. (ZAICA, et al,1978)

ZAIKA & KINSSINGER (1979), avaliaram o efeito individual de condimentos sobre culturas *starters* utilizando um meio de cultura líquido contendo extrato de carne e açúcar, designados para estimular a fermentação de salsichas, o qual, em muitos casos, as bactérias cresceram na presença de 12g/l de condimentos e aumentou a produção de quantidade de ácido. Porém, quando se aumentou a quantidade de cravo, ocorreu um pronunciado aumento na inibição, apesar de que o cravo foi o mais estimulador condimento quando se testou em concentrações mais baixas (0,5 g/l), resultando um aumento na produção de ácido.

De acordo com ZAIKA & KINSSINGER (1981), concentrações crescentes de orégano 0,5 - 8 g/l promovem um efeito inibidor e estimulador sobre *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus cerevisiae*. O componente inibitório do orégano foi removido por extração com solvente e autoclavação, e resíduos desses tratamentos estimularam a produção de ácido pelo organismo. Em uma concentração de 4 g/l de orégano, ocorreu um declínio em número de bactérias de um valor inicial de  $2.2 \times 10^4$  cells/mL a 63 cells/mL, mas aumentou para  $6.0 \times 10^6$  cells/mL após 5 dias. O orégano, a uma concentração de 8g/l, foi bactericida para *L. plantarum*. *P. cerevisiae* foi mais sensível que *L. plantarum* ao orégano, e uma concentração de 4g/l de orégano foi o suficiente para inibir completamente o crescimento e a produção de ácido da mesma. Em resumo, os autores concluíram pelos resultados que a bactéria é inibida pelo orégano adicionado ao alimento, mas que também desenvolve resistência ao efeito inibidor desse condimento, pois foi verificado que quando o organismo cresceu em um meio contendo uma concentração quase letal de orégano, atrasou o crescimento e a produção de ácido, desenvolveu resistência aos efeitos deletérios dos condimentos.

Em continuidade, em 1983, os mesmos autores juntos a WASSERMAN, observaram que concentrações crescentes (0,5 - 8g/l) de orégano, alecrim, sálvia e tomilho, progressivamente, retardaram o crescimento e produção de ácido por *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici* em um meio líquido, e que após ter sido superado o efeito da atividade bacteriostática, todas essas ervas em estudo promoveram uma forte estimulação na produção de ácido. Conforme os autores, o relativo efeito inibidor das ervas para ambos os microrganismos foi orégano >> alecrim = sálvia > tomilho, apesar de que *L. plantarum* foi mais resistente que *P. acidilactici* ao efeito tóxico das ervas. Os organismos de cultura exibiram uma fermentação demorada na presença de concentrações subletal, e quando a sub-

cultura dentro de um meio fresco tinha idêntica concentração de ervas, iniciava-se fermentação sem demora, indicando desenvolvimento de resistência aos efeitos das ervas, e, além disso, a bactéria que teve resistência a uma erva foi também resistente às outras três ervas.

Em investigações subseqüentes, ZAIKA & KINSSIGER 1984 determinaram que o fator estimulante dos condimentos fosse encontrado na insolubilidade do solvente, fração ácida solúvel, e mostraram que o manganês é um elemento conhecido como essencial para as bactérias lácticas, demonstrando que a estimulação de atividade de 0,1 de extrato de condimentos aumenta com o acréscimo de manganês, e que foi possível observar esse efeito estimulante por causa do meio de cultura utilizado, extrato de carne, contendo unicamente baixo nível de manganês, insuficiente para uma ótima produção de ácido pelas bactérias ácidas lácticas.

ANDERSON et al (1953) realizaram experimentos para verificar a influência de várias concentrações de óleos essenciais (cravo, cebola, aneto, canela) à elevada temperatura sobre um resistente térmico, o *Bacillus thermoacidurans*, suspenso em suco de tomate e sobre leveduras deterioradoras de pickles, organismo 7D em um meio com salmoura (0,5% ácido acético e 5,0% sal - pH 2.7). De acordo com os autores, os óleos de cravo, aneto e canela a concentração de 210ppm em suco de tomate, o tempo de destruição de *B. thermoacidurans* foi levemente reduzido unicamente a uma temperatura de 100° C, contudo, em relação ao óleo de cebola, que foi o mais efetivo dos óleos essenciais testados na redução da resistência térmica de *B. thermoacidurans*, uma concentração de 62 ppm em suco de tomate reduziu a resistência térmica do mesmo por aproximadamente 42%. Em relação à levedura deterioradora nº 7D, os resultados mostraram que a canela e a cebola foram as mais efetivas com concentrações de 210 e 62 ppm, reduzindo a resistência térmica do organismo nº 7D a 51,8° C por 99 e 97%, respectivamente. Os autores compararam os dois resultados, atribuindo a relativa diferença na melhor ação desses óleos sobre esporos do que sobre células vegetativas.

MANTIS et al (1979) analisaram o efeito de um extrato de cebola (extrato-água) sobre esporos de *Clostridium perfringens*. Os resultados demonstram que o inoculo de  $10^2$  -  $10^4$  esporos/mL, foi inibido quando a concentração do extrato excedeu a 1%, enquanto que foi preciso 2% de extrato para inibir o crescimento do inoculo de  $10^5$  esporos/mL.

SHELEF et al (1984) testaram duas populações de esporos de *Bacillus cereus* USDA 201 em caldo, arroz, frango, talharim e carne. Em testes com uma população de  $10^4$  esporos de *Bacillus cereus*, a germinação não foi atrapalhada pela sálvia, ou seja, a sálvia permitiu a germinação, mas o crescimento dos esporos foi inibido e influenciado de uma maneira similar quando comparado com os testes realizados com células vegetativas. De acordo com os autores, o crescimento dos esporos (Log UFC/g) foi baixo em meio NB (7.4) e mais extensivo em frango e talharim (8.8), e em carne (9.0), e níveis de 0,15% de sálvia em caldo e 1% em arroz efetivamente inibiram o crescimento, entretanto 2,5% de sálvia foram necessários para conseguir uma inibição parcial em frango, talharim e em carne. Contagens Logarítmicas após 48 horas permaneceram baixas em caldo (3.9), diminuiu para 3.4 em arroz, e aumentou para 6.5 e 8.5 em frango e talharim e em carne, respectivamente. Contudo, quando se utilizou um inoculo de  $10^6$  em meio NB, o Logarítmico UFC/mL de 8.1 foi alcançado após 24 horas a  $35^{\circ}$  C, e uma concentração de 1% de sálvia em NB reduziu a contagem da população microbiana para abaixo de 2 ciclos Logarítmicos.

### 2.1.12. Atividade Antimicrobiana e Antioxidante de Condimentos Vegetais em alimentos.

Conforme SHELEF 1986, poucas avaliações realizadas com condimentos vegetais (ervas aromáticas) em meio de cultura são métodos do ponto de vista microbiológico, pois eles são de limitados valores em testes de confirmação em alimentos. São poucos os que apóiam testes somente de condimentos em estudos em alimentos, estudando apenas mudanças em contagem microbiana após um período de tempo necessário a uma simples indicação tal como visualização da turvação e medidas da zona de inibição. Estudos realizados com alimentos estão sumariados no quadro 2.10.

O uso de óleo essencial de mostarda para prevenir o crescimento de microrganismos deterioradores em alimentos foi reportado por BLUM & FABIAN (1943), quando observaram a inibição de *A. aceti*, *S. ellipsoideus*, *S. cerevisiae* e *Mycoderma vini* em pickles e por KOSKER et al (1949) quando perceberam a inibição de leveduras em cidra de maçã a uma concentração de 11 a 22 ppm de óleo. BULLERMAN (1974), conduziu estudos em pão de centeio, trigo, branco e passas inoculando 2 níveis de esporos (10 e 10 esporos) de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 e NRRL 3000 e os resultados demonstraram que a Aflatoxina B1 e G1 foram formadas sobre os pães de centeio, trigo, mas foram baixas e ausentes sobre o pão com passas, contendo 1% de canela, e grandes inibições foram observadas quando foram inoculados níveis mais baixos de esporos. Nkanga & Uraih (1981) avaliaram o efeito de 1% de cravo, alho, gengibre, pimenta preta e vermelha sobre crescimento de *S. aureus* em mistura de carnes (10% carne e 1% NaCl), concluindo que em amostras controles contendo  $4.2 \times 10^8$  cels/mL em tempo zero e  $6.2 \times 10^8$  cels/mL após 18 horas, esse crescimento em amostras contendo cravo e pimentas vermelhas foram inibidas, sendo que o alho e a pimenta preta foram pouco inibitórios e a concentração de 10% o cravo e a pimenta vermelha foram bactericidas frente a *S. aureus* em mistura de carne.

Condimentos	Nível efetivo %	Alimento	Microrganismo	Referências
Canela	3 1	Picles de manga Pão com passa	<i>A. niger</i> <i>A. parasiticus</i>	Anand & Jahar 1957 Bullerman 1974
cravo	0,6	Picles de manga	<i>A. niger</i>	Anand&Jahar 1957
Pimenta	0,08 - 0,2 0,3	Salsicha fresca	<i>E. coli</i> <i>Lactobacilli</i> <i>Micrococci</i>	Salzer et al 1977
Alecrim (Extrato)	5,0	Carne frango e peru (MDPM) <sup>1</sup>	<i>S. aureus</i>	Farboard et al 1976
Alecrim	0,0,5+BHA 0,01+Polifosfato	frango	<i>Contagem total</i>	MacNeil, 1973
Cravo	1,0	Mistura de carne	<i>S. aureus</i>	Nkanga & Uraih 1981
Pimenta da Jamaica Folha de Louro (óleo essencial)	nr	missô	<i>Contagem total</i>	Kurita & Koite, 1982
Sálvia	0,4 a < 2,5 1,0 a < 2,5 1,0 a < 2,5 ≥ 2,5	Arroz Frango Talha rim Carne vermelha	<i>S. aureus</i> , <i>B.</i> <i>cereus</i> , <i>S.</i> <i>typhimurium</i> , <i>Pseudomonas spp</i>	Shelef, 1984
Tomilho (óleo essencial)	0,5	Carne de porco	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Aureli et al 1992
Cravo Orégano	> 1	Carne semi-fluida	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Everting & Deibel 1992

Quadro 2.10. Estudos de inibição por condimentos vegetais (ervas aromáticas) realizados em alimentos

nr = não revelados;

MDPM = carne desossada mecanicamente

ERVERTING & DEIBEL (1992), estudaram o efeito inibidor do cravo e do orégano na forma pura sobre o crescimento e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* Scott A em carne semifluida a concentração de 1% em duas temperaturas, 4° C e 24° C, verificando que na concentração utilizada tiveram ambos pouco efeito inibidor e atribuíram ao fato de que alimentos com muita proteína, lipídios e com pouca quantidade de água requerem uma concentração mais alta do preservativo para o controle de microrganismos. Todavia, quando AURELI, P. et al (1992) testaram a sensibilidade de *listeria monocytogenes* frente ao tomilho, que possui as mesmas características do orégano, pois pertencem à mesma família. Na forma de óleo essencial em carne de porco moída, obtiveram uma redução na população de *L. monocytogenes* após a primeira semana de armazenagem.

SHELEF et al (1984) analisaram a sensibilidade de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas sp.* e *Salmonella typhimurium* frente à sálvia em alimentos como arroz, frango, talharim e carne. A inibição em arroz foi mais alta,

com MIC (0,4 a < 2,5%), frango e talharim apresentaram MIC (1,0 a < 2,5%) e carne pequena ou nenhuma inibição foi vista a nível > 2,5% de sálvia; constatando que alimentos de composição mais complexa requerem concentrações mais altas de preservativos para a inibição de crescimento bacteriano. O arroz não contém lipídio, possui pouca proteína, é alto em carboidratos, já o frango e o talharim contêm moderados níveis de todos os três nutrientes, e carne é rica em proteína e lipídio, mas não contém carboidratos, conforme se verifica na Tabela 2.1. Os autores concluíram nesse experimento que níveis de sal e água em alimentos aumentam a sensibilidade bacteriana, e que lipídios e proteína decrescem a sensibilidade bacteriana.

Tabela 2.1. Composição aproximada e pH do arroz, frango, talharim e carne vermelha

Alimentos	Composição aproximada g (%)				pH
	Água	Proteína	Lipídeo	Carboidrato	
Arroz	87.5	0.8	0	11.3	5.9
Frango e Talharim	88.5	2.1	1.5	7.5	6.3
Carne vermelha	79.9	14.5	4.9	0	6.3

Fonte: SHELEFF, et al (1984).

Os mesmos autores estudaram no mesmo ano o crescimento de *Bacillus cereus* em galinha e talharim e em Beef-junior como preparo e após diluição com água a razão 1:1, verificando que a adição de 0,5% de sálvia em galinha e talharim apresentou um pronunciado aumento na inibição dentro da amostra diluída. Similar comportamento foi observado também em Beef-junior, entretanto uma concentração de 2,5% de sálvia foi necessária para produzir uma inibição efetiva.

FARBOOD et al (1976) calcularam o efeito bactericida e bacteriostático do alecrim na forma de extrato frente ao crescimento de selecionada microbiota e população total em carne de frango desossado mecanicamente, peito de peru e bife. Observaram que nos diferentes tipos de carne utilizados para teste, o alecrim apresentou efeito bactericida somente a 5% de concentração sobre *Staphylococcus aureus* e não se observou efeito bactericida sobre contagem total em placa nas amostras de carne. Em concentrações de 0,1 e 1,0% o extrato de alecrim não teve efeito sobre crescimento de *S. aureus*, tal diferença os autores atribuíram à

insolubilidade do extrato de alecrim em água e o aumento na fase sólida do substrato.

Sobre esse aspecto, OKA (1964) classificou os preservativos de alimentos em dois grupos baseados em seus mecanismos de ação. Um desses grupos foi considerado dependente da absorção do preservativo na fase sólida pelas células bacterianas. Essa absorção é equilibrada pela concentração de preservativos na fase aquosa e não pela média de extrato de alecrim em alimentos. FARBOARD, et al (1976) completam que a água contida em amostras de carnes é de aproximadamente 64 a 73%, e que com conteúdo sólido e alto lipídio resultam em um alto poder de absorção do extrato de alecrim pelo lipídio e fase sólida, portanto há uma drástica diminuição na concentração de extrato de alecrim na fase aquosa e assim uma ausência no efeito bactericida e bacteriostático do extrato de alecrim, levando-nos a concluir que a probabilidade de um decréscimo na penetração de extrato de alecrim em células devido à existência da camada lipídica de carnes não deve ser ignorada.

Segundo os estudos realizados por FARBOOD et al (1976), anteriormente citados, quando avaliaram o efeito de diferentes concentrações de extrato de alecrim sobre sobrevivência de *S. aureus* adicionado em carnes cruas de frango desossadas mecanicamente e estocado a 5°C por 12 dias, resultou que amostras com concentrações de 0,1 e 1,0% de extrato de alecrim e amostras controles permaneceram relativamente constantes pelo período de armazenagem, que, segundo os autores pode ter ocorrido um efeito sinérgico entre extrato de alecrim, baixa temperatura de armazenagem e repressão do crescimento de psicotróficos.

MAC NEIL et al (1973), analisaram o uso de compostos químicos e extrato de alecrim na manutenção da qualidade de carnes de frango desossadas mecanicamente, e detectaram que amostras de carne com a adição desses componentes exibiram substancialmente valores menores em ácido Tiobarbiturico (TBA), baixas contagem em placa (bactéria/g) por um período limitado, primeira semana de armazenagem a 3°C e melhoraram o gosto da carne em relação às amostras não tratadas. Notaram que 0,05% de extrato de alecrim e Butil hidroxianisol (BHA) mais ácido cítrico foram mais efetivos seguido pelo polifosfato e 0,01% de extrato de alecrim. Verificaram, também, através do teste de Ducan's, que a carne tratada com 0,01% de extrato de alecrim teve um gosto melhor, comparado com os outros tratamentos, inclusive amostras não tratadas.

KURITA & KOITE (1982), através dos resultados encontrados com a combinação dos componentes dos óleos essenciais e 7 a 10% de NaCl, baseando-se no fato de que certas ervas contêm relativamente bastante óleo essencial, resolveram, do ponto de vista prático, testar a ação de algumas ervas comumente utilizadas como condimentos no Japão (folhas frescas de louro, pimenta japonesa e cereja) em uma comida japonesa, o “missô” (uma pasta de feijão). Ao contrário do missô desprovido de condimentos que ocorreu crescimento de colônias, no missô que continha as folhas dos condimentos não houve desenvolvimento de colônias após o período de uma semana. Estes resultados obtidos sugerem que certas plantas com alto conteúdo em óleo essencial quando aplicadas podem preservar alimentos que contenham 10% ou mais de NaCl.

DUX BURY (1992), baseando-se no princípio de que a rancidez oxidativa é um grupo de reações controlado mais efetivamente durante o início de um processo de armazenagem, estudou adição de extrato de alecrim como um aditivo alternativo natural, em carnes que são moídas, cozidas, desidratadas, severamente stressadas e altamente suscetíveis a rancidez oxidativa. O extrato de alecrim foi selecionado e produzido dentro de um processo patenteado, assegurando consistente performance, prontamente solúvel e com controle do gosto e aroma. Avaliou-se também o extrato de alecrim disperso em água, miscível em água, em óleo solúvel e na forma de pó seco, e o extrato de alecrim escolhido para testar em carne de frango cozido e desidratado foi o disperso em água por ter apresentado maior estabilidade de incorporação e melhor consistência em níveis de igual ou melhor desempenho que os antioxidantes sintéticos.

Sendo assim, o autor utilizou, em amostras de frango cozido e desidratado, extrato de alecrim dispersos em água e comparou com amostras similares de frango contendo uma mistura de antioxidantes sintéticos Butil hidroxianisol (BHA) e propil gallate. Utilizando “Rancimat” (um dispositivo para medir rancidez sobrefixa, induzindo a temperatura de 98° C e 12 - ½ litros/hr fluxo de ar). Para o extrato de alecrim obteve-se 80,6 hr e para o BHA / propil gallate 79,4 hr. Em uma segunda comparação, com o mesmo produto (frango cozido e desidratado), o valor “Rancimat” para o tratamento com extrato natural de alecrim dispersos em água foi 161,0 hr em relação a 135,2, obtido do tratamento com outro extrato de alecrim em pó disponível no comércio. O mesmo autor verificou também que após armazenagem do frango cozido desidratado por 9 meses a 40 F, o extrato de alecrim

obteve 6,8 contra 6,5 para o produto tratado com antioxidante sintético BHA/propil gallate em uma escala sensorial.

LIU, H. F. (1992) avaliou a eficácia do óleo resina de alecrim (OR) com triosfosfato de sódio (STPP) em reestruturação de bife de carne de porco durante cozimento e armazenamento em temperatura de refrigeração e cru, armazenado em temperatura de congelamento, monitorando a oxidação lipídica, através da análise do ácido tiobarbitúrico (TBA), avaliação sensorial e conteúdo hexanal (maior produto de oxidação do ácido linoleico). STPP, significância ( $P < 0,01$ ), reduziu a oxidação lipídica em bife cozido durante armazenamento em refrigeração ( $\cong 4^\circ \text{C}$ ) por oito dias e em bife cru estocado a  $-30^\circ \text{C}$  por 8 meses, a estabilização lipídica não teve aumento com o tratamento por OR/STPP comparado ao tratamento por STPP. OR/STPP solúvel em água não resultou em significância ( $P > 0,05$ ) e a estabilidade lipídica foi maior com o óleo solúvel OR/STPP tratamento, e o conteúdo hexanal significância ( $P < 0,01$ ) aumentou após 8 meses estocados em Freezer. LIU concluiu que o óleo resina de alecrim bem como a óleo resina de sálvia para tratamento contendo STPP não mostrou um benefício adicional ( $P > 0,05$ ) em retardar a oxidação lipídica. Em relação à estabilidade lipídica durante a estocagem em frio em diferentes concentrações de alecrim (0,05% e 0,1%) baseada sobre gordura e tipo (água-solúvel e óleo solúvel) quando combinados com STPP, não teve efeito significativo ( $P > 0,05$ ) sobre oxidação lipídica medidos por valores de TBA e uma escala sensorial.

## 2.2. Frango e carne de frango

### 2.2.1. Sinopse da evolução do processo de preservação de alimentos

Voltando ao tempo, podemos rever a evolução dos processos de conservação dos alimentos e verificamos que em quase toda a história da humanidade sempre existiram métodos para proteger os alimentos dos agentes deletérios que o homem apenas conhecia. Os métodos de processamento e manipulação dos alimentos evoluíram empiricamente e a ciência necessária para a compreensão dos mesmos nasceu, em muitos casos, anos depois (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF, 1980).

Um dos primeiros descobrimentos do homem foi que baixas temperaturas aumentavam a vida útil dos alimentos. Provavelmente o homem primitivo observou que as carnes dos animais sacrificados se mantinham em boas condições para consumo durante mais tempo se mantidas em covas; ao mesmo tempo, sem saber, utilizava outros agentes distintos como o frio para prolongar a vida útil de sua caça. À medida que a carne se esfriava, se secava a superfície da mesma, reduzindo a atividade de água, e retardando o desenvolvimento dos microrganismos. Por outro lado, ao esfriar-se, prosseguia a glicólise pós-morte, proporcionando à carne maior resistência a alterações. Finalmente, o metabolismo do músculo causava uma queda do potencial de oxido-redução, restringindo o crescimento microbiano dos anaeróbios no interior dos tecidos. O homem pré-histórico, com a única observação de que o frio mantinha a carne em bom estado durante mais tempo, estava utilizando inadvertidamente outros três fatores que participavam na preservação temporária da alteração (ICMSF, 1980).

Não se conhece de fato quando o homem descobriu que a eliminação parcial da água aumentava a vida útil dos alimentos, porém a bíblia menciona que a energia solar foi o primeiro procedimento de dessecação; desde os primeiros tempos, o homem descobriu que se podia prevenir a alteração dos alimentos mediante o secado e o tratamento com sal. A adição do sal às carnes reduzia a atividade de água que se combinava com a eliminação de água durante a dessecação ao sol, modificava-se a flora, evitando-se o crescimento das *pseudomonas*, mil anos antes

que Leeuwenhoek desse os primeiros passos que conduziram, mais tarde, à identificação dessas bactérias. (ICMSF, 1980)

As tribos indígenas *Sioux* y *Cree* da América do Norte elaboravam um produto denominado *pemmican*, onde cortavam a carne de búfalo em tiras e batiam depois; posteriormente a secavam ao sol e depois misturavam-na com ácido procedente dos sucos de amoras ou fruta similar e nozes. Finalmente as submergiam em óleo. Este produto semi-seco conservado em óleo foi o precedente dos alimentos semi-úmidos. O uso dos ácidos procedentes das frutas era utilizado como um método de conservação, em combinação com a dessecação (LABUZA, 1976, IN : ICMSF, 1980).

Atualmente, ainda estamos adquirindo conhecimentos sobre as interações dos agentes que o homem primitivo utilizava como resultado da observação; e, desta forma, com os avanços da engenharia, vão introduzindo-se modificações ao combinar o tratamento térmico com outros procedimentos de conservação. Em resumo, através da história da humanidade, a manipulação de alimentos vem evoluindo empiricamente, quase sem exceção, os procedimentos baseados na combinação de diversos métodos de conservação já eram empregados muito antes do homem conhecer as bases para a compreensão dos mecanismos implicados no mesmo (ICMSF, 1980).

## **2.2.2. Microbiota do Frango e da carne de frango**

### **2.2.2.1. Contaminação inicial**

De acordo com BRYAN (1980) e outros pesquisadores como WHO (1988), LACCEY (1989), citados por MACHADO (1992), o processo de contaminação de aves inicia-se nos ovos utilizados pelo produtor, que são contaminados nos ovários ou ouvidutos durante o seu desenvolvimento; ou através de microrganismos provenientes dos excrementos e do solo, que aderem à casca do ovo, e sendo esta porosa proporciona a penetração dos mesmos. Segundo os autores citados anteriormente, após a eclosão dos ovos, os pintinhos adquirem outras fontes de contaminação: via incubadeiras, ração, solo, esterco, ar, insetos, etc.

Estudos realizados por BRYAN (1980); BEERY et al (1988), MEAD (1990) e JAY (1994); comprovaram que o corpo, penas, pés das aves, bem como as grades e ambiente de transporte, possuem organismos dos gêneros *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Flavobacterium*, *Salmonella*, Família *Enterobacteriaceae*, Leveduras e patógenos emergentes como *Yersinia spp*, *Campylobacter spp*, *Listeria spp*.

Segundo MACHADO (1992), no transporte da granja até a planta de processamento, as aves são mantidas em gaiolas contíguas, onde se submetem a uma série de tensões físicas, decorrente do calor, movimento no translato, empilhamento das gaiolas no veículo de transporte, que, somando com a deficiência na limpeza e desinfecção das gaiolas e do seu ambiente de transporte, culminará em : (1) Contaminação cruzada entre as aves por bactérias de origem fecal e as provenientes das penas, pele e pés contaminados por fezes. (2) Contaminação do próximo lote a ser transportado pelos microrganismos sobreviventes. As aves contaminadas ao chegarem à planta de processamento poderão ser fonte dos microrganismos que durante o processamento são disseminados carcaça-a-carcaça.

#### **2.2.2.2. Alteração da carne de frango**

Em função do seu alto valor nutritivo a carne de frango apresenta uma ampla variedade de microrganismos, porém, nem todos são encontrados com a mesma frequência no produto, ou seja, apenas poucas espécies constituem a microbiota deteriorante (JAY, 1994). Segundo o mesmo autor, o produto não deteriorado apresenta microrganismos provenientes do ambiente natural, processamento, manuseio, embalagem e armazenagem. De acordo com EGAN & SHAY (1982); STILES (1991) e JAY (1994), o comportamento da microbiota presente no produto cru diferencia-se daquele na fase de deterioração, bem como o potencial de crescimento que resulta na deterioração é fundamentado em parâmetros intrínsecos e extrínsecos e de processamento que atuam de maneiras independentes no crescimento dos microrganismos.

De acordo com NOSKOWAC (1972), quando a carne de frango é obtida de animais saudáveis, sacrificados sob boas condições de higiene, os microrganismos causadores de alterações encontram-se limitados na superfície da pele. É raro

encontrá-los em vasos sanguíneos, vísceras e vias linfáticas. As partes internas do tecido da carne são geralmente estéreis ou contém poucos microrganismos, os quais não crescem em temperatura baixa. A microbiota causadora de alteração está restrita na superfície da pele, onde se deposita, procedente de água, ou como consequência do seu tratamento e manipulação. Segundo o mesmo autor, só penetram na profundidade da massa muscular quando a carne procede de animais enfermos ou extenuados, e quando os manipuladores trabalham sem assepsia e ainda quando o processo de refrigeração é ineficiente.

JAY (1994) acrescenta que, coincidindo com o crescimento inicial, primeiramente restrito na superfície da pele, os tecidos internos permanecem praticamente isentos de bactérias durante algum tempo. De modo gradual, as bactérias começam a penetrar nos tecidos profundos, e quando os tecidos das aves sofrem alterações microbianas, os microrganismos atravessam a parede intestinal e invadem os tecidos internos da cavidade abdominal, causando uma alteração chamada de "*Mancha Visceral*". Esse autor elucida que a superfície do tecido de aves, recém sacrificadas e conservadas em um ambiente com elevada umidade são sensíveis ao crescimento de bactérias aeróbias como as do gênero *Pseudomonas*. Esses microrganismos crescem bem na superfície formando colônias pequenas que depois se confluem para produzir a mucosidade típica dos tecidos das aves alteradas. Para o mesmo autor, conforme se altera a carne da ave, antes de aparecer a mucosidade, percebe-se odores anormais, principalmente quando o Logarítmico do número de contagem/cm<sup>2</sup> está compreendido mais ou menos entre 7,2 a 8,0. Geralmente a mucosidade aparece logo após haver aparecido os odores anormais, sendo então aproximadamente 8 o valor do Logarítmico das contagens/cm<sup>2</sup>.

Dentre todos os microrganismos que produzem odores, na variada microbiota existente nos tecidos frescos das aves, existem algumas espécies que produzem odores intensos. A este respeito MC MEEKIN (1975), estudando músculos do peito e músculos da coxa de frango, observou que os músculos se alteram de modo distinto, sendo registrado um pH mais elevado no músculo da coxa. MC MEEKIN reportou também que o músculo da coxa conservado a 2°C, durante 16 dias, apresentava uma microbiota de 47% de *Pseudomonas do grupo I*, 17% de *Pseudomonas do grupo II* de Shevan, 17%, pertence ao gênero *Acinetobacter* e *Moraxella* e 4% da espécie *Alteromonas putrefasciens*. Segundo o autor, todos os isolamentos

pertencentes a esta última espécie produziram odores parecidos ao odor sulfídrico, e a alteração do músculo de peito não tiveram tanta importância, levando-nos a concluir que carnes com pH mais elevado alteram-se com mais facilidade que as que possuem pH mais baixo.

Ainda o mesmo autor concluiu que como *Pseudomonas do grupo II*, crescem com mais rapidez que as cepas do grupo I (produtora de pigmento), a capacidade para produzir odores intensos é uma peculiaridade dessas cepas. Comprovando que *Pseudomonas do grupo II* consumiam os aminoácidos livres na pele dos frangos enquanto que as do tipo do grupo I incrementavam a quantidade de aminoácidos livres e dos compostos nitrogenados afins.

Conforme JAY (1994), estudos realizados sobre a microbiota de tecidos de aves revelaram a presença de mais de 25 gêneros de microrganismos e dentre eles os mais freqüentemente encontrados são: *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Vagococcus*, *Salmonella*. O autor ressalta que a maioria dos pesquisadores concorda que, quando a alteração ocorre à baixa temperatura, os principais microrganismos encontrados pertencem ao gênero *Pseudomonas*. Complementa o autor que estudos realizados a partir de 5.920 isolamentos em tecidos de aves, 30,5% pertenciam ao gênero *Pseudomonas*, 22,7% ao gênero *Acinetobacter*, 13,9% ao gênero *Flavobacterium*, 12,7% *Leveduras*, sendo que microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e outras representaram percentagens muito baixas.

Estudos feitos por MAY (1990) comprovam que a contaminação superficial aumenta gradativamente durante diferentes fases do processamento e durante a venda em estabelecimentos comerciais. O autor ressalta que a microbiota da carne de frango está constituída principalmente pelo gênero *Pseudomonas* e outras bactérias Gram negativas, assim como por bactérias do grupo *corineforme*, *Leveduras* e outros microrganismos. Estas afirmações estão de acordo com JAY (1994), anteriormente citado, e também com as de MACHADO (1992), que completa, apontando a *Pseudomonas fluorescens* como predominante.

A carne de frango é apontada como um dos mais importantes veículos na transmissão de doenças ao homem. De acordo com MEAD (1990) e pesquisadores citados por MACHADO (1992), dentre eles HIGGINS et al (1982), MULDER (1989); IZAT et al (1989) , entre 25 e 100% das aves, quando do início do processamento industrial, podem transportar patógenos nas fezes, e outras fontes de patógenos

podem contribuir para a recontaminação das carcaças, especialmente por espécies de *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus* e *Clostridium*.

## **2.2.3. Microrganismo de importância em frango**

### **2.2.3.1. Gênero *Pseudomonas***

#### **A) Característica geral**

Segundo a 8ª edição do manual BERGEY, as células do gênero *Pseudomonas* são retas e levemente curvadas semelhantes a uma vara, mas não têm forma helicoidal, medem 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  em diâmetro por 1,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  em comprimento. Muitas espécies acumulam poli- $\beta$ -hidroxibutirato como carbono de reserva de material. São Gram negativas, motilidade por um ou vários flagelos polares, raramente imóveis e em algumas espécies o flagelo é lateral. São aeróbios estritos, tipo de respiração de metabolismo com oxigênio como acceptor final de elétrons; em alguns casos, o nitrato é usado como um acceptor alternativo de elétron, permitindo o crescimento ocorrer anaerobicamente. Não produz xantomona, mas nem todas as espécies fracassam ao crescer sob condições ácidas (pH 4.5). Muitas espécies não requerem fator orgânico de crescimento. São oxidase positiva ou negativa e catalase negativa, algumas espécies são chemolithotrophs, capazes de usar  $\text{H}_2$  e CO como fonte de energia e também algumas espécies são patogênicas para o homem, animais e plantas. A Figura 2.6. apresenta colônias de *Pseudomonas spp.*

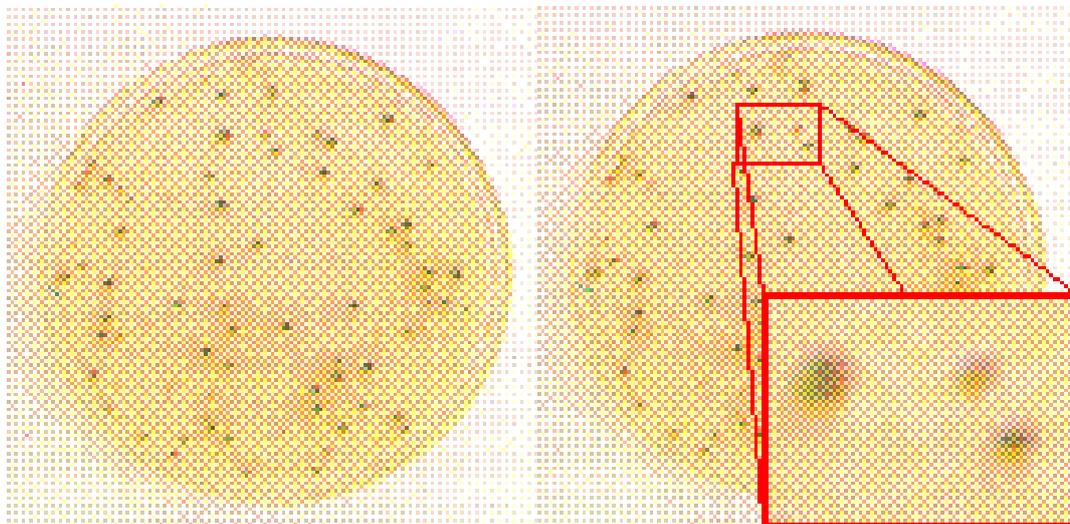


Figura 2.6. Colônias de *Pseudomonas* spp visualizadas em ágar Naylor, evidenciando a redução do Cloreto de Tri-fenil tetrazólico. (adaptado de LEITÃO, 1985).

### 2.2.3.2. *Pseudomonas fluorescens*

Encontra-se no solo e na água, dos quais é isolado após enriquecimento em meio de cultura contendo várias fontes de carbono, incubado aerobicamente, sendo que a temperatura ótima de incubação é de 25° - 30° C, apesar de que as estirpes biovares de desnitrificação são enriquecidas em meio similar contendo nitrato, e são incubadas sob condições anaeróbias. São comumente associadas com deterioração de alimentos como ovos, carnes, frangos, peixes e leite. Frequentemente são isoladas de material clínico e algumas estirpes designadas para espécie (biovar II) têm sido isoladas de plantas doentes, e identificadas como *Pseudomonas marginalis*.

Esse taxon foi subdividido dentro de três patovares: a) *P. marginalis* pv. *marginalis*, designada tipo Strain é ATCC 10844 (PDDCC 3553; NCPPB 667); b) *P. marginalis* pv. *alfafa*, esta patovar é associada com descoloração da alfafa (*Medicago sativa*, fam. leguminosa), referente strain é PDDCC 5708 (NCPPB 2644); c) *P. marginalis* pv. *pastinacae*, um patógeno de cultivares de cenoura branca (*Pastinaca sativa*, fam. *Umbelliferae*), referente strain é ATCC 13889 (PDDCC 5709;

NCPPB 806). (MANUAL BERGEY, 8<sup>a</sup> ed.). A Figura 2.7 e 2.8 exibe características das colônias de *P. fluorescens* ATCC 13525 que foi inoculada em meio de cultura Agar sangue na temperatura de 25° C pela técnica de esgotamento em estrias e em meio de cultura Agar nutriente na temperatura de 35° C pela técnica de superfície.



Figura 2.7. Características das colônias de *P. fluorescens* ATCC 13525, inoculada em meio de cultura Agar nutriente na temperatura de 35° C pela técnica de superfície.

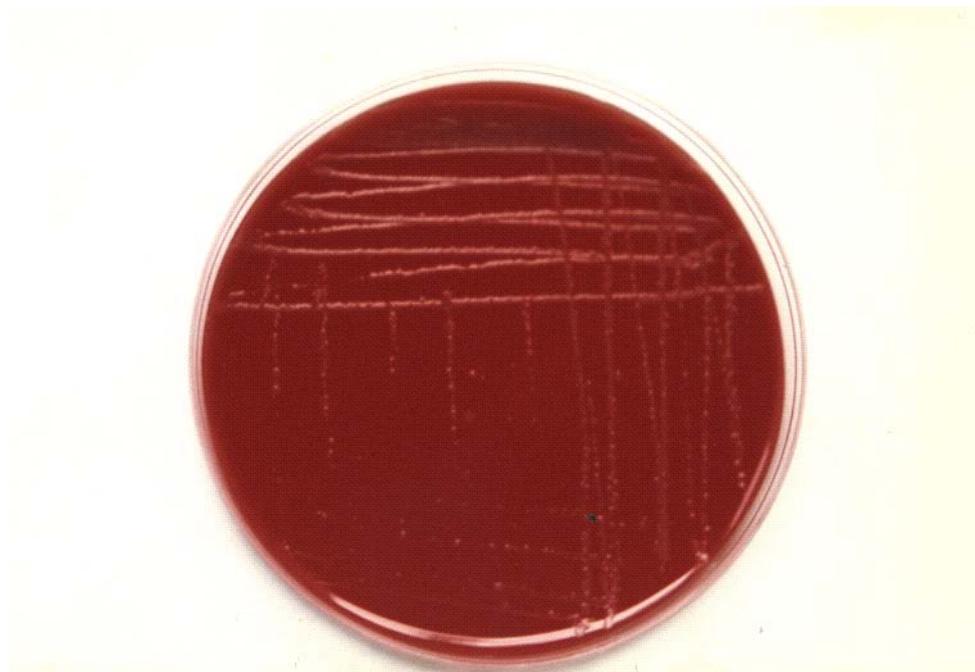


Figura 2.8. Características das colônias de *P. fluorescens* ATCC 13525, inoculada em meio de cultura Agar sangue na temperatura de 25° C pela técnica de esgotamento em estrias

Os pelos ou as fimbrias estão presentes em número de espécies de *Pseudomonas*, porém é observado que as strains de *P. fluorescens* não possuem fimbrias. Em relação ao envelope celular, as células de espécies de *Pseudomonas* são muito similares em estrutura como outras bactérias Gram-negativas, mas importantes diferenças são encontradas na composição química, e diferenças químicas são também aparentes entre as espécies de *Pseudomonas* e entre as strains com as espécies. Wilkinson, 1970, citado em Manual Bergy 8<sup>a</sup> ed, encontrou uma correlação entre a sensibilidade em EDTA e um alto conteúdo de fósforo contendo em outras membranas, e a *P. fluorescens* está entre as que apresentaram baixo EDTA-sensibilidade e baixo conteúdo de fósforo.

Outra observação importante é que muitos procaríotes têm hopanes em suas membranas, esses compostos são derivados triterpenos que são similares a esteróis em tamanho, rigidez e caráter anfifílico, e mais tocam na membrana similar a um papel como os esteróis em eucarióticos. De fato, hopanes são provavelmente ancestrais químicos dos esteróis, e entre as espécies de *Pseudomonas* examinadas, a *P. fluorescens* pertence ao grupo que não contém esses compostos.

A capacidade de aderência é uma capacidade de microrganismo dotado de flagelo e fimbrias, que é uma característica do gênero *Pseudomonas*. Dentro deste contexto, ORTEMANS & KAMPLEMACHER, citados em LILARD, 1989, demonstram

que as bactérias assim dotadas, aderem-se à pele de frango durante o processamento. Os autores examinaram uma série de parâmetros e concluíram que bactérias flagelares aderem com mais facilidade do que as bactérias não flagelares em peles de frangos. De acordo com eles, a capacidade de aderência da bactéria pode ser examinada pelo rolo de flagelo e fímbrias no processo, e *pseudomonas fluorescens* que é uma bactéria flagelar, demonstrou nesse estudo uma boa capacidade de aderência.

O gênero *pseudomonas* inclui a pigmentação como uma característica geral, porém o presente gênero inclui muitas espécies que são não pigmentadas. Entre os mais notórios dos pigmentos solúveis os fluorescentes pioverdin e piocianin, que se tornaram familiares aos bacteriologistas por muitos anos, porém, pouco da estrutura de piocianin é bem conhecida, a pioverdin é a única parcialmente caracterizada. As pioverdins são instáveis e vários compostos têm sido descritos que, provavelmente, decompõem produtos de baixo peso molecular, e diversos trabalhos citados em Manual Bergy 8<sup>a</sup> ed elucidam o avanço substancial do conhecimento de pioverdin em *P. fluorescens*. O estudo químico é complicado por causa da instabilidade química da pioverdin, embora ela seja reduzida pela formação de compostos férricos, e a pioverdin de *P. fluorescens* contém um não usual aminoácido N<sup>5</sup>-hidroxiornitine. Outros compostos fluorescentes foram isolados de *pseudomonas fluorescentes*, dois compostos fluorescentes foram isolados por Shirarata et al., 1970, chamado fluopsin C e fluopsin F; 6-hidroximetilpterine, um intermediário em ácido fólico sintético. Strains de *P. fluorescens* biovar V, que é originalmente designada como a espécie "*P. lemonnier*", produz um pigmento intracelular insolúvel, derivado de 3,3'-bipiridil.

O metabolismo das *Pseudomonas* é tipicamente respiratório com o oxigênio como acceptor final de elétrons, porém muitas espécies utilizam também o nitrato como um acceptor de elétron alternativo. Em relação aos compostos de baixo peso molecular, uma variedade de macro moléculas tem sido degradada por algumas strains por meio de enzimas extracelulares e, Ueda et al (1952), citado em Manual Bergy 8<sup>a</sup> ed, descreveram quatro microrganismos supostos de degradarem a celulose, e *P. fluorescens* é uma das quatro.

Algumas espécies de *Pseudomonas* recebem nomes sugerindo uma preferência por carboidratos, mas esses compostos não são em geral melhor fonte de carbono e energia de muitas espécies. As *pseudomonas* fluorescentes, como a

*P. fluorescens*, têm múltiplo caminho periférico para oxidação da glicose que converge a síntese de 6-fosfogluconato, que é mais degradado pelo caminho de Entner-Doudoroff, dessas rotas, uma envolve diretamente oxidação do açúcar (caminho oxidativo) e também o gluconato e 2-ketogluconato serve como precursor de 6-fosfogluconato. O metabolismo da frutose por várias espécies, inclusive a *P. fluorescens*, ocorre por meios de um fosfoenolpiruvato (PEP) sistema fosfotransferase.

Muitos aminoácidos são utilizados como fonte de carbono, nitrogênio e energia por muitas espécies de *Pseudomonas*. Permeases de vários aminoácidos são identificadas principalmente em *P. fluorescens*. A especificação de algumas permeases é alta, como no caso de L-triptofano, permease de *P. acidovorans*, mas o contrário também é verdadeiros em *P. fluorescens*, L-alanine e L-proline, que são transportados por suas respectivas permeases específicas e por um menos específico sistema que também transporta  $\beta$ -alanina. Triptofanos são catabolizados via anthranilate, catecol e a  $\beta$ -keto adipate, caminhos utilizados pelas espécies de *Pseudomonas*. Em uma strain rotulada *P. fluorescens*, L-kynurenine (o segundo intermediário do caminho induzido) e o triptofano não é o indutor.

Jensen e colaboradores (1967), citados em Manual Bergy 8<sup>a</sup> ed., reportam interessantes estudos comparativos sobre o controle de uma enzima, 3-deoxi-Darabinoheptulosonate-7-fosfato (DAHP) sintetase, em diferentes organismos, incluindo um número de strains da coleção Berkeley, em testes com extrato de células cruas de *P. fluorescens* e outras espécies. Foi revelado que estas têm reação de inibição de uma só espécie de enzima por um único caminho dos três produtos finais dos diversos caminhos, chamada tirosina.

Os plasmídios são importantes componentes da genética das *pseudomonas*. Alguns fatores requeridos pela fase da replicação dos ácidos nucléicos parecem ter sido conservados pela evolução em alguns grupos de bactérias Gram negativas. Em um estudo sobre várias espécies de *pseudomonas*, DuBow & Ryan (1977), citados em Manual Bergy 8<sup>a</sup> ed., foram eficazes ao detectar o material da reação cromossômica com *E. coli* antisoro HF em extratos de *P. fluorescens*.

Muitas espécies de *Pseudomonas* são resistentes a um número de agentes antibacterianos. Suscetibilidade a antibióticos e drogas, é a mais importante implicação prática e é ocasionalmente incluída na descrição de uma nova espécie.

Resposta a  $\beta$ -lactam antibiótico em *Pseudomonas* também resulta em sua utilização como substrato para crescimento. Johnsen (1977), citado em Manual Bergy 8<sup>a</sup> ed., isolou do solo uma strain de *P. fluorescens* que foi capaz de utilizar benzilpenicillina como fontes de carbono, nitrogênio e energia.

Strains de muitas espécies *Pseudomonas* são ubíquas, e existem, freqüentemente, muito poucos dados de isolamento sobre sua ecoLogia. Numerosos materiais naturais são bons estudos de isolamento, e em alguns desses *habitats*, *pseudomonas* mais representa uma minoria da microbiota total, mas sobre certas condições (pH próximo da neutralidade, matéria orgânica em solução, temperatura, bom suprimento de oxigênio dissolvido), sua capacidade para rápido crescimento em ausência de fatores complexos, decide sua predominância, até mesmo em meio com baixos conteúdos de nutrientes, *pseudomonas* ocasionalmente se multiplica a uma considerável extensão. Quando se trata de organismo de tal versatilidade, conclusões ecológicas são particularmente difíceis de serem concluídas. Das 57 strains de *pseudomonas* fluorescentes isoladas por Dooren de Jong (1926), 23 delas tiveram origem em solo e, com uma exceção, todas conseguiram ser classificadas como *P. putida*, baseando-se na sua incapacidade de atacar a gelatina. Todas outras strains foram isoladas da água, mostrando liquefação da gelatina, e foram classificadas como *P. fluorescens*, concluindo-se que *P. putida* é um organismo do solo, e que *P. fluorescens* predominam em água.

O meio de cultura que é freqüentemente usado para isolamento direto, é o meio B de KING et al (1954), que aumenta a produção de pioverdin e também é satisfatório para o propósito geral. Alguns meios de cultura sólidos foram desenvolvidos baseando-se no meio básico B; um exemplo é o meio proposto por Sands e Rovira (1970), que contém a pinicilina G, novobiocina e cicloheximida, esses compostos não inibem as *pseudomonas fluorescentes*, e suas colônias são identificadas em placas pelas características do pigmento difusível. O meio de cultura A de King et al (1954) é geralmente recomendado para a produção do pigmento fenazine, entretanto experiências demonstram que esse meio não é sempre efetivo, mas, na falta do outro, este é bem recomendado como alternativa. A produção de fenazine freqüentemente apresenta erro, particularmente com culturas que ficam por um longo tempo sobre condições de laboratório precárias. A pimentação azul de *P. fluorescens* biovar IV ("*P. lemonnierii*") é produzida em

abundância por culturas frescas em meio de cultura batata semelhante aos utilizados por micologistas.

A designação de espécies e grupo de espécies com este largo grupo foi originalmente decidida basicamente sobre uma análise mais ou menos subjetiva de caracteres fenótipos. Mais tarde, este critério foi amplamente confirmado por experimentos de hibridização de ácidos nucléicos e por análise numérica de dados fenotípicos. Experimentos com DNA/DNA hibridização permitem a circunscrição de uma assim chamada “*P. fluorescens* grupo homoLogo”. Os pontos a considerar são em relação à heterogeneidade de duas espécies fluorescentes, *P. fluorescens* e *P. putida*. Dentro de *P. fluorescens*, como o grupo constituído por biovars D e F de Stanier et al (1966), apresenta por todo critério muitos grupos contornos e distintos, suportam o temperamento adotado na oitava e na presente edição deste Manual de separação dessas duas biovars dentro desses originais nomes de espécies, *P. chlororaphis* e *P. aureofaciens*, respectivamente. Em 1966, um outro método proposto sob o nome de LOPAT (formação de levan, oxidase, capacidade de deterioração da batata, arginina diidrolase, e hipersensibilidade ao tabaco). fornece uma base firme para agrupar muitas espécies fluorescentes sob dois nomes *P. syringae* e *P. cichorii*, com *P. marginalis* foi encontrada parecer-se à forma saprófita do grupo *P. fluorescens*-*P. putida*. A terceira espécie patogênica em plantas (*P. marginalis*) foi incluída em uma das biovars *P. fluorescens* (biotipos) . O grupo das strains oxidases positivas é muito bem definido e merecem status independente, mas o resultado sobre *P. marginalis* adiante mais suporta a opinião de que as espécies são mais agrupadas relacionadas à *P. fluorescens* que a outra espécie patogênica a plantas. Ambas as *P. marginalis* e *P. viridiflava* são espécies que se parecem espécies saprófitas e não são ainda plenamente declaradas como fitopatogênicas. Portanto, *P. marginalis* deve ficar no momento no grupo da *P. fluorescens*, apesar de outros trabalhos demonstrarem a necessidade de separação em taxon independente. (MANUAL BERGY, 8ª ed.).

O quadro 2.11 e 2.12, exibem as características gerais das espécies de *P. fluorescens* conforme Manual Berby, 8ª ed.

#### **2.2.4. Alteração provocada por *Pseudomonas spp* em alimentos.**

Denomina-se putrefação ao processo de deterioração resultante da utilização anaeróbia das proteínas e substâncias nitrogenadas não protéicas, ao passo que o termo decomposição é reservado para os casos em que a degradação é aeróbia, com oxidação dos produtos metabólicos (BANWART, 1979); a marcante diversidade de compostos formados e as profundas alterações nas características organolépticas dos alimentos tornam o primeiro tipo de deterioração mais problemático. (LEITÃO, 1985).

Características	Biovar I	Biovar II	Biovar III	Biovar IV	Biovar V
Diâmetro da célula	07 -08	07 - 08	08	07	08
Comprimento da célula (µm)	2,3 - 2,8	2,0 - 2,8	2,0 - 2,8	2,0 - 2,5	2,0 - 3,0
Número de fragelos	> 1	>1	>1	>1	>1
Produção de piocianin	-	-	-	-	-
Produção de pioverdin	+	d	+	+	d
Produção de clororafin	-	-	-	-	-
Produção de monocarboxilato fenazine	-	-	-	-	-
Outros pigmentos (não carotenóides)	-	-	-	d	-
Pigmento celular amarelo-laranja	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+
Acumulação de PHB	-	-	-	-	-
Formação de sacarose	+	+	-	+	-
Liquefação da gelatina	+	+	+	+	+
Hidrólise do amido	-	-	-	-	-
Crescimento autotrófico com H <sub>2</sub>	-	-	-	-	-
Lecitinase	+	±	+	+	d
Lipase	d	-	d	d	d
Extracelular hidrólise PHB	-	-	-	-	-
Crescimento a 4° C	+	+	+	+	d
Crescimento a 41° C	-	-	-	-	-
Denitrificação	-	+	+	+	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Catecol	+	+	+	+	+
Protocatechuate	+	+	+	+	+
Mol% G + C de DNA (Bd)	60,5	61,5	60,6	59,4	60,5

Quadro 2.11. Características Gerais da espécie *Pseudomonas fluorescens* Biovares I, II, III, IV, V.

Fonte : Manual Bergy, 1985

Características	Biovar I	Biovar II	Biovar III	Biovar IV	Biovar V
<i>P. fluorescens</i> biovares como designado por Stanier et al. 1966	A	B	C	F	G
Pigmentos não fluorescentes					
Verde (clororafin)	-	-	-	-	-
Laranja (fenazine-1-carboxilato)	-	-	-	-	-

Azul, não difusível	-	-	-	-	-
Formação de sacarose	+	+	-	+	-
Denitrificação	-	+	+	+	-
Fonte de Carbono usada para crescimento:					
L-Arabinose					
Sacarose	+	+	d	+	d
Sacharate	+	+	-	+	d
Propionate	+	+	d	+	d
Butirato	+	+	d	+	+
Sorbitol	-	d	d	+	d
Adonitol	+	+	d	+	d
Propileno glicol	+	-	d	-	d
Etanol	-	+	d	-	d
	-	+	d	-	d

Quadro 2.12. Características das espécies de *Pseudomonas fluorescens* das Biovars I, II, III, IV e V com valores para diagnóstico

Fonte : Manual Bergy, 1985.

Muitos são os gêneros e espécies de bactérias envolvidos na eventual deterioração dos alimentos, há predominância de um determinado tipo dependendo das suas características fisiológicas e bioquímicas e da adequação dos alimentos como substrato ao desenvolvimento. Os carboidratos, substâncias nitrogenadas não protéicas, proteínas e lipídios podem se constituir em nutrientes para os microrganismos, havendo, em conseqüência, sensíveis alterações nas características químicas, físicas e organolépticas dos alimentos. (LEITÃO, 1988)

Praticamente todos os carboidratos ou substâncias derivadas de carboidratos estão sujeitos à utilização como substrato para o crescimento microbiano, basicamente como fonte de energia. Nestas condições, entre outros, podem ser metabolizados os polissacarídeos como o amido, celulose e quitina, dissacarídeos como a lactose, maltose e sacarose, hexoses como a glucose, frutose e galactose, pentoses como a arabinose e xilose, açúcares ácidos como o ácido glucônico e glucurônico e poliálcoois como o manitol e glicerol (STANIER et al., 1976).

As condições em que ocorre esta utilização são de importância crítica no sentido de definir a natureza das alterações provocadas e a maior ou menor intensidade do crescimento microbiano. Assim, na presença de oxigênio, as bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas irão predominar, com um metabolismo eminentemente respiratório oxidativo, levando à produção de H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub>, sem o acúmulo excessivo de produtos intermediários; no entanto, face à mais intensa produção de energia na forma de ATP, o crescimento microbiano será muito mais rápido, evidentemente em detrimento das características organolépticas e da vida útil do alimento. Por outro lado, em anaerobiose, as bactérias passam a utilizar os carboidratos por um processo de fermentação, com o acúmulo gradativo de produtos

intermediários ou finais que afetam sobremaneira as características dos alimentos. (LEITÃO, 1985)

Deve-se ressaltar também que a grande maioria das bactérias é capaz de utilizar diretamente os monossacarídeos e dissacarídeos por um processo de fermentação ou respiratório oxidativo; no entanto, os polissacarídeos como o amido e celulose não penetram através da membrana celular das bactérias, sendo necessária a sua prévia hidrólise pela atividade de enzimas extracelulares produzidas por algumas bactérias. (BANWART, 1979)

Desse modo, em vegetais, a pectina, principalmente na forma de sais de cálcio, está presente na parede celular, conferindo-lhe à sua rigidez características. Muitas bactérias, principalmente como as dos gêneros *Pseudomonas*, evidenciam atividade pectinolítica, caracterizada pela produção de enzimas como a pectato transeliminase, poligalacturonase e pectinesterase, que causam a ruptura da molécula péctica com o conseqüente amolecimento e liquefação dos tecidos. A pectinesterase provoca a hidrólise da pectina com a formação de ácido péctico e metanol, ao passo que a poligalacturonase rompe a ligação entre as unidades de ácido galacturônico da pectina ou ácido péctico, com formação de cadeias curtas e, finalmente, unidades livres de ácido D-galacturônico. (FRAZIER & WESTHOFF, 1978; BANWART, 1979).

As proteínas são compostas de aminoácidos ligados por meio de ligações peptídicas; estas podem ser rompidas pela hidrólise catalisada por enzimas, sendo o rompimento da molécula efetuado em etapas, originando proteoses, peptonas, polipeptídios, dipeptídios e, finalmente, aminoácidos. As proteinases catalisam a hidrólise das proteínas a polipeptídeos menores, ao passo que a hidrólise dos polipeptídios e peptídios simples e aminoácidos são catalisados pelas peptidases. Cabe lembrar que, normalmente, a molécula intacta de proteína não é utilizada diretamente pelas bactérias, face à impossibilidade de sua penetração através da membrana celular; no entanto, os compostos originários da sua hidrólise e de baixo peso molecular, como dipeptídios e aminoácidos, podem penetrar e serem metabolizados pela maioria dos microrganismos. (LEITÃO, 1985).

A ruptura da molécula protéica causa, como alterações principais, eventuais reduções na textura dos tecidos, com o seu gradativo amolecimento e, por vezes, mudanças no aroma dos produtos; no entanto, alterações notáveis não são evidenciadas nesta etapa (FRAZIER & WESTHOFF, 1978). Por outro lado, a

utilização, pelos microrganismos, dos produtos resultantes da hidrólise das proteínas, bem como de outras substâncias nitrogenadas não protéicas, é a principal responsável pelas marcantes alterações dos alimentos em processo de deterioração. (LEITÃO, 1985). Não são muitas as bactérias que evidenciam intensa atividade proteolítica; porém espécies do gênero *Pseudomonas* demonstram tal capacidade. (FRAZIER & WESTHOFF, 1978).

Entre as substâncias nitrogenadas não protéicas presentes nos alimentos, particularmente produtos de origem animal, destacam-se principalmente os aminoácidos livres, amidas, inosina, guanidina, creatina, purinas e pirimidinas, uréia e o óxido de trimetilamina-TMAO, em pescado marinho (LISTON, 1980; SHEVAN, 1976). Essas substâncias são metabolizadas por muitos microrganismos e são os produtos resultantes desta utilização os principais responsáveis pelas alterações dos alimentos protéicos, e, nestas condições, a atividade proteolítica por parte dos microrganismos contaminantes destes alimentos não é, em absoluto, essencial para se evidenciar o processo de deterioração. (LEITÃO, 1985).

De acordo com LISTON, 1980, em estudos relativos à deterioração na utilização de proteínas e substâncias nitrogenadas não protéicas, caracterizou-se que inicialmente os aminoácidos e outras substâncias nitrogenadas não protéicas são utilizados pelos microrganismos, em que ocorre um desenvolvimento seletivo de algumas bactérias, particularmente *Pseudomonas* e *Alteromonas*, que são capazes de rápida utilização destes compostos, originando a formação de produtos de aroma desagradável e pronunciado, alterando fundamentalmente a composição do substrato (Figura 2.9). Em conseqüência desta alteração e com o esgotamento gradativo das substâncias nitrogenadas não protéicas no substrato, cessa a repressão da produção de protease, iniciando-se, então, os processos proteolíticos, que causa uma reposição de aminoácidos no substrato, e, nestas condições, há um aumento na formação de produtos de decomposição, acelerando as alterações no substrato.

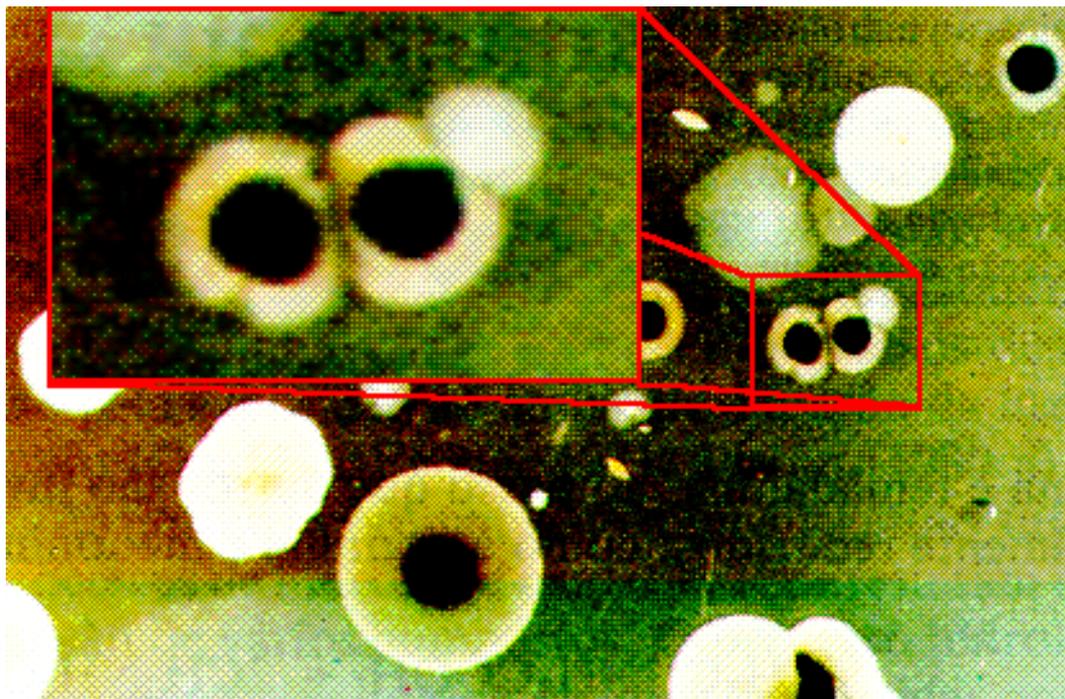


Figura 2.9. *Pseudomonas* (*Alteromonas*) *putrefaciens* visualizados em ágar peptona ferro evidenciando núcleo negro devido à produção de  $H_2S$  (adaptado de LEITÃO, 1985)

BANWART, 1979, retifica que a decomposição dos aminoácidos constitui-se na principal alteração na deterioração de alimentos protéicos, e os produtos resultantes irão depender do tipo de microrganismo participante no processo, a natureza do aminoácido, temperatura, disponibilidade de oxigênio e tipos de inibidores.

Algumas bactérias psicrotróficas, entre elas a *Pseudomonas fragi*, produzem uma alteração de aroma, caracterizado pelo odor pronunciado de frutas, devido à formação de ésteres dos ácidos acéticos, propiônico, butírico e hexanóico, a partir de aminoácidos como a glicina, leucina e serina (SHEWAN, 1979).

Além da enorme diversidade de produtos oriundos da decomposição de aminoácidos, a utilização das demais substâncias nitrogenadas não protéicas propiciará o acréscimo dos compostos resultantes da degradação, similares ou diversos daqueles formados a partir de aminoácidos, assim, a partir de amidas, imidas e uréia haverá intensa produção de amônia; a decomposição da guanidina e creatina resultará na presença de uréia e amônia, ao passo que a de aminas, purinas e pirimidinas propiciarão o acúmulo de amônia. É interessante destacar que na deterioração de substratos nitrogenados, protéicos ou não, ocorre com relativa freqüência uma elevação do pH, atribuída à alcalinização do meio, em decorrência

da formação de aminas, diferenciando-se, portanto, do processo de deterioração de substâncias ricas em carboidratos, ao qual a acidificação e queda do pH são geralmente observadas. (LEITÃO, 1985).

Alguns produtos decorrentes da utilização microbiana de aminoácidos específicos merecem atenção especial, como é o caso da decomposição do triptofano, resultando na formação do indol e escatol, que em concentrações elevadas apresentam aroma pronunciado e desagradável, e também o caso da descarboxilação de certos aminoácidos como a lisina e ornitina, resultando na formação de aminas de aroma muito intenso, como a cadaverina e putrescina (BANWART, 1979).

A histidina livre presente nos alimentos é decomposta pelas bactérias resultando no acúmulo de histamina nos tecidos. E a presença de histamina e outras aminas biogênicas nos alimentos, em concentrações acima de 100mg/100g, tem sido apontada como responsável por casos de surtos de intoxicações (ICMSF, 1978). Os produtos voláteis resultantes da decomposição microbiana de aminoácidos sulfurados são particularmente importantes; entre eles, o gás sulfídrico ( $H_2S$ ), produzido a partir da cisteína, o dimetil sulfeto  $(CH_3)_2$  e o metil mercaptano -  $CH_3 SH$ , formados a partir da metionina, são os principais compostos responsáveis pelo odor nauseante e deterioração do produto. (SHEWAN, 1976; SHEVAN & MURRAY, 1979).

As gorduras presentes no alimento estão sujeitas a processos de hidrólise e oxidação, que resultam na formação de vários compostos. O processo hidrolítico é catalisado pelas lipases, enzimas produzidas por algumas bactérias, principalmente como as do gênero *Pseudomonas*, psicrotrófica associada com a deterioração de alimentos gordurosos mantidos sob refrigeração (BANWART, 1979). As gorduras deterioradas são denominadas rançosa, cabendo diferenciar a rancificação hidrolítica, geralmente de origem microbiana, da oxidativa, que não envolve a participação de microrganismos. Na rancificação hidrolítica, ácidos graxos são liberados das moléculas de triglicerídios, sendo que os de cadeia curta, como o butírico, capríco e caprílico, causam odores estranhos nos alimentos nos quais estão presentes. Entretanto, exceto pelas alterações perceptíveis do aroma, a rancificação hidrolítica não é tão problemática quanto a rancificação oxidativa, que é um fenômeno complexo, no qual o oxigênio reage com os ácidos graxos insaturados, formando hidroperóxidos; estes compostos, não aromáticos,

rapidamente se degradam a compostos carbonílicos, constituídos de misturas de aldeídos e cetonas, saturados e insaturados. (BANWART, 1979; GOULD & PETERS, 1971).

Além das alterações marcantes decorrentes da utilização de carboidratos, proteínas e lipídios, o desenvolvimento bacteriano na superfície ou interior dos alimentos ainda pode ser responsável por outras modificações, muitas das quais perceptíveis sensorialmente, como, por exemplo, alterações na coloração e viscosidade dos alimentos. No que diz respeito à coloração, as diferentes espécies do gênero *Pseudomonas* merecem especial consideração. Estas bactérias produzem pigmentos de diferentes naturezas e colorações, destacando-se, entre eles, os fluorescentes na luz ultravioleta, em comprimento de onda inferior a 260 nm, solúveis e de coloração amarelo-esverdeada, ao lado dos pigmentos não fluorescentes, de coloração verde (clororafina), laranja (fenazina), azul (piocianina), pigmentos solúveis ; além disso, algumas espécies produzem pigmentos carotenóides, insolúveis em água. (DOUDOROFF & PALLERONI, 1974).

### **2.2.5. Alteração no sabor e aroma provocado por *Pseudomonas* spp em carnes estocadas**

Devido à diversidade dos compostos químicos presentes na carne, uma variedade de microrganismos está presente. Em extensão de sua vida de prateleira, a carne é considerada como um potencial substrato para o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores (NYCHAS et al, 1988).

O crescimento requerido de algumas bactérias , de acordo com sua capacidade de degradar a carne como substrato, bem como resultado da ação microbiana sobre substrato da carne, um número de compostos voláteis é produzidos, e a presença desse composto afeta a qualidade da carne, principalmente em relação ao sabor e aroma. GIL (1986). Um número de artigos na literatura demonstra a correlação entre a microbiota em carnes e os compostos voláteis produzidos pela atividade microbiana sobre o substrato, entre eles citamos DAINTY & HIBBARD 1980; CHAVEZ & GUERRERO 1991; EDWARDS et al 1987.

As *Pseudomonas* spp., aeróbias estritas, são consideradas como o microrganismo mais importante na deterioração aeróbia de carnes estocadas,

embora seja o organismo mais responsável pelo odor putrido, os voláteis produzidos aparecem unicamente quando o substrato metabolizado muda para aminoácido. (GREER, 1989). Enquanto em cultura pura, *Pseudomonas spp* produz ésteres, contendo compostos sulfurados e dois hidrocarbonos 11-carbono, *B. thermosphacta* produz acetoina e dois álcoois de cadeias ramificadas; e um largo número e grandes quantidades dos produtos finais de *B. thermosphacta* são detectados quando seu número é relativamente alto comparado ao de *Pseudomonas spp*, verificando que a dominância das *pseudomonas* decresce à concentração de diacetil e acetoina, porque muitos componentes como propileno e butileno glicol servem como uma fonte de carbono para algumas strains de *Pseudomonas spp*. (GUERREIRO & TAYLOR , 1995).

DAYNTY et al (1985), em estudos realizados com carnes estocadas em ar, encontraram um total de contagem de células viáveis de  $10^5$  a  $10^7$  por grama em meio seletivo, *B. thermosphacta* foi concomitante com *Pseudomonas spp.*, mas após 3 dias, *Pseudomonas spp.*, tornou-se dominante. Entretanto, após outros 3 dias, *B. thermosphacta* ultrapassou *Pseudomonas spp.* Lá é uma reproduzível seqüência de eventos em carne, onde o inicial leite/manteiga/gordura/queijo tem odores devido à acetoína, diacetil e 3metil-1-butanol, e 2-metil propanol, devido ao metabolismo de *B. thermosphacta* ( $10^8$  UFC/g); depois, odores de fruta foram devido a etil esters de cadeia curta e ácidos gordos produzidos por *Pseudomonas spp*, e, finalmente, quando as *pseudomonas* estão presentes a  $10^9$  UFC/g, um odor sulfídrico aparece com formação de limo. (DAINTY, 1985).

Um grupo de compostos que tem sido considerado como indicador de deterioração de carnes é o de aminas biogênicas. Esses são, biologicamente, ativos alifáticos, aromáticos e heterocíclicos orgânicos basicamente de baixo peso molecular, que são formados e degradados durante o metabolismo de homens, animais, plantas e microrganismos. (BUCKENHUSKES, 1993). Em alimentos, a maioria de aminas biogênicas é formada por descarboxilação do correspondente aminoácido por enzimas do específico substrato derivado de microrganismos, contudo, *Pseudomonas spp.* e *B. thermosphacta* mostraram a não evidência de produção dessas duas aminas e análises de arginina, a usual precursora de putrescina, não foi detectada em *Pseudomonas spp.*, embora em *P. aeruginosa*, transformação de arginina a putrescina por agmatina é reportada. (NYCHAS et al 1988; EDWARDS et al 1985; CHAVEZ & GUERREIRO 1991).

MCMEEKIN (1974) estudou a habilidade de cultura pura de bactérias isoladas de carne de peito de frangos deteriorados e testadas em carne de peito de frango estéril, de produzir fortes odores, observando a mudança na flora durante estocagem e a incidência e identificação do microrganismo capaz de produzir fortes odores durante estocagem em refrigeração. Segundo o autor, a microbiota predominante no experimento foi de *Pseudomonas* do grupo I (22%) e II (73%), com *Pseudomonas* do grupo IV, apesar de que as *Pseudomonas* do grupo II foram as mais favorecidas pelas condições e aumentaram rapidamente tornando-se maior quantidade que as outras, e durante a deterioração, esta é uma seleção de tipos hábeis a produzir forte odor quando inoculadas sobre a carne estéril.

MCMEEEKIN (1977), baseando-se nos resultados do experimento anterior, procedeu este experimento testando em coxas de frangos deterioradas e observou que o desenvolvimento de fortes odores, característicos de alimentos frescos mantidos à temperatura de refrigeração, resulta o crescimento e metabólicos de restrito grupo de psicotróficos. MCMEEKIN concluiu que 8 de 54 *pseudomonas* fluorescentes isoladas produziram odor pungente semelhante a sulfídrico, o qual, o mesmo destaca, ser uma propriedade de *Pseudomonas fluorescens*, e 28% das *pseudomonas* do grupo II produziram odores do tipo "fruity ester". Ressalta o autor que as *Pseudomonas* do grupo I e II desenvolveram mais rapidamente sobre a coxa de frango deteriorada estocada a 2º C e dominaram a deterioração associada. *Acinetobacter* e *Moraxella* também cresceram rapidamente, mas após 8 dias decresceram em relação as *Pseudomonas*. O quadro 2-13 apresenta compostos voláteis produzidos por alguns microrganismos de deterioração de carnes.

Microorganismos	condições	compostos
<i>Pseudomonas spp</i>	Quando a glicose é exaustada, aminoácidos são atacados	Mal odor devido ao sulfito, ésteres e ácidos
<i>B. thermosphacta</i>	Aeróbio: em meio complexo  Em meio mínimo  Anaeróbio	Acetoina, ácidos acéticos, isobutírico, isovalérico e três aldeídos e álcoois vários odoríferos Produto final incluindo Ácidos gordos de cadeia ramificada Ácido láctico e pequenas quantidades de voláteis odor leve
Enterobacteriaceae	a 10° C quando a glicose ou glicose-6-P é exaustada, utiliza aminoácidos	Aminas biogênicas sulfidos orgânicos H <sub>2</sub> S Mau odor
Bacteria acida láctica	Utiliza a glicose e arginina	Ácidos gordos voláteis e algumas strains também produzem H <sub>2</sub> S

Quadro 2.13. Compostos voláteis originados de microrganismos encontrados em carnes

Fonte: GUERREIRO & TAYLOR, 1995

### 2.2.6. Comportamento de *P. fluorescens* junto a outros microrganismos em carnes de frango embaladas em uma atmosfera modificada

A qualidade das carnes embaladas a vácuo é de grande interesse do ponto de vista microbiológico, devido a maior duração da vida útil desse alimento. Na embalagem a vácuo faz-se a introdução da carne em sacos plásticos, seguida da eliminação do ar, e fechamento com um soldador térmico, mediante uma máquina para essa finalidade. Do ponto de vista microbiológico, o interessante desse tratamento é a modificação da atmosfera que envolve o alimento. Antes que se feche a embalagem nem todo oxigênio é eliminado, parte do que fica é consumido pela flora aeróbia e pela própria carne, o que dá como resultado o aumento da concentração de gás carbônico, que é o inibidor da flora microbiana existente na carne, e a quantidade de oxigênio e gás carbônico é regulada, em grande parte, pelo grau de permeabilidade da embalagem que impede o intercâmbio gasoso com a atmosfera exterior da embalagem. (JAY, 1994).

Um grande número de investigadores, relata que quando se utiliza uma embalagem permeável ao oxigênio, as carnes frescas refrigeradas sofrem alterações por bactérias Gram-negativas, que vão acompanhadas do aumento de pH e de odores desagradáveis, sendo que os microrganismos predominantes pertencem a espécies do gênero *Pseudomonas*, pois a duração da vida útil da carne embalada a

vácuo é inversamente proporcional a permeabilidade da película que recobre a carne. Conforme aumenta a permeabilidade da película da embalagem, aumenta o crescimento das espécies de *Pseudomonas*. Por outro lado, se se utiliza uma embalagem impermeável ao oxigênio como consequência do aumento da concentração de gás carbônico e da diminuição do potencial de óxido redução (Eh), resulta em um favorecimento ao crescimento das bactérias acidoláticas e, às vezes, ao do *Brochothrix termosphacta*, e estes microrganismos provocam um decréscimo do pH criando um meio desfavorável para a maioria dos patógenos procedentes de alimentos e para as bactérias Gram-negativas. (VARELTIZIS, et al 1984; RONING et al 1987).

De acordo com HENRY et al, citado em JAY (1994), quando se trata de filé embalado a vácuo procedente da carne fresca, a flora inicial está integrada de *estreptococos*, *micrococos*, *estafilococos* coagulase-negativa, tipos de *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. Após conservação de 4 dias a 2° C, embalado em uma película de PVC, as *pseudomonas* constituiriam 86% da flora. E quando a carne em barras embalada a vácuo ou em nitrogênio, com um armazenamento de 49 dias em temperatura compreendida entre - 4° C e 7° C, não se observaram diferenças significativas quanto ao número de microrganismos, se bem que ao chegar ao dia 49, para ambos os tratamentos, a flora inicial pertence aos psicrotróficos, envolvendo com 32-34% as *Pseudomonas* e com 24 - 38% *Brochothrix*. (KLAENHAMMER, 1988).

MARSHALL-DL et al, (1992), estudaram o comportamento de *Pseudomonas fluorescens* e *Listeria monocytogenes* inoculadas em cultura mista sobre frango cozido durante baixa temperatura de estocagem, o qual foram avaliados junto com a influência da embalagem com dois tipos de atmosferas modificadas (AM1 = 76% CO<sub>2</sub>; 13,3% N<sub>2</sub>; 10,7% O<sub>2</sub> e AM2 = 80%CO<sub>2</sub>; 20% N<sub>2</sub> e 0% O<sub>2</sub>) sobre a interação entre as duas bactérias. Os autores observaram que o crescimento *L. monocytogenes* foi estimulado pela presença de *Pseudomonas fluorescens* em ar e AM1 à 3° C, entretanto isso não ocorreu em AM2. Em temperatura de 3° e 7° C, *P. fluorescens* foi inafetada pela presença de *L. monocytogenes*, considerando as duas atmosferas. O crescimento de *P. fluorescens* foi inibido em ar e AM2 a 11° C e em etapas depois de incubação em AM1, *P. fluorescens* foi inibido pela presença de *L. monocytogenes* a 11° C.

YANYUN-ZHAO et al (1992) desenvolveram um modelo matemático para descrever o efeito combinatório da temperatura e do tempo e composição inicial de gás em atmosfera modificada de estocagem sobre o crescimento de populações de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens* em carne de frango. As análises estatísticas demonstraram que os resultados do crescimento de *L.monocytogenes* e *P. fluorescens* em frango revelaram que a interação da temperatura com a atmosfera modificada não foram significativas, os autores concluíram que, o modelo matemático aplicado foi satisfatório e aplicável para determinar o crescimento populacional bacteriano em atmosfera modificada de estocagem, a concentração de oxigênio de 0% a 20,99% e dióxido de carbono a concentração de 0,03% a 80%.

### **2.2.7. Comportamento de *Pseudomonas spp* e *P. fluorescens* frente aos antimicrobianos**

Segundo estudos realizados por BLOCK, 1995, *Pseudomonas aeruginosas* são excepcionais entre as bactérias vegetativas em sua resistência a muitos desinfetantes, drogas quimioterápicas, incluindo os antibióticos, e essa inerente resistência é atribuída à impermeabilidade dos componentes, lipoproteína e lipopolissacarídeo do envelope celular das Gram-negativas.

As *Pseudomonas* são sensibilizadas em sua membrana ativa por desinfetantes como fenóis, compostos quaternários de amônia e biguaninas, que liberam os lipídios da parede celular por seqüestro de íons magnésio e também a deficiência do grupo fosfato, encontrado em lipopolissacarídeos de uma *Pseudomonas* clorhexidine-resistente. (BLOCK, 1995).

RACCACH, 1984, estudou o mecanismo de inibição de antioxidantes fenólicos como BHA, BHT e TBHQ. A atividade antimicrobiana de antioxidantes fenólicos depende da presença de um grupo hidroxila sobre a molécula, a solubilidade lipídica do composto que impede o grau de esterificação e que também é modificada por fatores como : espécies e estirpes microbianas, microrganismos estressados, tipo e concentração do antioxidante fenólico, concentração de microrganismos, combinações dos antioxidantes fenólicos e aditivos de alimentos, componentes de alimentos, transporte de antioxidantes fenólicos e o modo de

adição do antioxidante fenólico no alimento. O mecanismo de inibição de antioxidantes fenólicos é afetar a função e composição da membrana celular; síntese de DNA, RNA, proteína e lipídio e a função da mitocôndria. Testando os componentes fenólicos frente as *Pseudomonas spp.*

O autor observou que ocorre uma reação dos componentes com a membrana prejudicando a sua função e sua integridade. E que a interação dos componentes antioxidantes fenólicos com a membrana provoca um vazamento intracelular, e alguns desses fenômenos foram notados com *P. fluorescens* e *P. fragi* expostas a BHA (100-200 ppm). Elas perderam UV (280 nm) material absorvido, sugerindo vazamento intracelular de material protéico anteriormente incorporado de  $^{14}\text{C}$  composto rotulado (DAVIDSON & BRANEN, 1980). Observou-se também que quando *P. fluorescens* foi tratada com BHA aumento de quantidade de vazamento celular foi maior do que quando *P. fragi* foi tratada por BHA, mostrando que *P. fluorescens* foi mais sensível que *P. fragi* a esse antioxidante fenólico. (DAVIDSON & BRANEN, 1980).

De acordo com os mesmos autores, o vazamento intracelular foi observado antes da morte acontecer, e outros autores como DEGRE & SYLVESTRE, (1983) também relataram que a atividade bactericida do BHA se dá por vazamento de material intracelular. Antioxidantes fenólicos induzem mudanças nos lipídios celulares, BHA (100 ppm) aumentou a quantidade de fosfatidil glicerol e diminuiu a quantidade de fosfatidil etanolamine em *P. fragi* e não em *P. fluorescens*, e esses resultados sugeriram alteração na quantidade de síntese desses fosfolipídios, principalmente uma mudança na distribuição de carga na membrana, deste modo afetando interação proteína-lipídio e alterações na membrana, e BHA (50 ppm) causa um declínio na proporção de ácidos gordos saturados e insaturados em *P. fluorescens* e aumenta na proporção em *P. fragi* e, essa mudança, nos ácidos gordos, provavelmente acontece para manter um estado fluídico próprio na membrana celular. (DAVIDSON & BRANEN, 1980).

HAMILTON & AHMAD (1994), caracterizaram e isolaram *Pseudomonas* de carcaças de frango processadas na Jamaica frente à eficácia de 5 antibióticos (tetraciclina, kanamicina, streptomina gentamicina e neomicina) com o intuito de aumentar a vida de prateleira de frango eviscerado e resfriado (frangos comprados em retalho). Os autores concluíram que embora as neooxitretetraciclinas são extensivamente usadas na Jamaica para tratamento de infecções em frango, as

tetraciclina (fornece um hidrócloro) mostraram ser altamente efetivas frente às *Pseudomonas* isoladas (o maior microrganismo deteriorador) a uma concentração abaixo de 10 mg/mL; 84,5% de *Pseudomonas* isoladas foram sensíveis para 1 mg/mL de tetraciclina.

DABBAH, et al (1970) analisaram as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais, terpineol e óleo de laranja, frente a *Pseudomonas spp* em leite desnatado com pasteurização comercial, leite com pouca gordura e leites de mais de 56 dias de estocagem a 4° C, com intuito de verificar a extensão da vida de prateleira. Os autores verificaram que o óleo essencial de laranja inibiu o crescimento de *Pseudomonas spp* (no. 18) que foi de 30 - 90% quando o inócuo era de  $10^4$  a  $10^8$ , concluindo que a possibilidade de uma concentração ótima da bactéria para uma dada quantidade de óleo é expandir o aumento na inibição de crescimento. Terpineol reduziu o crescimento inicial de *Pseudomonas spp* (no. 18), com uma inibição de crescimento de 100%, enquanto que para o óleo de laranja foi de 87%, e o inócuo inicial de células de uma estirpe de *P. fluorescens* foi completamente morto, enquanto que o inócuo inicial de *P. aeruginosa* teve uma redução de 75%.

## **3. MATERIAL E MÉTODO**

### **3.1. Material**

#### **3.1.1. Equipamentos e vidrarias**

Foram utilizados os equipamentos e vidrarias de rotina em laboratório.

#### **3.1.2. Meios de Cultura Solventes e outros**

Foram empregados os meios de cultura ágar de Müller Hilton (MHA - Oxoid CM 337), ágar e caldo de infusão de cérebro e coração (BHI - Difco CM 332), ágar para contagem em placa (PCA - Difco CM 331). Utilizou-se ainda o etanol absoluto PA, dicloro metano PA e sulfato de sódio anidro. Também se utilizou disco de papel marca cefar.

#### **3.1.3. Microrganismo-teste**

Neste trabalho utilizou-se *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. A cultura foi mantida em MHA inclinado a 4· C e transferida a cada duas semanas para o mesmo meio de cultura.

#### **3.1.4. Ervas processadas e ervas *in natura***

As ervas na forma processada e na forma *in natura* utilizadas neste estudo foram adquiridas no comércio de Florianópolis-SC. Estas foram: Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), Açafrão da Índia (*Cúrcuma longa* L.), Orégano (*Origanum* Spp), Alho Porró (*Allium porrum* L.), Tomilho (*Thymus vulgares* L.) e Sálvia (*Salvia officinalis* L.).

### **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Coleta da amostra**

As amostras das ervas processadas e *in natura* foram adquiridas em pontos comerciais da região de Florianópolis-SC.

### **3.2.2. Padronização da cultura estoque**

A padronização da cultura estoque foi realizada de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1988), modificado pelos autores, (Figura 3.1). Após a padronização da cultura estoque, determinou-se o número de células viáveis de acordo com a metodologia recomendada no APHA (1992), (Figura 3.2).

### **3.2.3. Obtenção do extrato aquoso de ervas na forma processada e de ervas na forma *in natura***

O preparo da amostra deu-se de acordo com EVERTING & DEIBEL (1992); modificado pelos autores, conforme mostra a Figura 3.3. As ervas *in natura* foram lavadas e moídas em moinho de faca, e as ervas processadas apenas moídas em moinho de faca, sendo ambas, posteriormente pesadas em um Erlemeyer de 250 mL, individualmente, a fim de se obter 1 grama de cada erva. Em seguida foram adicionados 100 mL de Agar de Müller Hilton previamente fundidos. A mistura foi autoclavada a 121° C por 15 minutos. Após, realizou-se a distribuição em placas de Petri utilizando a técnica do Gradiente de concentração, demonstrado no item 3.2.5. As placas foram acondicionadas em geladeira por 24 horas antes do uso.

### 3.2.4. Obtenção do Óleo resina

O preparo da amostra e a obtenção do óleo resina (Figura 3.4) foram realizados conforme as NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), modificada pelos autores.

Após aquisição no comércio local as ervas processadas foram levadas ao laboratório. No laboratório as mesmas foram submetidas à moagem e fracionadas em peneira de 50 mesh para formarem um pó fino e facilitarem a obtenção dos extratos. Posteriormente, então, determinou-se a umidade do pó da seguinte forma:

**Umidade do pó** : Pesou-se 5 g de amostra em um frasco coletor do dessecador previamente tarado, e transferiu-se para uma estufa a 105° C por 1 hora.

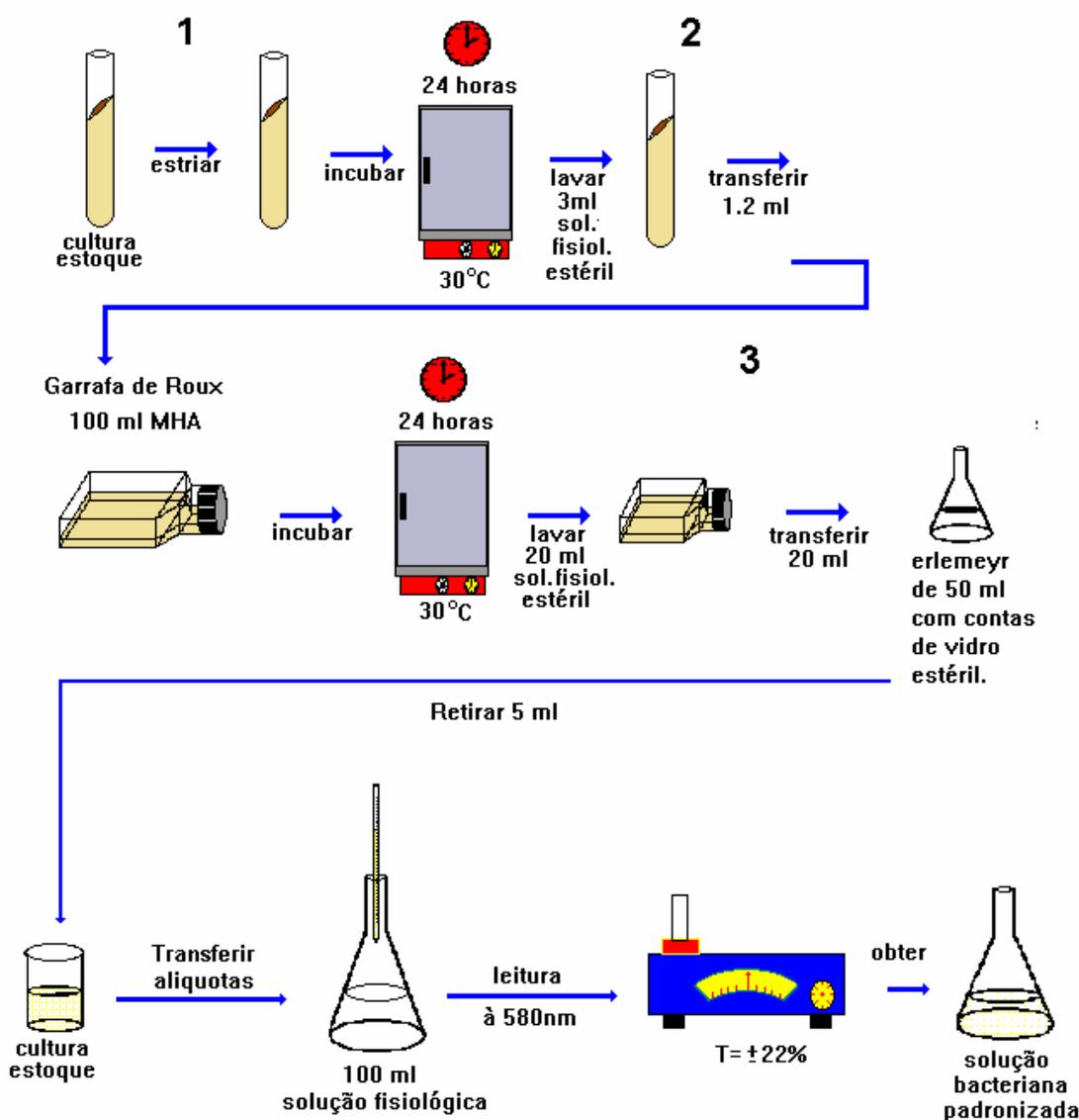


Figura 3.1. Padronização da cultura estoque

Resfriou-se em dessecador até a temperatura ambiente. Pesou-se. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até o peso constante. Obtendo-se assim a substância seca.

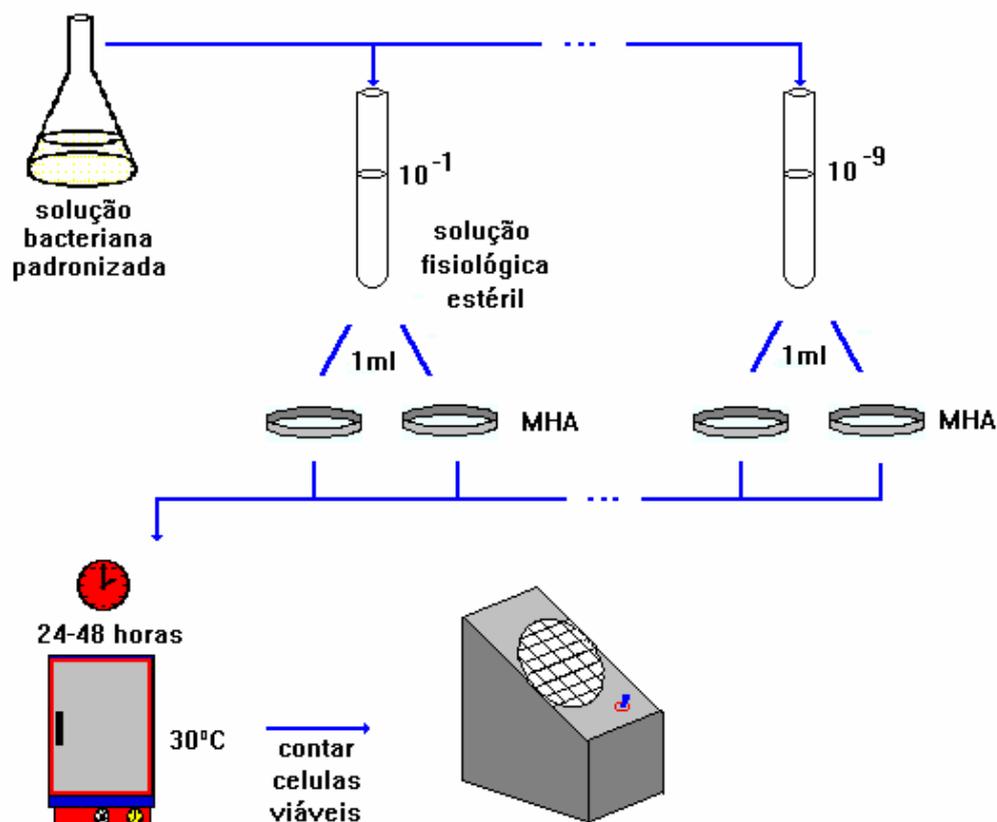


Figura 3.2. Determinação do número de células viáveis da cultura estoque padronizada

A substância seca foi então transferida para o cartucho de um aparelho extrator de Soxhlet, com o auxílio de um pedaço de algodão desengordurado; cobrindo a amostra no cartucho com este pedaço de algodão.

Extraíu-se em aparelho de Soxhlet (cujo balão foi previamente aquecido por 1 hora em estufa a 105°C e resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado) com álcool etílico absoluto, deixando-se em refluxo durante 8 horas aproximadamente. O solvente foi evaporado até obter-se um volume de extrato de aproximadamente 15mL e em seguida adicionou-se em frascos previamente esterilizados e tarados à 105°C, que foram colocados em dessecador ligado a uma bomba a vácuo para perfeita evaporação do solvente. Após a evaporação completa do solvente, o extrato seco foi pesado, fechado, lacrado com fita parafilme, identificado e acondicionado em refrigerador para posterior uso.

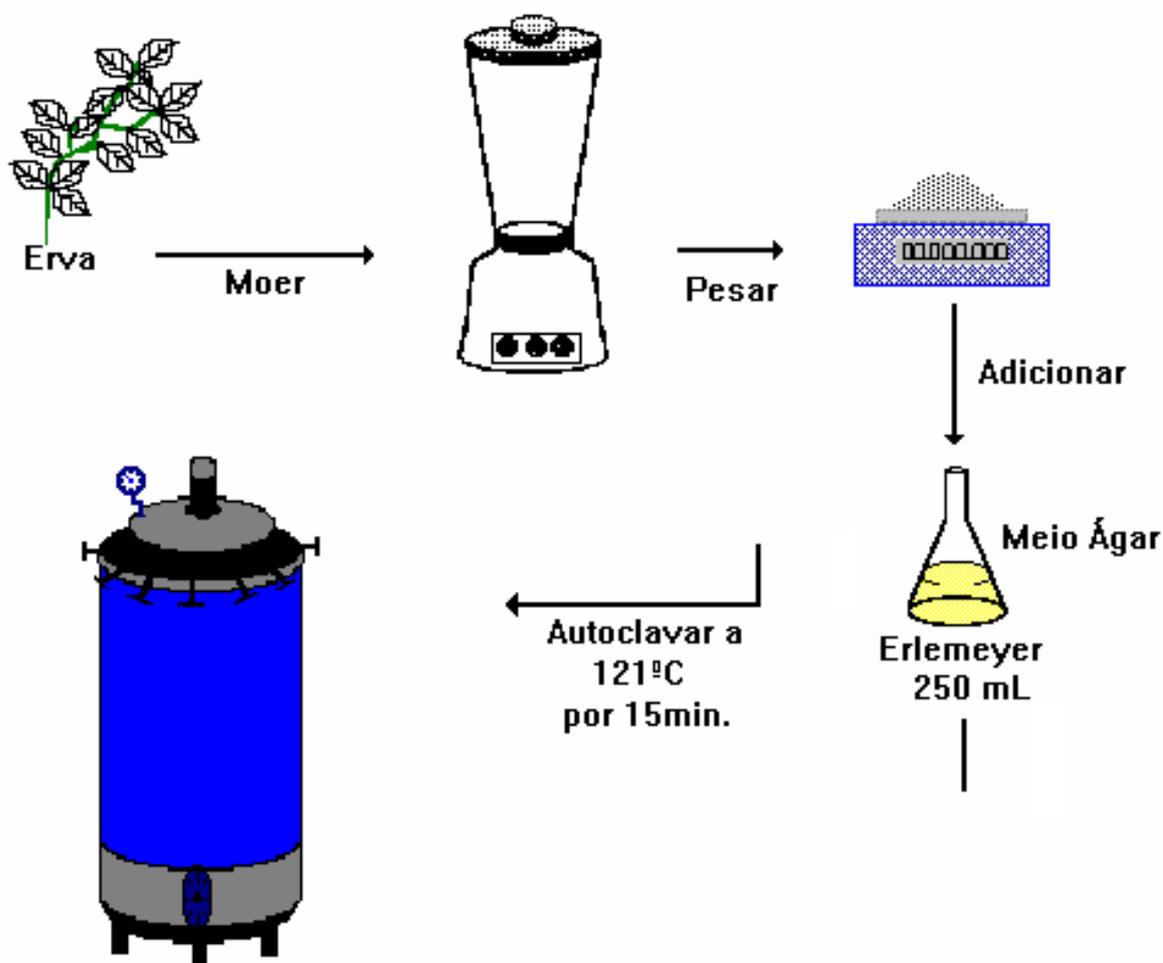


Figura 3.3. Obtenção do extrato aquoso de ERV-IN e ERV-PRO

E através do peso da matéria seca, calculou-se o rendimento de cada óleo resina, obtido a partir de cada erva com a seguinte fórmula:

$$\% R = \frac{\text{PFC} - \text{PFE}}{100}$$

**Legenda:**

R = rendimento de Óleo resina

PFC = Peso do frasco coletor previamente tarado

PFE = Peso do frasco com extrato

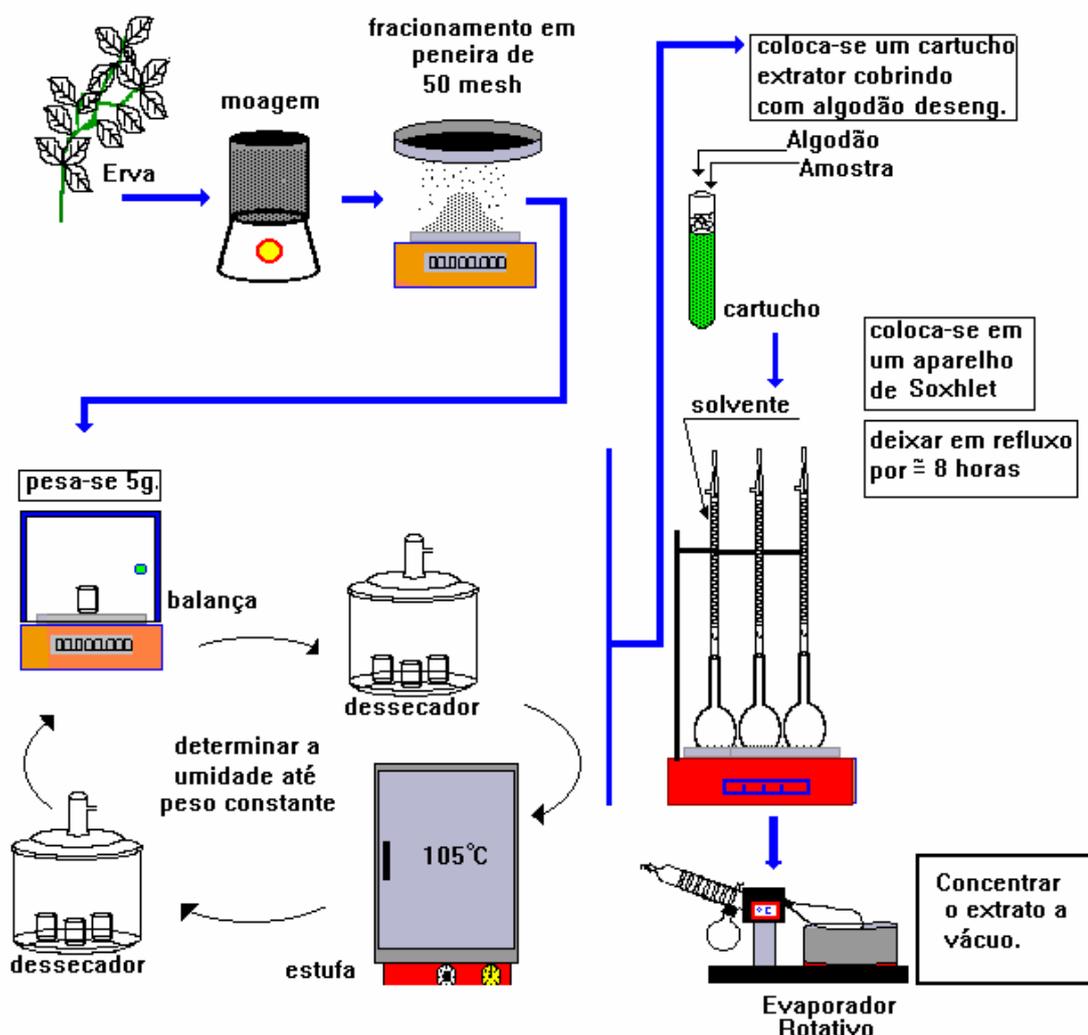


Figura 3.4. Extração de ERV-PRO utilizando o Aparelho de Soxhlet

### 3.2.5. Obtenção do óleo essencial

A obtenção do óleo essencial foi realizada de acordo com os métodos descritos pela AOAC (1992) e FARREL (1995), modificado pelos autores. (Figura 3.5)

As ervas *in natura* foram adquiridas ainda frescas no comércio local. Após a aquisição as ervas foram levadas no mesmo dia ao laboratório. Lá foram pesadas e depois lavadas com água destilada estéril e colocadas a secar somente para tirar o excesso de água em um escurridor. Em seguida foram picadas em um moinho de lâminas, Foram novamente pesadas. Depois foram introduzidas dentro de um balão de fundo redondo, no qual foi adicionada água destilada estéril. Esse balão foi

colocado em uma manta aquecedora com termostato e acoplado a um aparelho de Clevenger , ao qual o óleo essencial foi arrastado pelo vapor formado pela água até a completa estagnação da amostra. O óleo essencial obtido foi tratado com o solvente dicloro metano e com sulfato de sódio anidro, sendo processado em evaporador rotativo para completa evaporação do solvente. Depois este óleo foi colocado em um vidro âmbar previamente esterilizado e tarado , tampado e vedado com fita parafilme e acondicionado em refrigerador para posterior uso.

E através do peso de matéria fresca, calculou-se o rendimento de cada óleo essencial obtido a partir de cada erva com a seguinte fórmula:

$$\% R = \frac{PFC - PFE}{100}$$

**Legenda:**

R = rendimento de Óleo essencial

PFC = Peso do frasco coletor

PFE = Peso do frasco com óleo essencial

### **3.2.6. Teste da difusão em placas utilizando disco de papel.**

A técnica da difusão em placa usando disco de papel (Figura 3.6) foi realizada de acordo com AURELI, P. et al (1992) e LARRY J. MATURIN, IN : FDA - Bacteriological Analytical Manual (1992), modificada pelos autores. As placas foram preparadas com MHA e estocadas em refrigerador por 24 horas antes do uso. Uma população inicial de  $10^6$  UFC/mL (Unidade Formadora de Colônias por mililitro) foi semeada sobre a superfície do ágar na placa e espalhada com uma alça de Drigalsky. Posteriormente, os discos estéreis (6,35 mm), de marca Cefar, foram colocados através de uma pinça estéril sobre as placas inoculadas. Em seguida, através de uma micropipeta em posição vertical, 50 µl de uma solução a 1:5 p/v de cada forma de erva (processada ; *in natura* ; óleo resina e óleo essencial), previamente preparadas em etanol absoluto (EtOH), respectivamente, foram lentamente depositados sobre o disco. Todas foram testadas individualmente. Após 24 horas de incubação, a zona de crescimento foi medida através de um

paquímetro. Realizaram-se, também, placas controle com disco-teste embebido em 50  $\mu$ l de água destilada e disco-teste embebido em 50  $\mu$ l de EtOH.

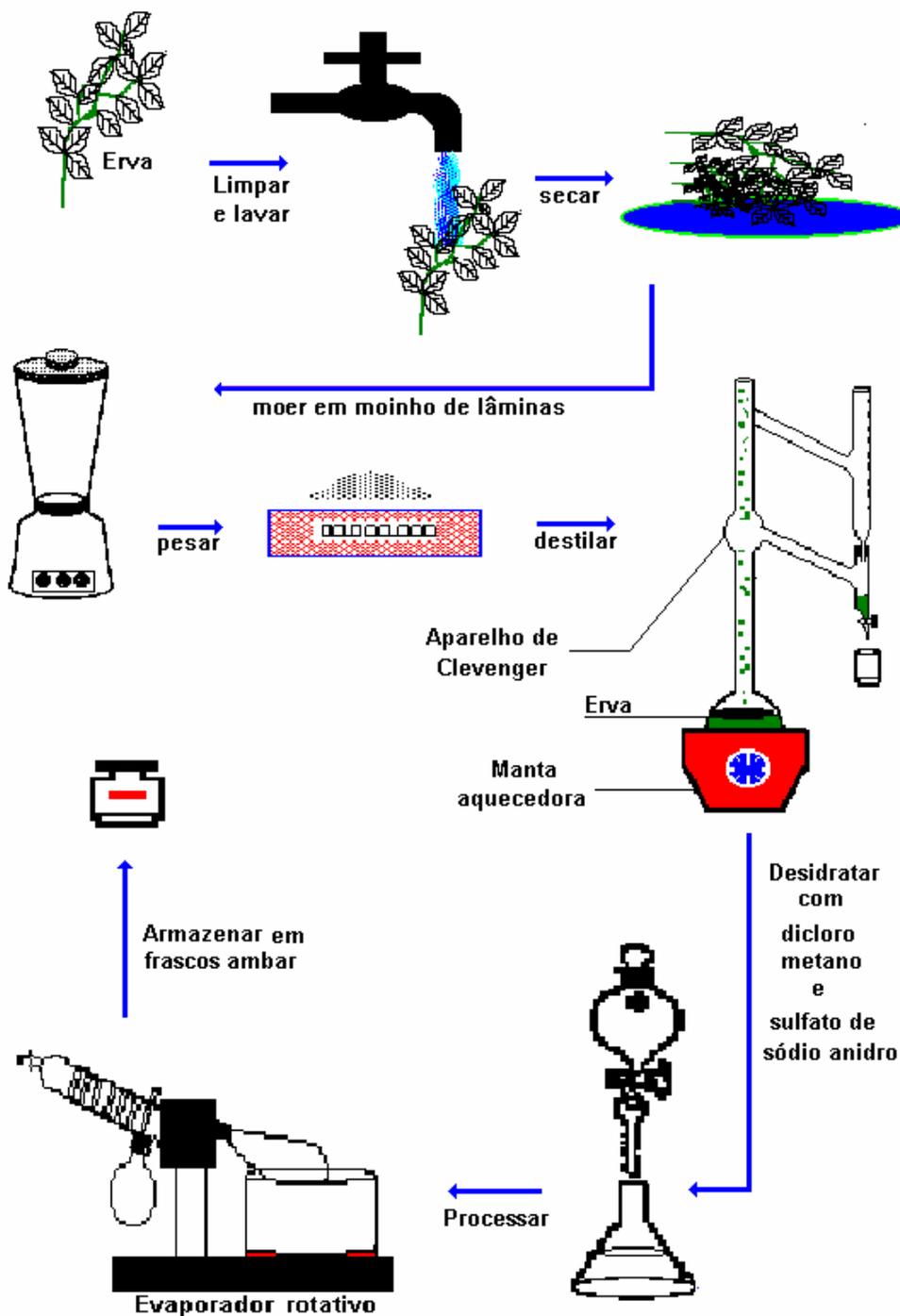
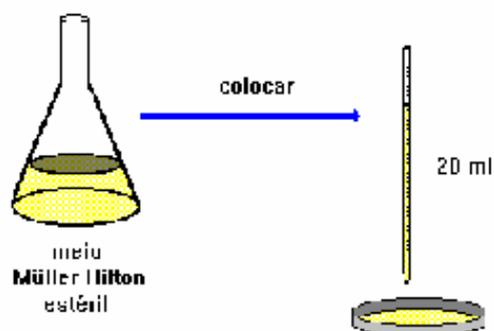
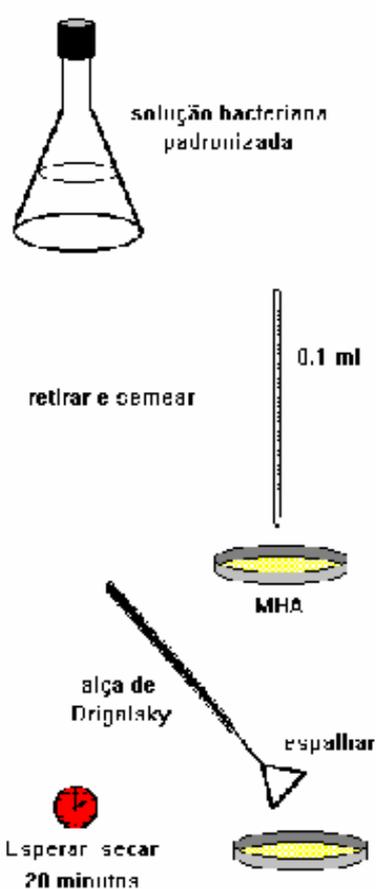


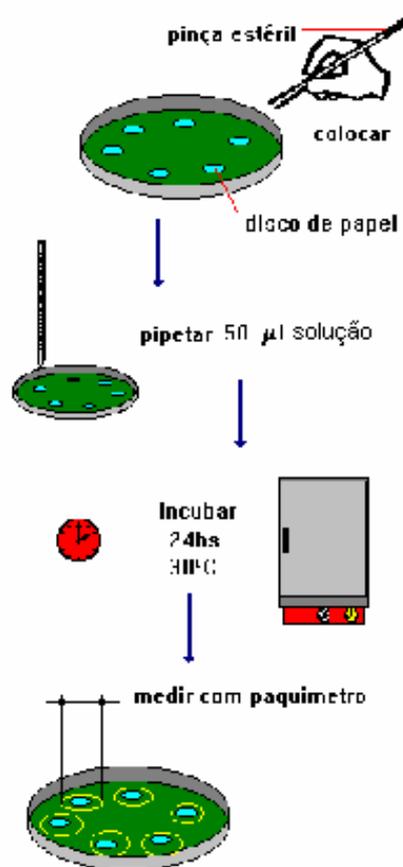
Figura 3.5. Extração de ERV-IN por aparelho de Clevenger



### 1- Preparo do Agar de Müller Hilton



### 2- Cultivo da cultura padronizada em MHA



### 3- Distribuição dos discos empregnados com solução

Figura 3.6. Atividade antimicrobiana das formas de erva (ERV-PRO, ERV-IN) (óleo resina e óleo essencial) sobre *P. fluorescens*: Teste de difusão em placas com ágar utilizando disco de papel

### 3.2.7. Teste do gradiente de concentração em placa

Aplicou-se esta técnica em ervas na forma processada, *in natura*, óleo resina e óleo essencial. O gradiente em placa (Figura 3-7) foi preparado de acordo com SHELEF et al (1980) da seguinte forma: O MHA estéril que contém inicialmente 1% da forma de erva é inclinado de modo a obter uma profundidade de 5 mm. Esperou-se o ágar solidificar-se. As placas foram colocadas em posição horizontal e volume igual unicamente de meio de cultura foi adicionado. Após solidificação do ágar, as placas foram estocadas em refrigerador por 24 horas antes do uso. Cada erva foi testada individualmente. O microrganismo-teste, previamente padronizado a uma população inicial de  $10^6$  UFC/mL (Unidade Formadora de Colônias por mililitro), foi estriado (estria grossa) através de um swab na superfície do ágar da placa gradiente. As placas somente com MHA foram estriadas com o inóculo para um controle. O tamanho do crescimento sobre as placas foi medido através de um paquímetro em mm, após 1, 2, 5 e 7 dias de incubação à temperatura de 30° C e de 25° C. A concentração mínima de inibição para cada forma de erva (processada, *in natura*, óleo resina e óleo essencial) foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{MIC} = \frac{1\% \cdot X}{\varnothing}$$

**Legenda:**

MIC = Concentração mínima de inibição

X = média da medida do crescimento sobre placas

$\varnothing$  = diâmetro da placa

Às ervas que apresentaram total inibição com 1%, foram realizadas baterias subsequentes de testes com menos concentração, com a finalidade de descobrir o MIC, e às que apresentaram inibição acima de 1%, foram consideradas com inibição acima de 1%.

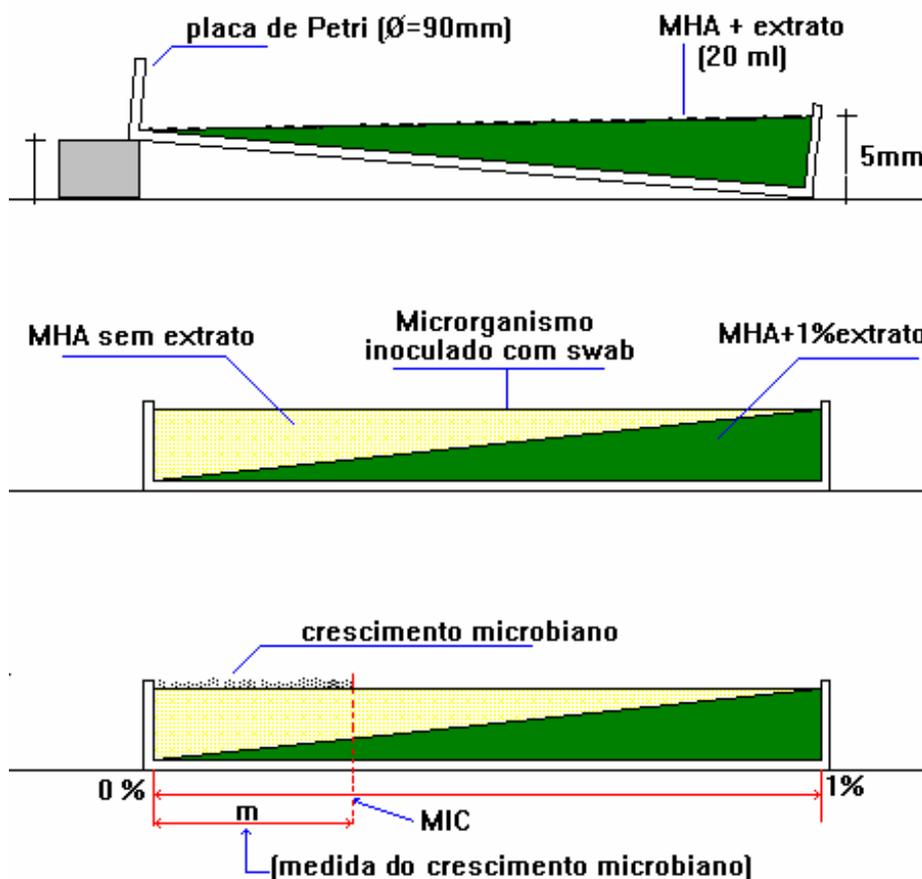


Figura 3.7. Atividade antimicrobiana das ERV-PRO (MIC) sobre *P. fluorescens* :  
Teste do gradiente de concentração em placa

### 3.2.8. Teste da atividade antimicrobiana em caldo

Esta técnica foi aplicada em ervas na forma de erva processada, erva *in natura*, óleo resina e de óleo essencial.

Neste teste empregou-se a metodologia descrita conforme em SHELEF et al (1980); BAHK et al (1990); EVERTING & DEIBEL (1992) e AURELI et al (1992), modificada pelos autores, da seguinte forma: Em um frasco de 250 mL com 99 mL de caldo BHI estéril, introduziu-se 1 mL de uma cultura padronizada a uma população de  $10^8$  UFC/mL de *Pseudomonas fluorescens*. Em seguida, as ervas na forma de óleo resina e óleo essencial a uma concentração de 0.5% foram adicionados individualmente e homogeneizadas, e apenas as ervas na forma de erva processada e na forma de erva *in natura* foram esterilizadas em autoclave junto ao meio de cultura para depois inocular a cultura padronizada de *P.*

*fluorescens* a uma população de  $10^8$  UFC/mL. Logo após, incubou-se em duas temperaturas, de  $25^\circ\text{C}$  e de  $4^\circ\text{C}$ . Nos dias 0, 1, 2, 5 e 7, retiraram-se alíquotas, realizaram-se diluições seriadas e, através da técnica de semeadura em superfície conforme descrita no APHA (1992), procedeu-se ao plaqueamento, incubando-se as placas a  $25^\circ\text{C}$  por até 72 horas, para depois, então, realizar a contagem do número de células viáveis. Figura 3.8.

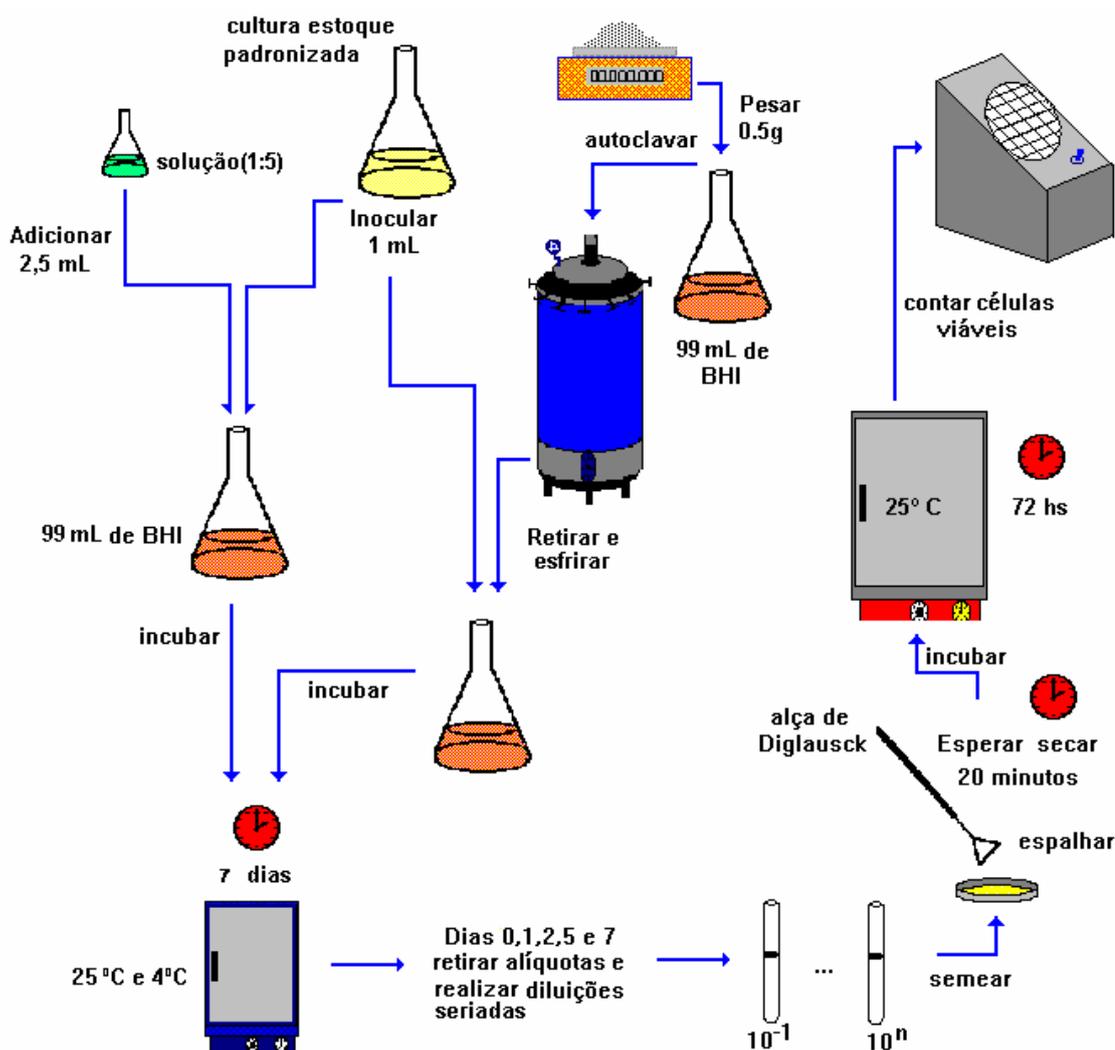


Figura 3.8. Teste de atividade antimicrobina em caldo frente a uma população padronizada de *P. fluorescens*.

### 3.2.9. Atividade antimicrobiana do óleo essencial em peito de frango picado.

O experimental foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa procedeu-se da seguinte maneira, conforme Figura 3.9.

O filé de frango foi adquirido no comercio local de vésperas e colocado na geladeira do laboratório para descongelar. No dia seguinte, na sala asséptica previamente preparada, foi levado até o bico de busen e primeiramente realizou-se a desinfecção da embalagem com algodão e álcool iodado. Após realizou-se a abertura da mesma com um estilete estéril. Em uma assadeira também estéril, sempre próxima da área asséptica, o filé de frango foi então picado através de uma faca estéril com a finalidade de facilitar a homogeneização futura, quando a bactéria e o óleo essencial forem adicionados, favorecendo maior penetração. Em seguida, pesaram-se porções de 25 g e adicionadas em sacos plásticos com zíper para então inocular uma população previamente padronizada de aproximadamente  $10^6$  UFC/mL e Logo após adicionar 1 mL de uma solução alcoólica de óleo essencial de açafraão (1:5 em álcool absoluto) correspondente a 0.2% de óleo essencial de açafraão sobre a superfície do filé de frango picado. Logo em seguida, o saco foi rapidamente fechado e através das mãos, homogeneizado por um período de aproximadamente 5 minutos, para depois ser incubado em uma geladeira com temperatura controlada a  $4^{\circ}$  C. Também se realizou o mesmo procedimento em amostras com inoculação da mesma concentração de *P. fluorescens* mas sem adição de óleo essencial açafraão e em amostras com adição do óleo essencial de açafraão e sem inoculação de *P. fluorescens*, bem como em amostras sem adição de óleo essencial de açafraão e sem inoculação de *P. fluorescens*.

Na segunda etapa foi realizado o monitoramento do material incubado, e procedeu-se da seguinte maneira, conforme Figura 3-10.

No saco plástico onde continha a amostra foi adicionado 225 mL de solução fisiológica (0.9%) e homogeneizado durante cinco minutos. Após, por intermédio de uma micropipeta foi retirado alíquotas de 1 mL, e então se realizaram diluições seriadas em placas de Petri através da técnica de profundidade, conforme descrito em APHA (1992), utilizando o meio de cultura Agar PCA. Em seguida, a solidificação do Agar, incubaram-se as placas por até três dias a temperatura de  $25^{\circ}$  C, para depois realizar a contagem do número de colônias em contador. Esse procedimento

foi conduzido nos dias zero, um, três, cinco e sete dias de incubação. E durante os dias três, cinco e sete foi retirado colônias de características semelhante a cultura pura de *P. fluorescens* que serviu como controle para realização dos seguintes testes bioquímicos : coloração de Gram, catalase, oxidase, crescimento a 4<sup>o</sup> C e 41<sup>o</sup> C, liquefação da gelatina, sendo todos testes positivos para *P. fluorescens*, com a finalidade de monitorar a presença da bactéria durante os três últimos dias de incubação.

### **3.2.10. Análise estatística dos dados**

Realizou-se delineamento de parcela subdividida no tempo para cada temperatura através do teste F ao nível de 5% de probabilidade. As comparações de médias foi realizada através do teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. (MONTEGOMERY, 1991; VIEIRA & HOFMANN, 1989).

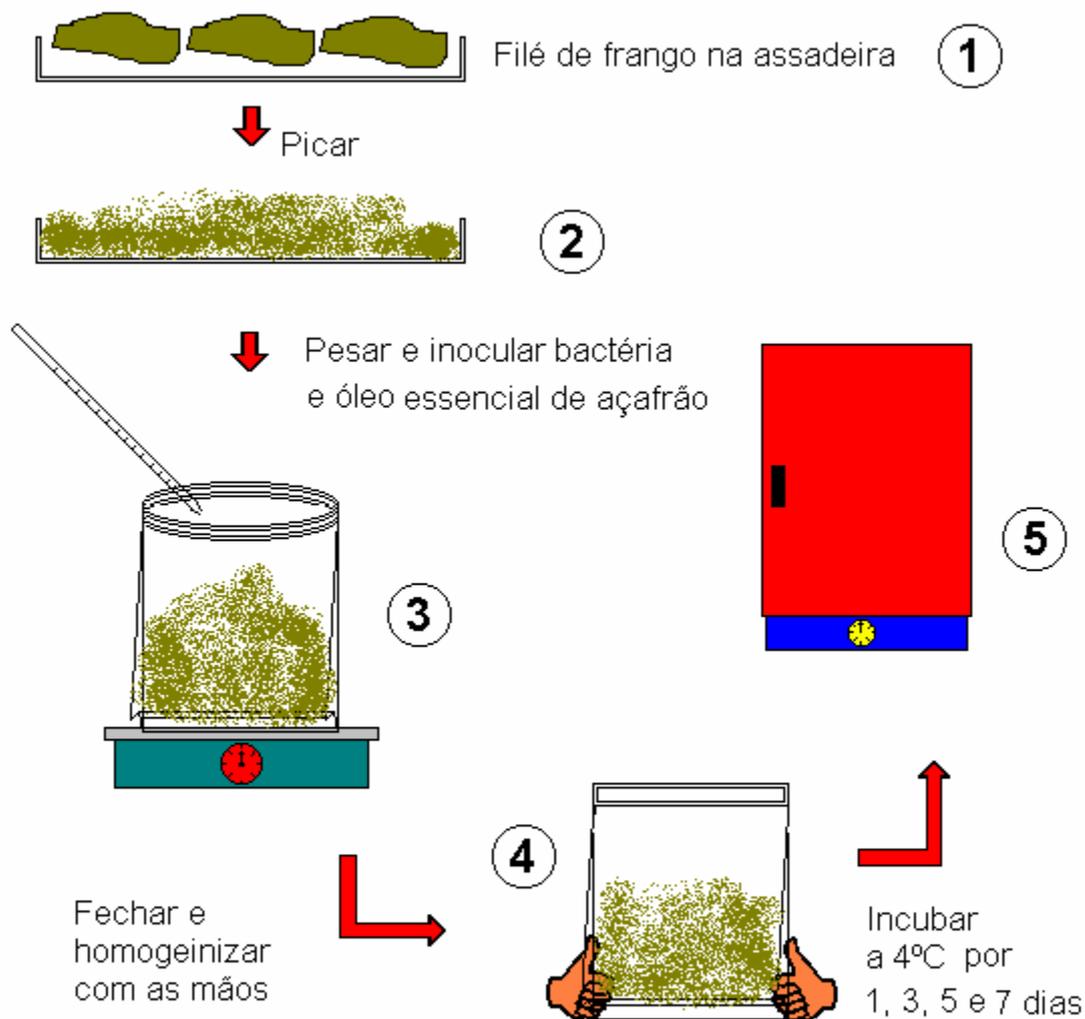


Figura 3.9. Aplicação do óleo essencial de açafrão em carne de frango picada com *P. fluorescens* inoculada a uma população padronizada de aproximadamente  $10^6$  ufc/mL.

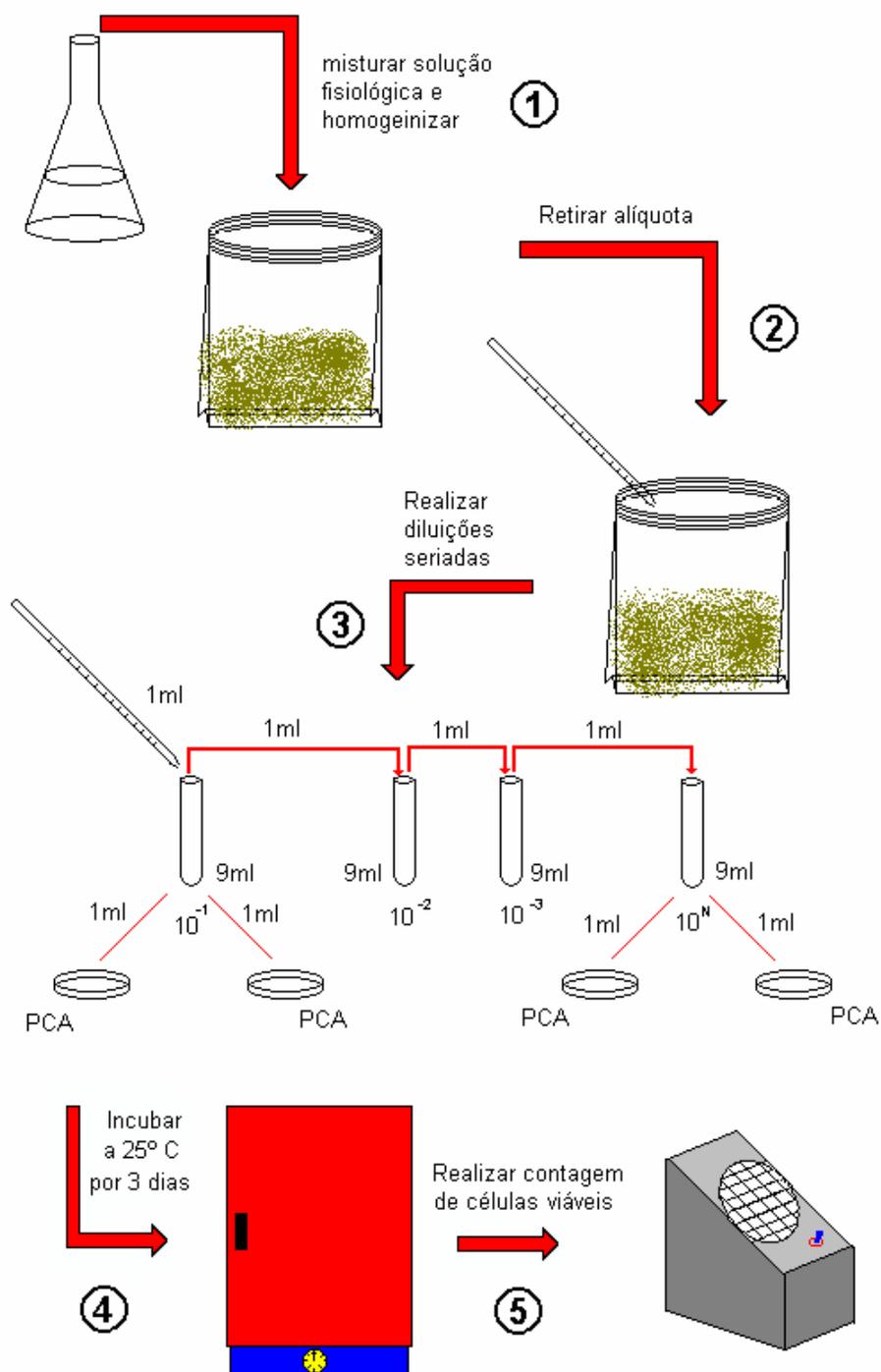


Figura 3.10. 2<sup>a</sup> Etapa : Contagem de células viáveis nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 de incubação

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Padronização do Inóculo

Conforme demonstrado no item 3.2.2, a faixa de 20 a 30% de transmitância a 580 nm foi correlacionada com a população bacteriana com a finalidade de padronizar o inóculo a ser estudado. De acordo com estes resultados observou-se que para obter uma população bacteriana de  $10^6$  UFC/mL deve-se utilizar uma transmitância de aproximadamente 22%. Os resultados deste estudo estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Faixa de transmitância correspondente à população de *Pseudomonas fluorescens*

Transmitância (%)	Contagem Padrão em Placas (C.P.P.) em Unidade Formadora de Colônias (UFC /mL)
20,4	$1.17 \times 10^8$
22,5	$3.2 \times 10^6$
25,8	$4.1 \times 10^4$
28,3	$8.3 \times 10^2$
30,4	$2.3 \times 10^2$

### 4.2. Teste de Difusão em Placas de Ágar utilizando disco de papel

O teste da difusão em placas de ágar utilizando disco de papel foi realizado com a intenção de verificar através de uma rápida avaliação a intensidade de inibição das diferentes ervas frente à *P. fluorescens*, em uma concentração a concentração de 1%, na temperatura de 30° C, por um período de 24 horas.

#### 4.2.1. Erva Processada e Óleo resina

A Tabela 4.2 apresenta a intensidade de inibição de ervas processadas e óleo resina obtida de ERV-PRO sobre o crescimento de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, através do método de difusão em ágar. O rendimento, obtido em 100g de

peso de matéria processada seca (m.p.s.) pelo aparelho de Soxhlet (óleo resina) a partir de ERV-PRO é mostrado na Figura 4.1.

Tabela 4.2. Intensidade de inibição de erva processada e de óleo resina obtida de ERV-PRO sobre *P. fluorescens* ATCC 13525 a uma concentração bacteriana de aproximadamente  $10^6$  UFC/mL.

NOME DA ERVA	INTENSIDADE DE INIBIÇÃO	
	ÓLEO RESINA	ERV-PRO
<b>1. Açafrão</b>	++	+
<b>2. Alecrim</b>	++++	++
<b>3. Alho porró</b>	-	--
<b>4. Orégano</b>	+++	+
<b>5. Sálvia</b>	+++	+
<b>6. Tomilho</b>	+++	+

Legenda :

X = definição arbitrária da extensão do diâmetro da zona de inibição

Sem inibição (X = 0) = --

X < 14 = -

14 mm ≤ X < 20 mm = +

20 mm ≤ X < 26 mm = ++

26 mm ≤ X < 32mm = +++

X ≥ 32 mm = ++++

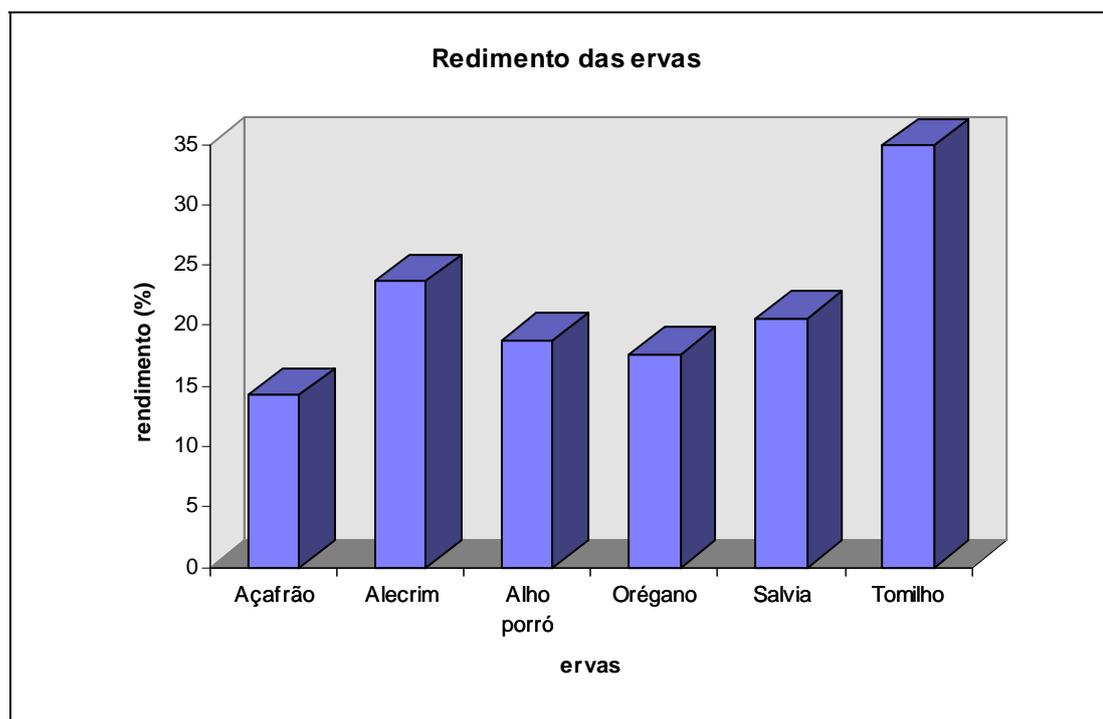


Figura 4.1. Rendimento de óleo resina obtido pelo aparelho de Soxhlet através da ERV-PRO (100g m.p.s.)

#### 4.2.2. Erva *in natura* e Óleo essencial

A Tabela 4.3 apresenta a intensidade de inibição de ervas *in natura* e óleo essencial obtida de ERV-IN sobre o crescimento de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, através do método da difusão em ágar. O rendimento obtido em 100g de peso de matéria fresca (m.f.) pelo aparelho de Clevenger (óleo essencial) a partir de ERV-IN é mostrado na Figura 4.2.

Tabela 4.3. Intensidade de inibição de ervas *in natura* e de óleo essencial de ERV-IN sobre *P. fluorescens* ATCC 13525 a uma concentração bacteriana de aproximadamente  $10^6$  UFC/ML.

NOME DAS ERVAS	INTENSIDADE DE INIBIÇÃO	
	ÓLEO ESSENCIAL	ERV-IN
1. <i>Açafrão</i>	++++++	+++
2. <i>Alecrim</i>	--	--
3. <i>Orégano</i>	+++++	+
4. <i>Sálvia</i>	+++++	++

Legenda :

X = definição arbitrária da extensão do diâmetro da zona de inibição

Sem inibição (X = 0) = --

X < 14 = --

14 mm ≤ X < 20 mm = +

20 mm ≤ X < 26 mm = ++

26 mm ≤ X < 32mm = +++

X ≥ 30 mm = ++++

38 mm ≤ X < 50 mm = +++++

X ≥ 50 mm = ++++++

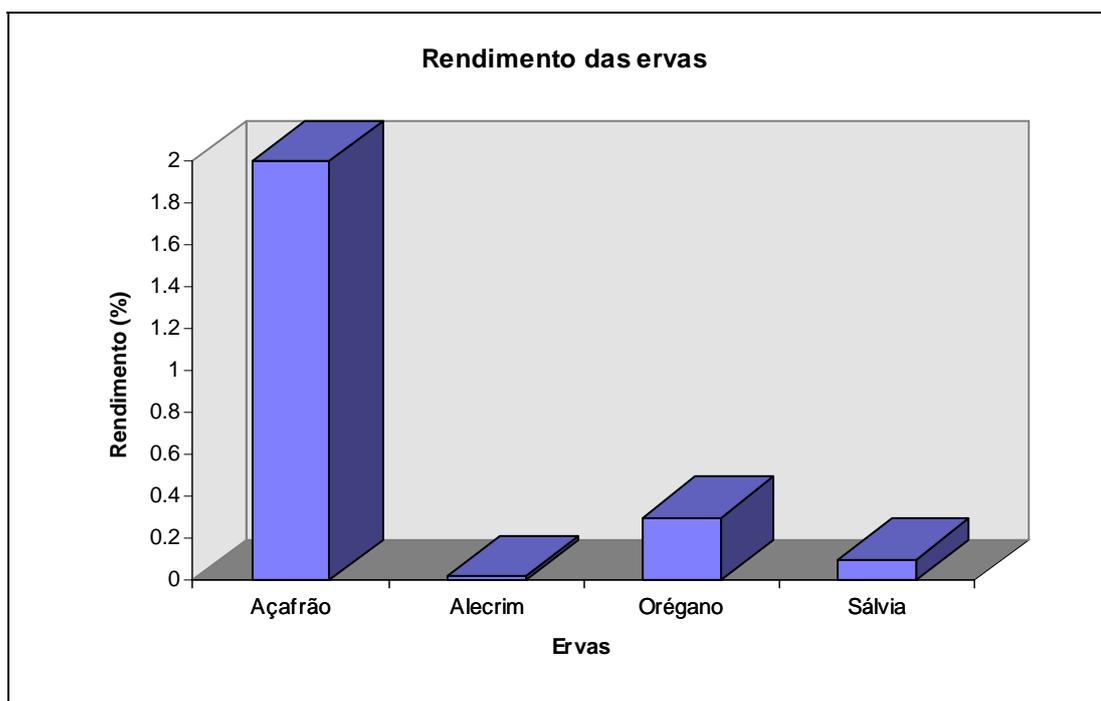


Figura 4.2. Rendimento de óleo essencial obtido pelo aparelho de Clevenger através da ERV-IN (100g m.f.)

### 4.3. Teste do Gradiente de Concentração em Placas em diferentes formas de ervas.

A atividade antimicrobiana de todas as formas de ervas (ervas processadas, ervas *in natura*, óleo resina e óleo essencial) contra *P. fluorescens* foi também avaliada pela técnica do gradiente de concentração em placa.

Através do processamento estatístico utilizando a metodologia ANOVA, verificou-se a significância e interação entre as médias. Realizou-se a análise de variância e teste de Tukey, pelo período de sete dias em duas temperaturas, de 30°C e 25°C em todas as ervas (processada, *in natura*, óleo resina e óleo essencial).

#### 4.3.1. Ervas processadas e Ervas *in natura*

O efeito inibidor representado pela média de cinco ensaios das medidas de crescimento realizadas no diâmetro das placas em uma concentração gradiente das ervas *in natura* e processada é apresentado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Efeito inibidor entre as médias <sup>(a)</sup> de ervas na forma *in natura* e na forma processada frente a *P. fluorescens* em um gradiente de concentração em placas sob monitoramento em duas temperaturas, de 30° C e 25° C.

ERV-IN 1% (P/V)			ERV-PRO 1% (P/V)		
ERVAS	T1 (30° C) (mm)	T2 (25°) (mm)	ERVAS	T1 (30° C) (mm)	T2 (25°) (mm)
<b>1. Açafreão</b>	18.8 a	9.20 a	<b>1. Açafreão</b>	26.50 b	26.00 c
<b>2. Alecrim</b>	90 d	78.76 c	<b>2. Alecrim</b>	10.01 a	9.77 a
<b>3. Alho porró</b>	90 d	90 d	<b>3. Alho porró</b>	90 d	90 d
<b>4. Orégano</b>	32.17 c	17.35 b	<b>4. Orégano</b>	29.40 b	17.10 b
<b>5. Salvia</b>	28.47 b	14.22 b	<b>5. Salvia</b>	36.70 c	18.93 b
			<b>6. Tomilho</b>	40.29 c	21.52 b

As médias seguidas com a mesma letra na vertical das ervas *in natura* e processadas, não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

(a) = média de cinco ensaios.

A medida de concentração mínima de inibição-MIC (%P/V) das ervas processadas e ervas *in natura* sobre *P. fluorescens* na temperatura de 30° C e 25° C durante o período de sete dias é mostrado nas Tabelas 4.5 e 4.6, respectivamente.

O efeito inibidor das ervas *in natura* e processada a concentração de 1% p/v sobre *P. fluorescens* em temperaturas de 30° C e 25° C no período de sete dias é mostrado nas Figuras: 4.3. ;4.4; 4.5 e 4.6.

Tabela 4.5. Medida da concentração mínima de inibição-MIC (% P/V) de ERV-IN sobre *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 na temperatura de 30°C e 25° C em um gradiente de concentração em placa .

ERV-IN	M I C <sup>(% P/V)</sup>			
	TEMPERATURA 30° C		TEMPERATURA 25° C	
	%P/V	sd	%P/V	sd
<b>1. Açafraão</b>	0.208	± 0.77	0.102	± 0.88
<b>2. Alecrim</b>	> 1	-	0.875	± 0.85
<b>3. Alho porró</b>	> 1	-	> 1	-
<b>4. Orégano</b>	0.357	± 0.87	0.192	± 0.66
<b>5. Sálvia</b>	0.316	± 0.97	0.159	± 0.69

% P/V concentração de 1%  
sd - desvio padrão

Tabela 4.6. Medida da concentração mínima de inibição-MIC (% P/V) de ERV-PRO sobre *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 na temperatura de 30° C e 25° C em um gradiente de concentração em placa .

ERV-PRO	M I C (% P/V)			
	TEMPERATURA 30° C		TEMPERATURA 25° C	
	%P/V	sd	%P/V	sd
<b>1. Açafão</b>	0.294	± 0.75	0.288	± 0.88
<b>2. Alecrim</b>	0.111	± 0.87	0.108	± 0.77
<b>3. Alho porró</b>	> 1	-	> 1	-
<b>4. Orégano</b>	0.326	± 0.57	0.190	± 0.67
<b>5. Sálvia</b>	0.407	± 0.78	0.210	± 0.85
<b>6. Tomilho</b>	0.447	± 0.97	0.239	± 0.66

% P/V concentração de 1%  
sd - desvio padrão

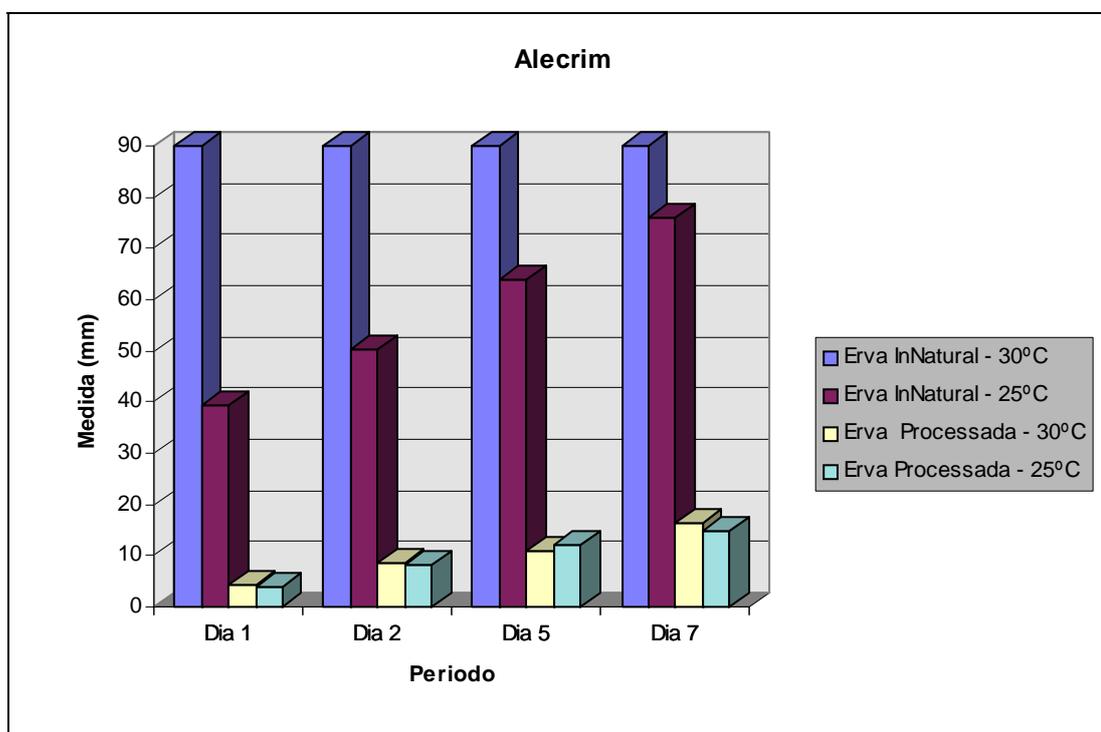


Figura 4.3. Efeito inibidor de ERV-PRO e ERV-IN (Alecrim) em duas temperaturas (30°C e 25°C) no período de 7 dias em um gradiente de concentração sobre *P. fluorescens*

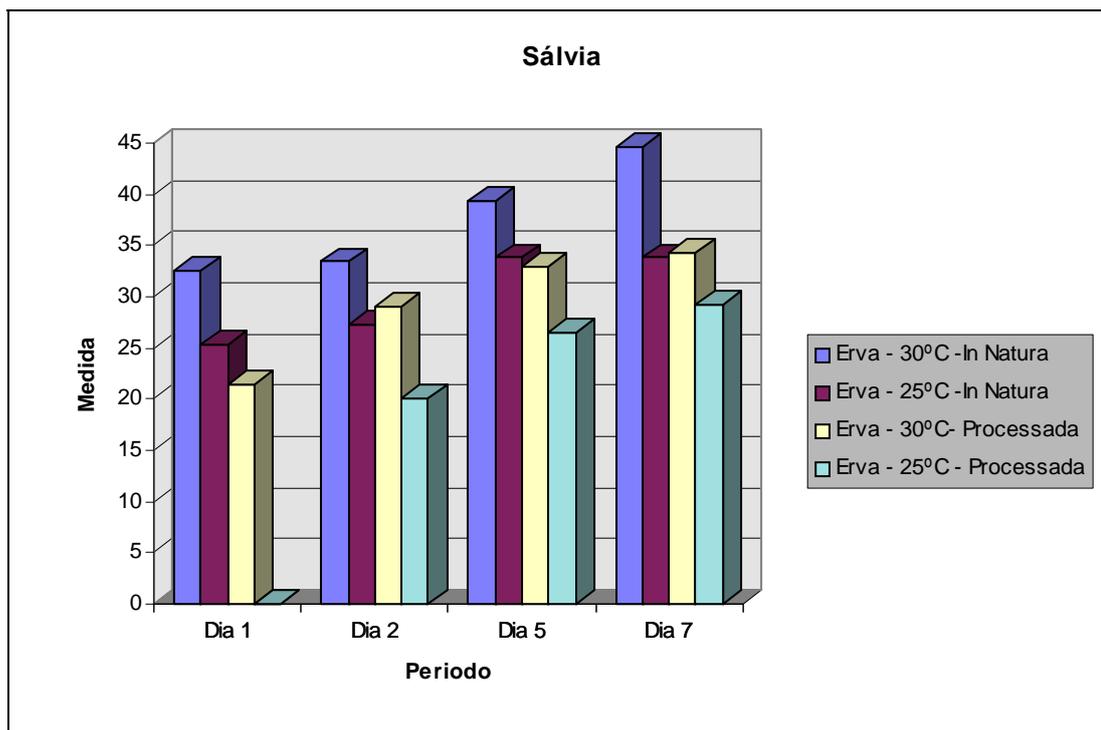


Figura 4.4. Efeito inibidor de ERV-PRO e ERV-IN (Sálvia) em duas temperaturas (30°C e 25°C) no período de 7 dias em um gradiente de concentração sobre *P. fluorescens*

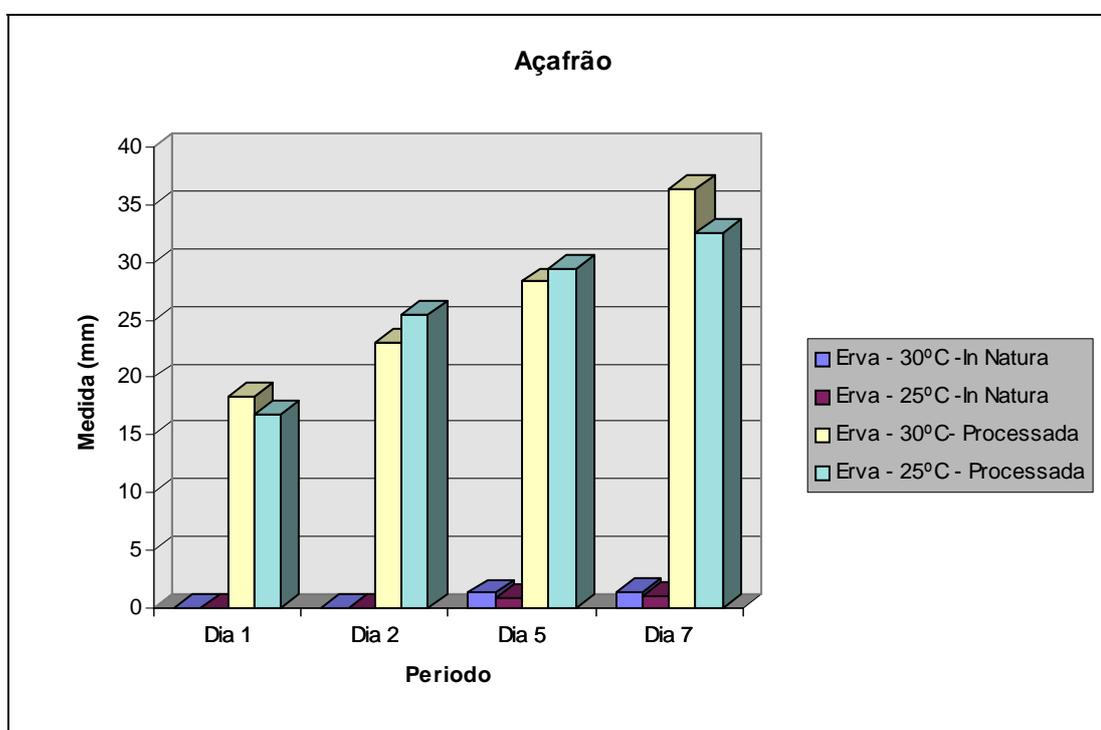


Figura 4.5. Efeito inibidor de ERV-PRO e ERV-IN (Açafrão) em duas temperaturas (30°C e 25°C) no período de 7 dias em um gradiente de concentração sobre *P. fluorescens*

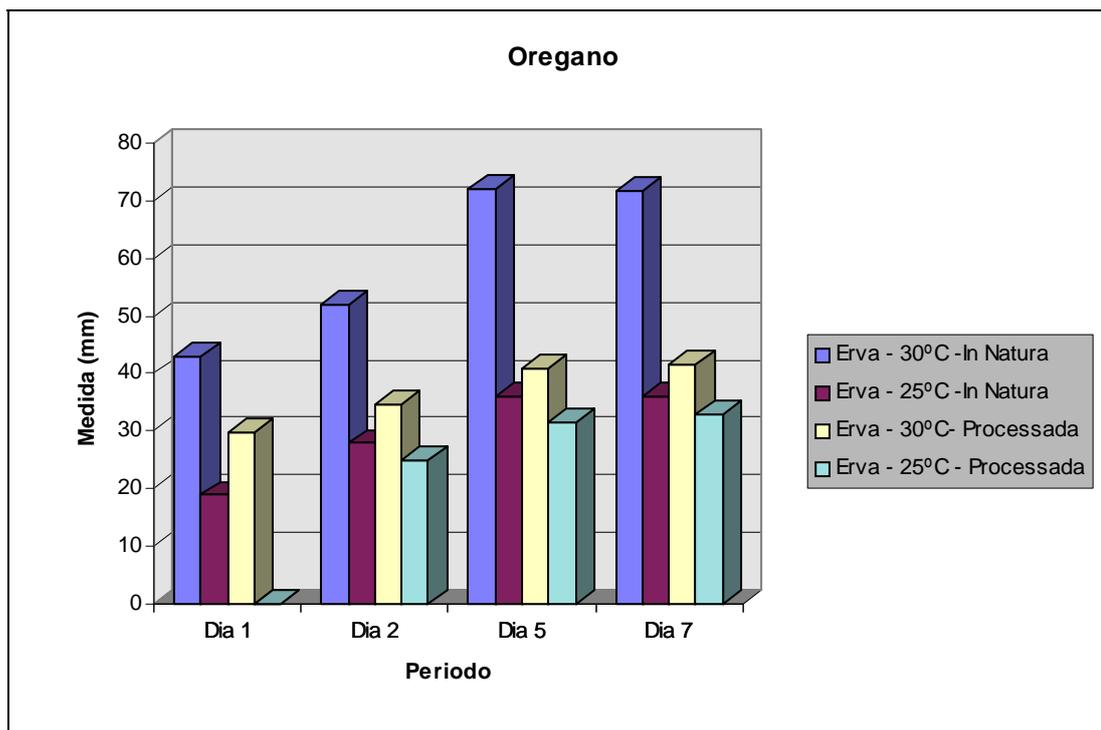


Figura 4.6 - Efeito inibidor de ERV-PRO e ERV-IN (Orégano) em duas temperaturas (30°C e 25°C) no período de 7 dias em um gradiente de concentração sobre *P. fluorescens*

### 4.3.2. Óleo Resina

O efeito inibidor representado pela média de cinco ensaios, das medidas de crescimento, realizada no diâmetro das placas em uma concentração gradiente das ervas processadas e óleo resina é apresentado na Tabela 4.7.

A medida de concentração mínima de inibição (MIC %P/V) de óleo resina sobre *P. fluorescens* na temperatura de 30° C e 25° C durante o período de sete dias é mostrado na Tabela 4.8.

Tabela 4.7. Efeito inibidor entre as médias <sup>(a)</sup> de ervas na forma processada e na forma de óleo resina frente a *P. fluorescens* em um gradiente de concentração em placas sob monitoramento em duas temperaturas, de 30° C e 25° C.

ERV-PRO 1 % (P/V)			ÓLEO RESINA 1% (P/V)		
ERVAS	T1 (30° C) (mm)	T2 (25°) (mm)	ERVAS	T1 (30° C) (mm)	T2 (25°) (mm)
<b>1. Açafrão</b>	26.50 b	26.00 c	<b>1. Açafrão</b>	42.19 c	41.66 c
<b>2. Alecrim</b>	10.01 a	9.77 a	<b>2. Alecrim</b>	22.36 a	22.00 b
<b>3. alho porró</b>	90 d	90 d	<b>3. alho porró</b>	90 d	90 d
<b>4. Orégano</b>	29.40 b	17.10 b	<b>4. Orégano</b>	27.00 b	13.00 a
<b>5. Salvia</b>	36.70 c	18.93 b	<b>5. Salvia</b>	29.24 b	12.60 a
<b>6. Tomilho</b>	40.29 c	21.52 b	<b>6. Tomilho</b>	27.76 b	13.40 a

As médias seguidas com a mesma letra na vertical das ervas processada e óleo resina proveniente de erva processada, não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

(a) = média de cinco ensaios.

O efeito inibidor das ervas processadas e de óleo resina a concentração de 1% p/v sobre *P. fluorescens* em temperaturas de 30° C e 25° C no período de sete dias é mostrados nas Figuras: 4.7.; 4.8; 4.9; 4.10 e 4.11.

Tabela 4.8. Medida da concentração mínima de inibição-MIC (% P/V) de Óleo Resina sobre *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 na temperatura de 30° C e 25° C em um gradiente de concentração em placa.

ÓLEO RESINA	M I C (% P/V)			
	TEMPERATURA 30° C		TEMPERATURA 25° C	
	%P/V	sd	%P/V	sd
<b>1. Açafrão</b>	0.468	± 0.59	0.0462	± 0.89
<b>2. Alecrim</b>	0.248	± 0.77	0.244	± 0.87
<b>3. Alho porró</b>	> 1	-	> 1	-
<b>4. Orégano</b>	0.300	± 0.87	0.144	± 0.57
<b>5. Sálvia</b>	0.324	± 0.97	0.140	± 0.48
<b>6. Tomilho</b>	0.308	± 0.57	0.149	± 0.96

% P/V concentração de 1%  
sd - desvio padrão

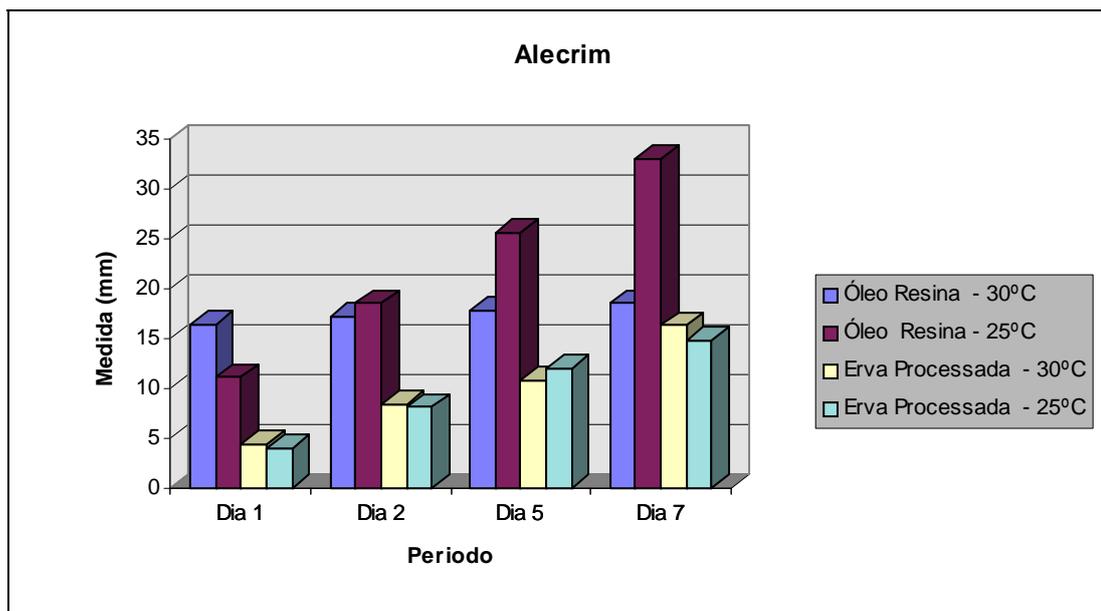


Figura 4.7. Efeito inibidor de ERV-PRO e óleo resina (Alecrim) em duas temperaturas (30°C e 25°C) no período de 7 dias em um gradiente de concentração sobre *P. fluorescens*

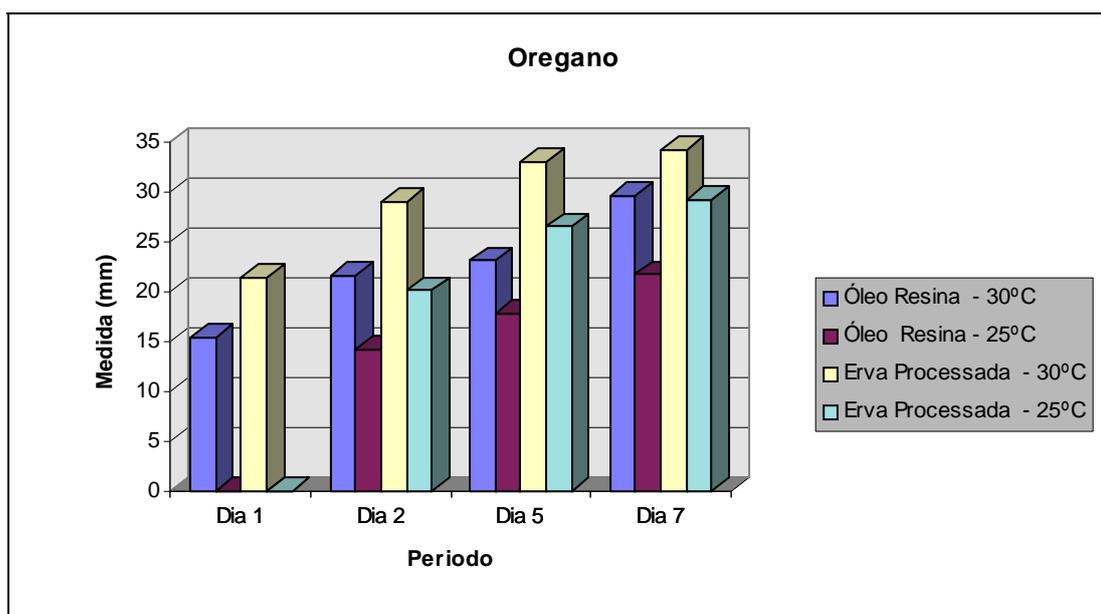


Figura 4.8. Efeito inibidor de ERV-PRO e óleo resina (Orégano) em duas temperaturas (30°C e 25°C) no período de 7 dias em um gradiente de concentração sobre *P. fluorescens*

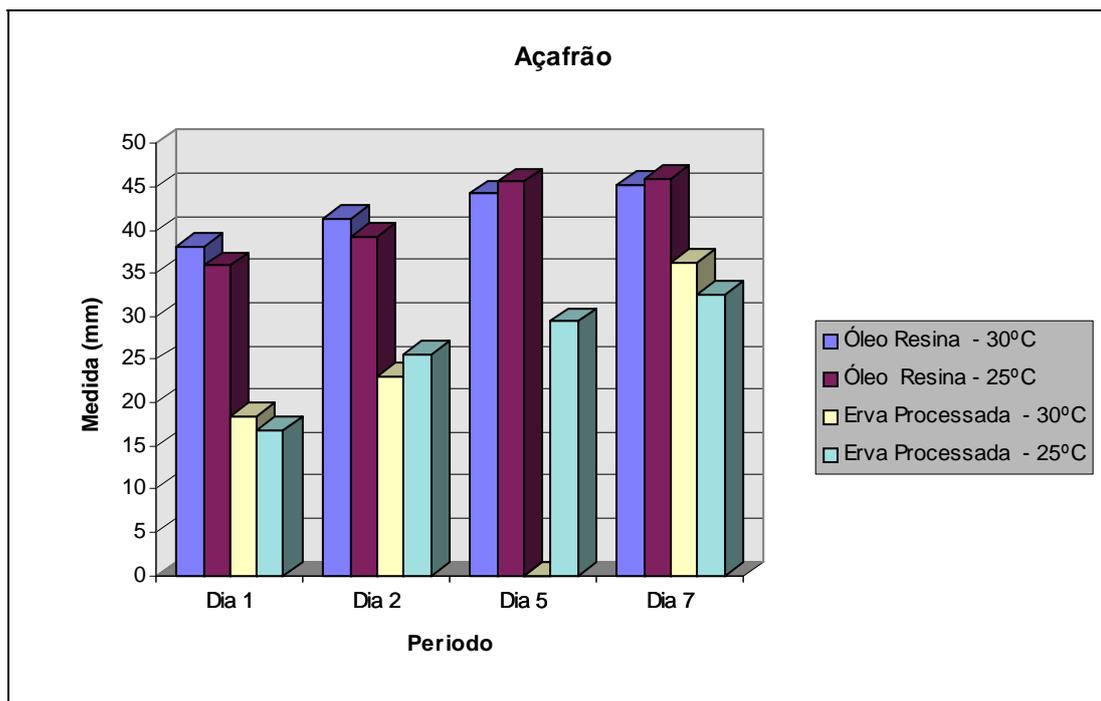


Figura 4.9. Efeito inibidor de ERV-PRO e óleo resina (Açafrão) em duas temperaturas (30°C e 25°C) no período de 7 dias em um gradiente de concentração sobre *P. fluorescens*

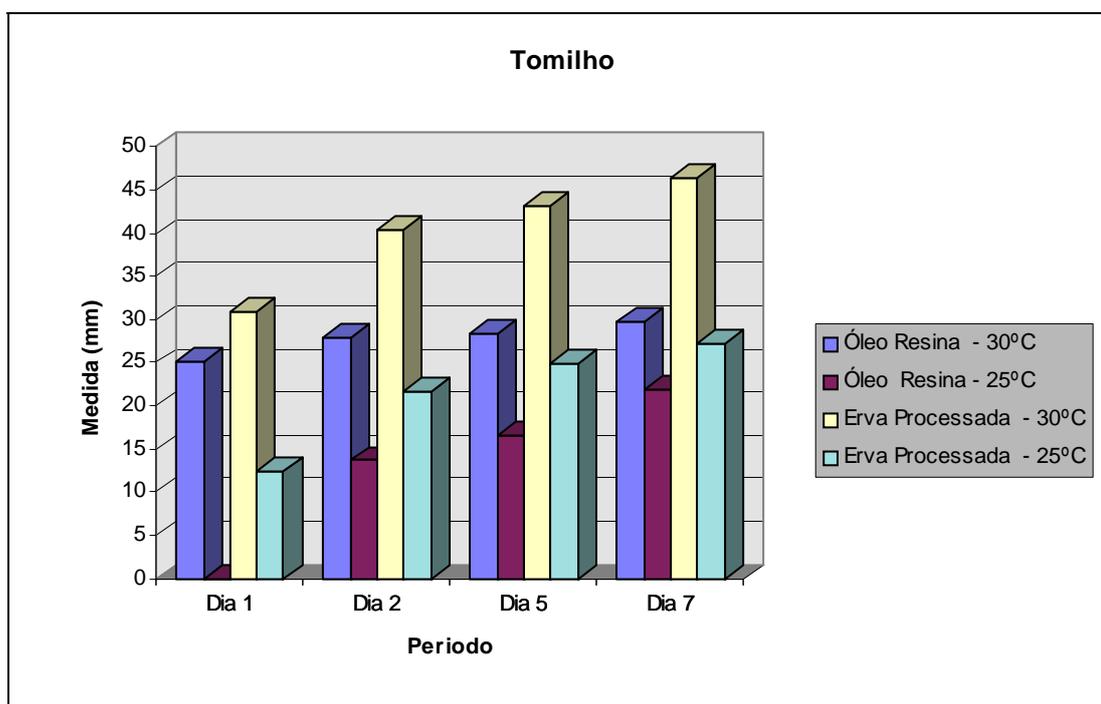


Figura 4.10. Efeito inibidor de ERV-PRO e óleo resina (Tomilho) em duas temperaturas (30°C e 25°C) no período de 7 dias em um gradiente de concentração sobre *P. fluorescens*

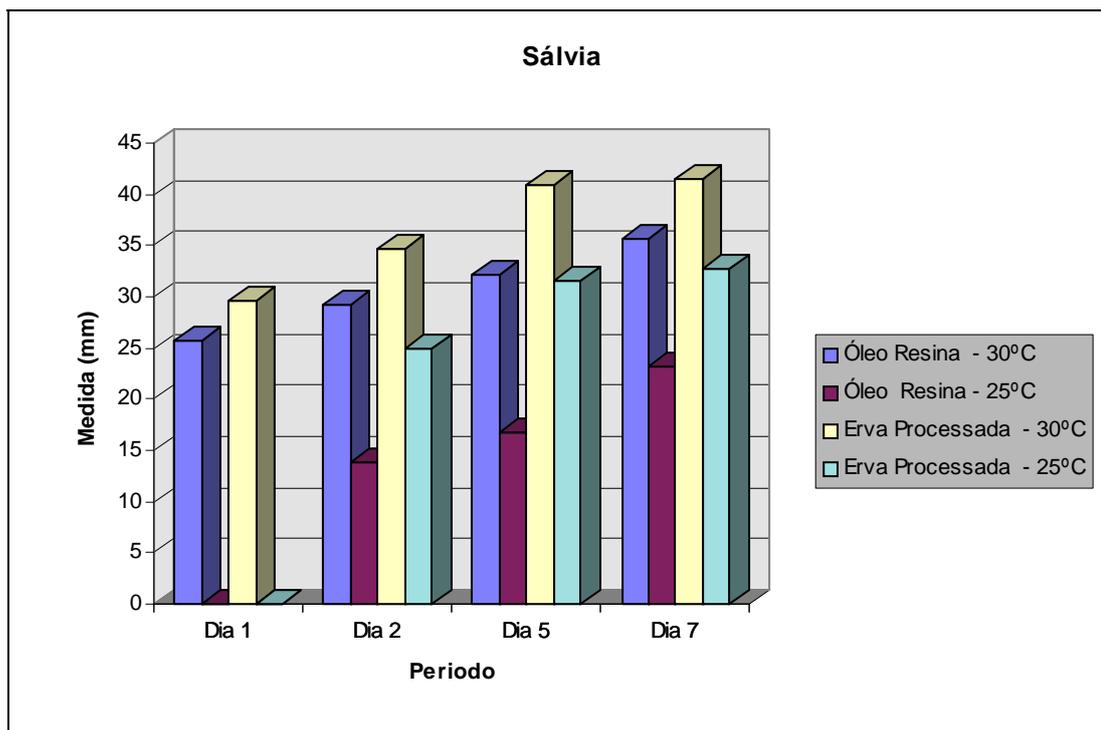


Figura 4.11. Efeito inibidor de ERV-PRO e óleo resina (Sálvia) em duas temperaturas (30°C e 25°C) no período de 7 dias em um gradiente de concentração sobre *P. fluorescens*

### 4.3.3. Óleo essencial

O efeito inibidor representado pela média de cinco ensaios das medidas de crescimento realizada no diâmetro das placas em uma concentração gradiente das ervas *in natura* e óleo essencial é apresentado na Tabela 4.9.

A medida de concentração mínima de inibição (MIC %P/V) do óleo essencial sobre *P. fluorescens* na temperatura de 30° C e 25° C durante o período de sete dias é mostrado na Tabela 4.10.

Tabela 4.9. Efeito inibidor entre as médias <sup>(a)</sup> de ervas na forma *in natura* e na forma de óleo essencial frente a *P. fluorescens* em um gradiente de concentração em placas sob monitoramento em duas temperaturas, de 30° C e 25° C.

ERV-IN 1% (P/V)			ÓLEO ESSENCIAL 0.2% (V/V)		
ERVAS	T1 (30° C) (mm)	T2 (25°) (mm)	ERVAS	T1 (30° C) (mm)	T2 (25°) (mm)
1. <i>Açafrão</i>	18.8 a	9.20 a	1. <i>Açafrão</i>	12.20 a	5.21 a
2. <i>Alecrim</i>	90 d	78.76 c	2. <i>Alecrim</i>	90 d	57.43 d
3. <i>Alho porró</i>	90 d	90 d	3. <i>Orégano</i>	59.2 c	23.76 b
4. <i>Orégano</i>	32.17 c	17.35 b	4. <i>Salvia</i>	40.15 b	30.05 c
5. <i>Salvia</i>	28.47 b	14.22 b			

As médias seguidas com a mesma letra na vertical das ervas *in natura* e óleo essencial proveniente de erva *in natura*, não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.  
(a) = média de cinco ensaios.

Tabela 4.10. Medida da concentração mínima de inibição-MIC (% P/V) de óleo essencial sobre *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 em um gradiente de concentração em placa .

ÓLEO ESSENCIAL	M I C (% P/V)			
	TEMPERATURA 30° C		TEMPERATURA 25° C	
	%P/V	sd	%P/V	sd
1. <i>Açafrão</i>	0.027	± 0.49	0.011	± 0.56
2. <i>Alecrim</i>	> 0.2	± 0.88	0.127	± 0.95
3. <i>Orégano</i>	0.131	± 0.87	0.052	± 0.59
4. <i>Sálvia</i>	0.089	± 0.66	0.066	± 0.97

% P/V concentração de 0,2 %  
sd - desvio padrão

O efeito inibidor das ervas *in natura* e óleo essencial à concentração de 1% p/v sobre *P. fluorescens* em temperaturas de 30° C e 25° C no período de sete dias é mostrado nas Figuras: 4.12.; 4.13.; 4.14. e 4.15.

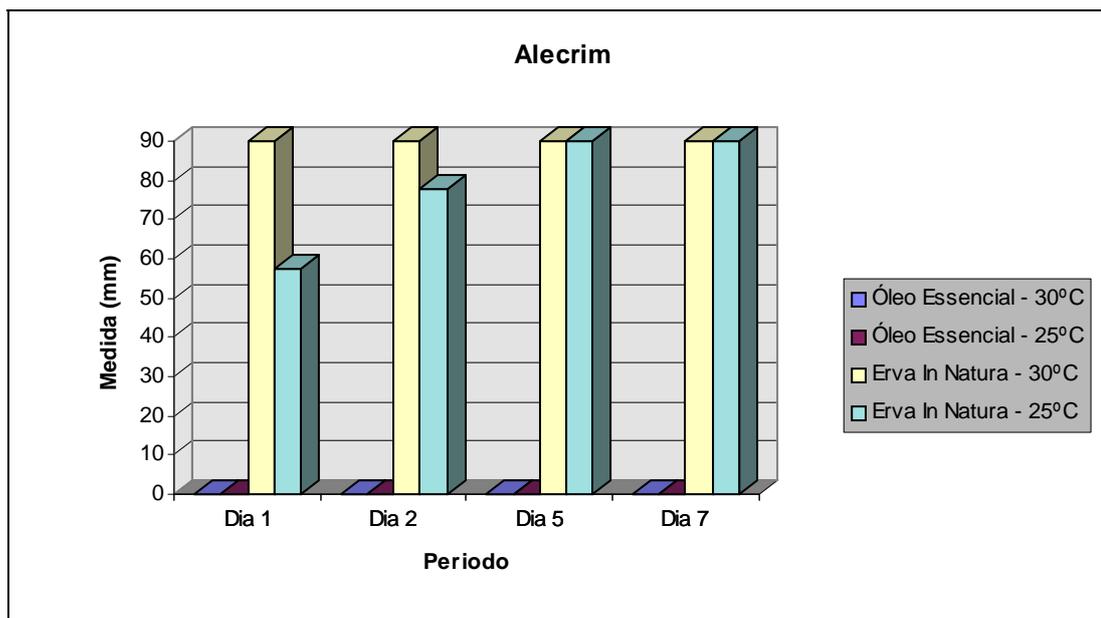


Figura 4.12. Efeito inibidor de ERV-IN e óleo essencial (Alecrim) a concentração de 1% em duas temperaturas (30° C e 25° C) no período de sete dias em um gradiente de concentração em placa sobre *P. fluorescens*.

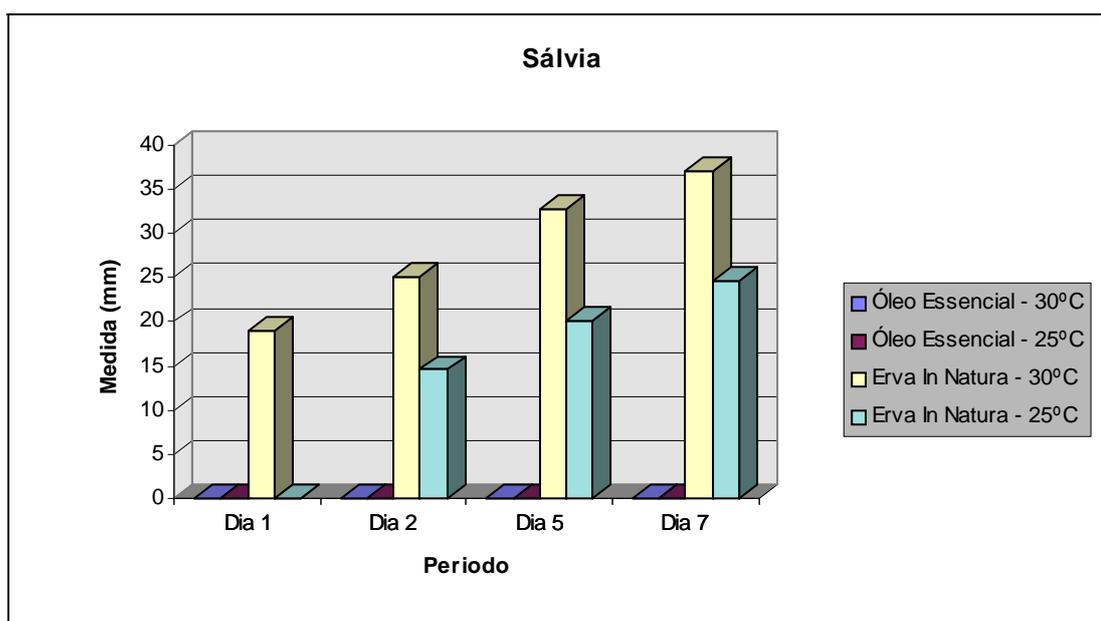


Figura 4.13. Efeito inibidor de ERV-IN e óleo essencial (Sálvia) a concentração de 1% em duas temperaturas (30° C e 25° C) no período de sete dias em um gradiente de concentração em placa sobre *P. fluorescens*.

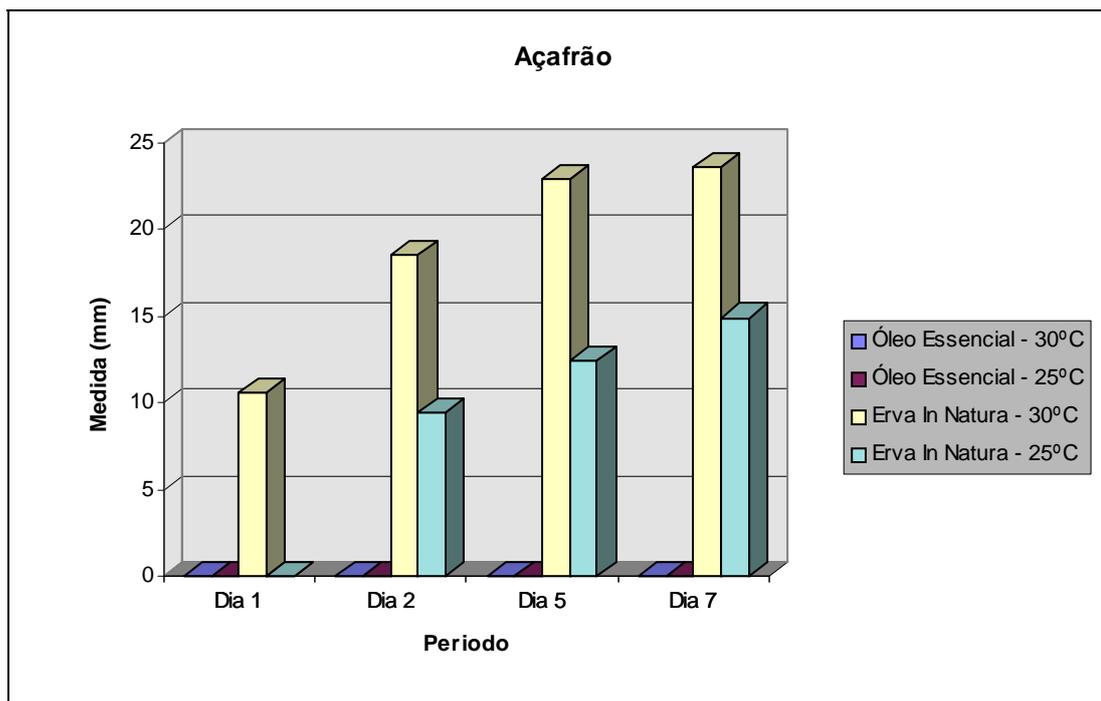


Figura 4.14. Efeito inibidor de ERV-IN e óleo essencial (Açafrão) a concentração de 1% em duas temperaturas (30° C e 25° C) no período de sete dias em um gradiente de concentração em placa sobre *P. fluorescens*.

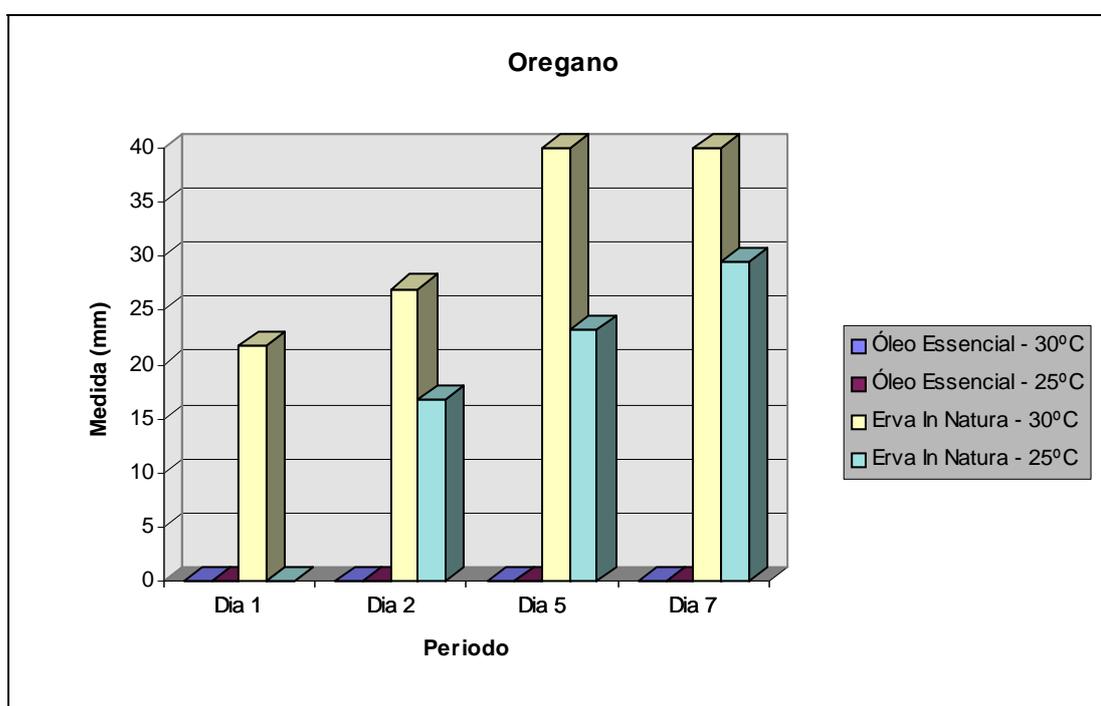


Figura 4.15. Efeito inibidor de ERV-IN e óleo essencial (Orégano) a concentração de 1% em duas temperaturas (30° C e 25° C) no período de sete dias em um gradiente de concentração em placa sobre *P. fluorescens*.

O efeito inibidor de óleo essencial à concentração de 0,2 % p/v sobre *P. fluorescens* em temperaturas de 30° C e 25° C no período de sete dias é mostrados nas Figuras: 4.16.; 4.17.; 4.18. e 4.19

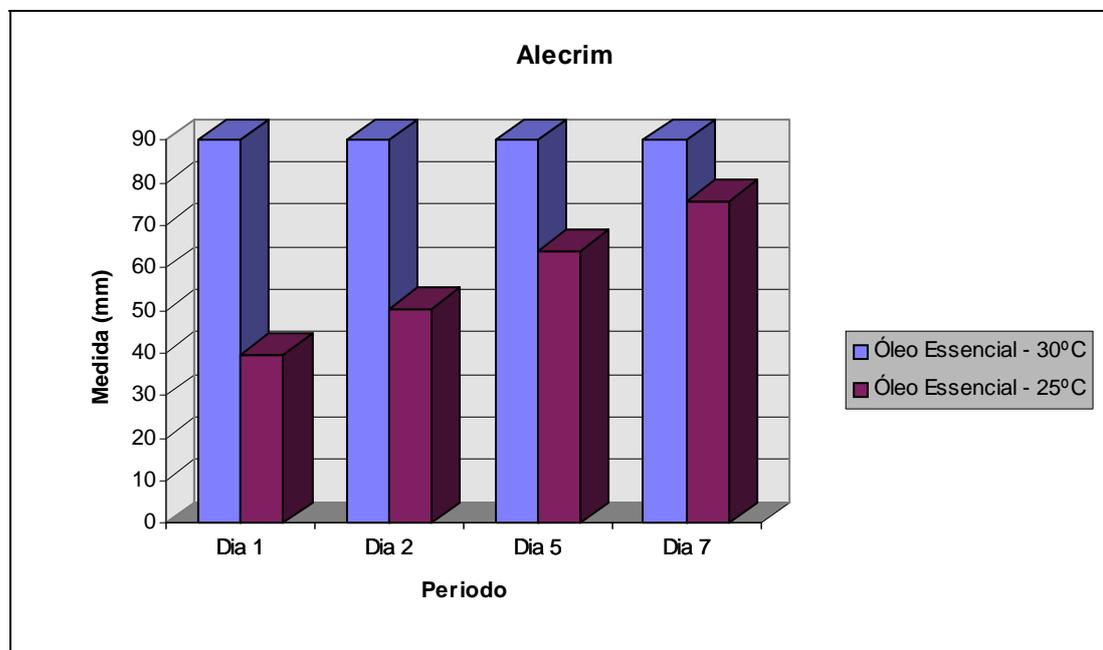


Figura 4.16. Efeito inibidor do óleo essencial (Alecrim) a concentração de 0,2% em duas temperaturas (30° C e 25° C) no período de sete dias em um gradiente de concentração em placa sobre *P. fluorescens*.

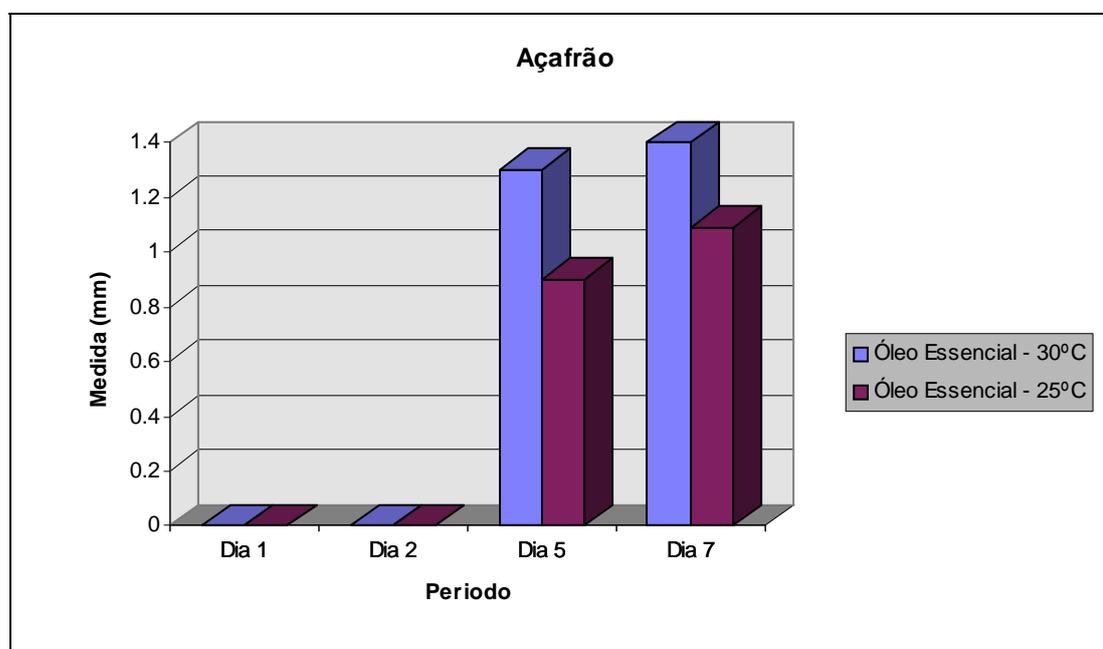


Figura 4.17. Efeito inibidor do óleo essencial (Açafrão) a concentração de 0,2% em duas temperaturas (30° C e 25° C) no período de sete dias em um gradiente de concentração em placa sobre *P. fluorescens*.

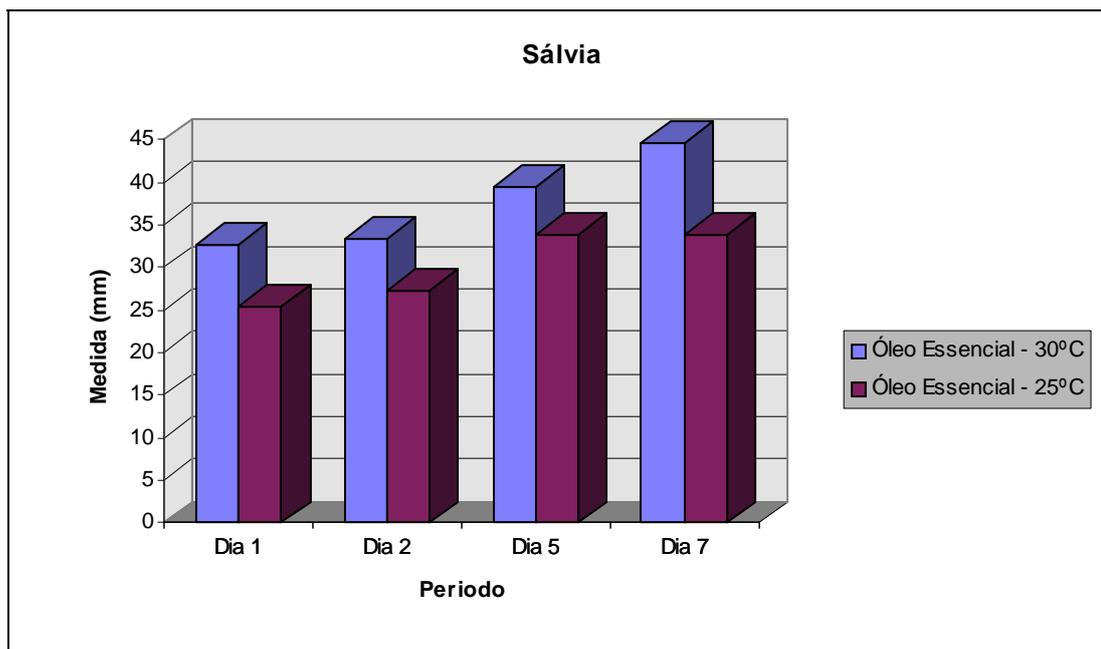


Figura 4.18. Efeito inibidor do óleo essencial (Sálvia) a concentração de 0,2% em duas temperaturas (30° C e 25° C) no período de sete dias em um gradiente de concentração em placa sobre *P. fluorescens*.

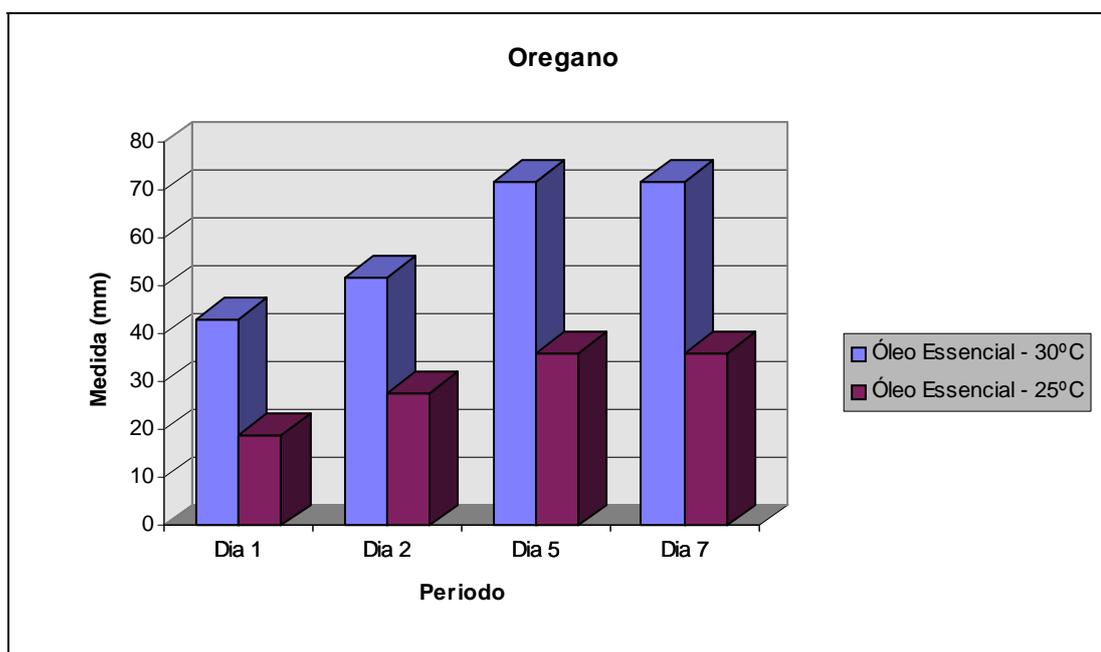


Figura 4.19. Efeito inibidor do óleo essencial (Orégano) a concentração de 0,2% em duas temperaturas (30° C e 25° C) no período de sete dias em um gradiente de concentração em placa sobre *P. fluorescens*.

#### 4.4. Teste de atividade antimicrobiana em meio caldo

Conforme descrito no item 3.2.8, *P. fluorescens* em caldo BHI foram submetidos ao tratamento com ervas processadas, *in natura*, óleo resina e óleo essencial à temperatura de 25° C e 4° C por até sete dias. Através de processamento estatístico com método Logia ANOVA, verificou-se a significância e interações. Realizou-se análise de variância durante o período de sete dias em duas temperaturas, de 25° C e 4° C, para todas as ervas (processada, *in natura*, óleo resina e óleo essencial).

##### 4.4.1. Ervas processadas e *in natura*

De acordo com a descrição realizada no item 3.2.8, calculou-se a porcentagem (%) da média da inibição de crescimento pelas ervas processadas e *in natura* durante o período de sete dias de incubação, na temperatura de 25° C e 4° C, sobre *P. fluorescens*. Os resultados estão exibidos nas Tabelas 4.11 e 4.12.

Tabela 4.11. Porcentagem (%) de inibição de ERV-PRO sobre o crescimento de *P. fluorescens* ATCC 13525.

ERV-PRO	(%) INIBIÇÃO			
	TEMPERATURA 25° C		TEMPERATURA 4° C	
	(%)	sd	(%)	sd
<b>1. Açafrão</b>	85.49	± 0.87	86.02	± 0.88
<b>2. Alecrim</b>	92.91	± 0.97	93.45	± 0.86
<b>3. Orégano</b>	58.04	± 0.77	71.10	± 0.95
<b>4. Sálvia</b>	71.18	± 0.88	86.21	± 0.67
<b>5. Tomilho</b>	71.76	± 0.57	70.74	± 0.76

sd - desvio padrão

Tabela 4.12. Porcentagem (%) de inibição de ERV-IN sobre o crescimento de *P. fluorescens* ATCC 13525.

ERV-IN	INIBIÇÃO			
	TEMPERATURA 25° C		TEMPERATURA 4° C	
	(%)	sd	(%)	sd
<b>1. Açafrão</b>	88.34	± 0.87	90.7	± 0.66
<b>2. Orégano</b>	71.66	± 0.77	83.38	± 0.74
<b>3. Sálvia</b>	78.92	± 0.97	94.37	± 0.55

sd - desvio padrão

#### 4.4.2. Óleo Resina

Segundo descrição no item 3.2.8, calculou-se a porcentagem (%) da média de inibição de crescimento pelo óleo resina proveniente de ERV-PRO, durante o período de sete dias de incubação na temperatura de 25° C e 4° C, sobre *P. fluorescens*. Os resultados estão exibidos na Tabela 4.13.

A Figura 4.20., mostra o efeito inibidor das ervas processadas e de óleo resina a concentração de 0,5% (p/v) sobre *P. fluorescens* na temperatura de 25° C e 4° C em um período de sete dias.

Tabela 4.13. Porcentagem (%) de inibição de óleo resina sobre o crescimento de *P. fluorescens* ATCC 13525.

ÓLEO RESINA	INIBIÇÃO			
	TEMPERATURA 25° C		TEMPERATURA 4° C	
	(%)	sd	(%)	sd
<b>1. Açafrão</b>	48.52	± 0.88	50.41	± 0.89
<b>2. Alecrim</b>	91.15	± 0.77	89.94	± 0.67
<b>3. Orégano</b>	68.47	± 0.75	77.92	± 0.54
<b>4. Sálvia</b>	84.94	± 0.87	88.17	± 0.58
<b>5. Tomilho</b>	81.47	± 0.64	82.78	± 0.68

sd - desvio padrão

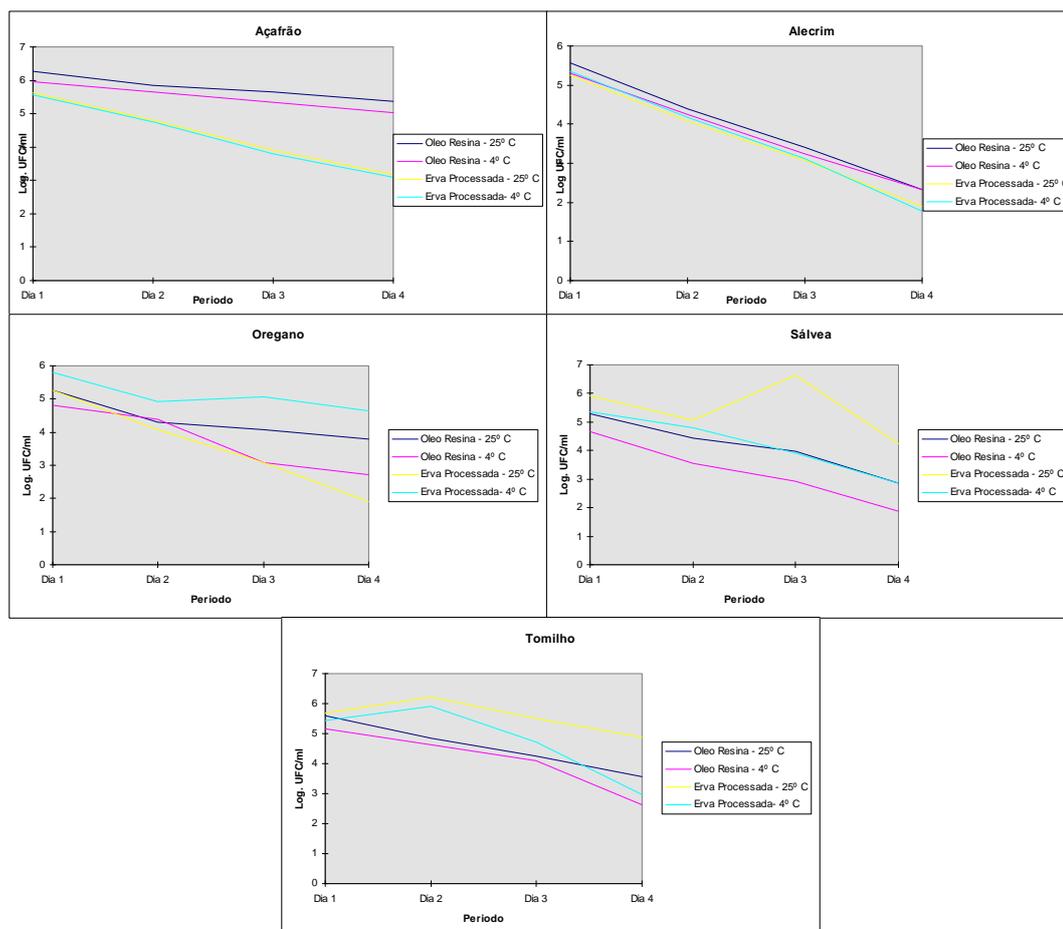


Figura 4.20. Efeito inibidor do óleo resina e ERV-PRO a uma concentração de 0,5% frente a *P. fluorescens* pela técnica de contagem de células em meio líquido (caldo) na temperatura de 25° e 4° monitorados por sete dias.

#### 4.4.3. Óleo essencial

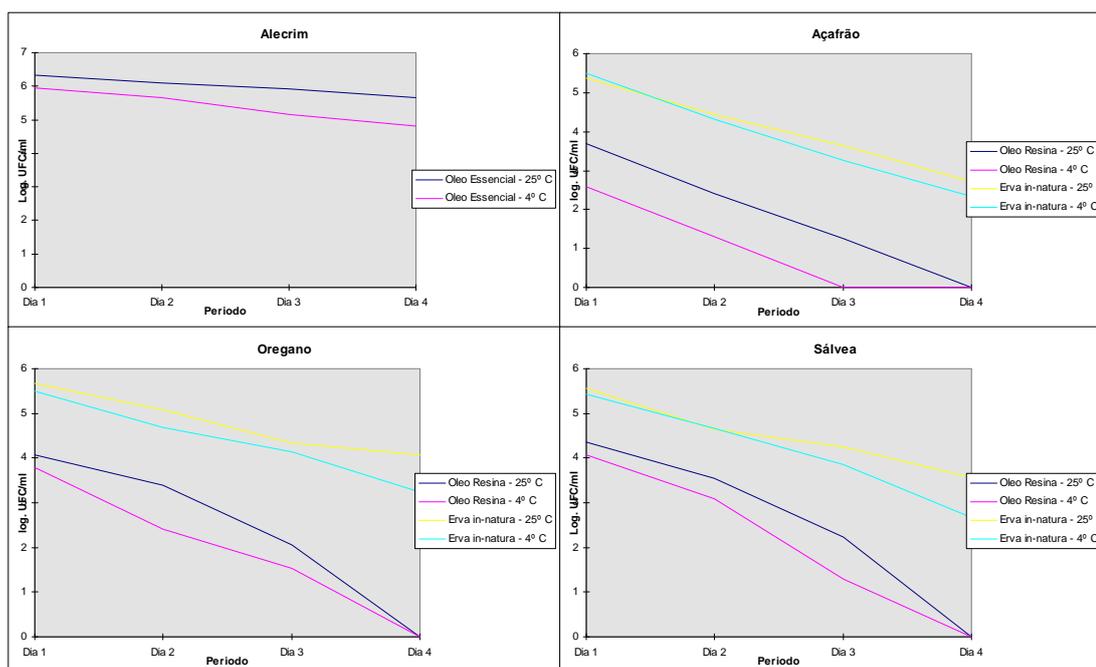
Segundo descrição no item 3.2.8, calculou-se a porcentagem (%) da média de inibição de crescimento pelo óleo essencial proveniente de ERV-IN no período de sete dias de incubação, na temperatura de 25° C e 4° C sobre *P. fluorescens*. Os resultados estão exibidos na Tabela 4.14.

A Figura 4.21., mostra o efeito inibidor das ervas na forma *in natura* e de óleo essencial à concentração de 0,5% (p/v) sobre *P. fluorescens* na temperatura de 25° C e 4° C em um período de sete dias.

**Tabela 4.14 - Porcentagem (%) de inibição de crescimento de *P. fluorescens* ATCC 13525 pelo óleo essencial de ERV-IN.**

ÓLEO ESSENCIAL	INIBIÇÃO (%)			
	TEMPERATURA 25° C		TEMPERATURA 4° C	
	(%)	sd	(%)	sd
<b>1. Açafrão</b>	95.53	± 0.57	97.35	± 0.87
<b>2. Alecrim</b>	38.40	± 0.77	61.20	± 0.67
<b>3. Orégano</b>	91.32	± 0.97	93.25	± 0.77
<b>4. Sálvia</b>	94.37	± 0.88	96.23	± 0.57

sd - desvio padrão



**Figura 4.21. Efeito inibidor do óleo essencial e ERV-IN frente a *P. fluorescens* pela técnica de contagem de células em meio líquido (caldo) na temperatura de 25° e 4° monitorados por sete dias.**

#### 4.5. Atividade antimicrobiana do óleo essencial em peito de frango picado.

A Figura 4.10 exibe a inibição de crescimento através do óleo essencial de açafraão, obtido de erva *in natura* em um período de sete dias de incubação, na temperatura de refrigeração a 4°C. Este teste foi simulado em condições de laboratório. Inoculou-se uma população padronizada à aproximadamente  $10^6$  UFC/ML de *P. fluorescens* no frango. A microbiota natural do frango foi considerada na avaliação.

Através de processamento estatístico com método Logia ANOVA, verificou-se a significância e interações no período de sete dias na temperatura de 4°C. Os resultados obtidos da ação do óleo essencial de açafraão, a concentração de 0,2% frente a microbiota natural do frango e *P. fluorescens* inoculada intencionalmente, e ainda em amostras controles sem óleo essencial e sem *P. fluorescens* inoculada, estão apresentados na Figura 4.22.

Comparou-se também o poder de inibição do óleo essencial de açafraão, a concentração de 0.2% em amostras de frango e amostras em meio líquido (caldo), em que intencionalmente *P. fluorescens* a uma população padronizada de aproximadamente  $10^6$  UFC/mL foi inoculada. Os resultados encontram-se na Figura 4.23.

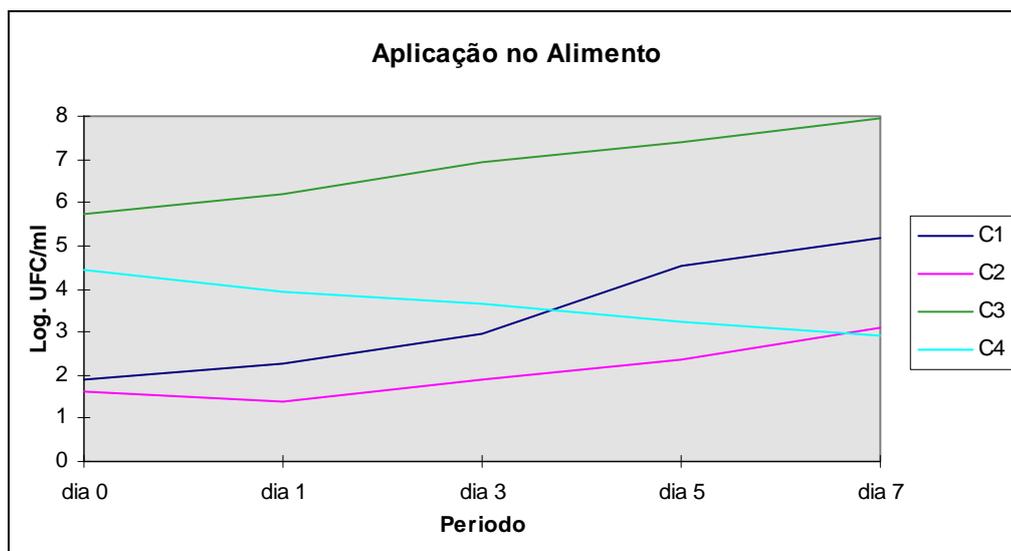


Figura 4.22. Ação do óleo essencial de açafão a concentração de 0,2% , frente a microbiota psicotrófica e *P. fluorescens* inoculada em peito de frango picado, a uma temperatura de 4 ° C, monitorado por sete dias

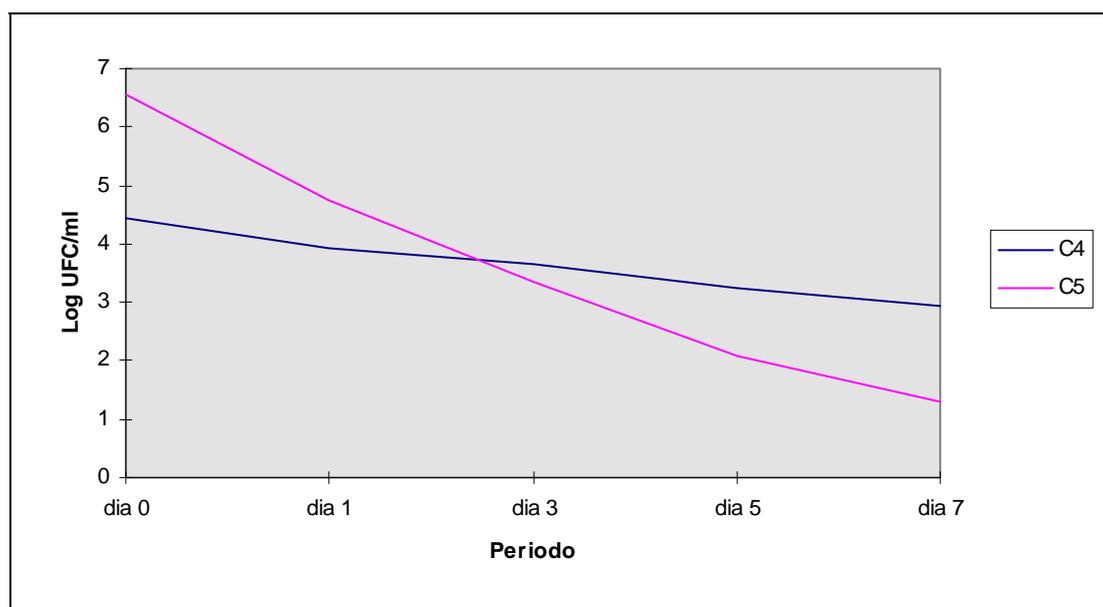


Figura 4.23. Ação do óleo essencial de Açafão a concentração de 0,2%, em carne de frango e meio líquido (caldo) a temperatura de 4° C, em relação à *P. fluorescens* inoculada, monitorado por sete dias

Legenda:

C1 = Amostra de frango sem adição de óleo essencial de açafão e sem inoculação de *P. fluorescens*.

C2 = Amostra de frango com adição de óleo essencial de açafão e sem inoculação de *P. fluorescens*.

C3 = Amostra de frango sem adição de óleo essencial de açafão e com inoculação de *P. fluorescens*.

C4 = Amostra de frango com adição de óleo essencial de açafão e com inoculação de *P. fluorescens*.

C5 = óleo essencial de açafão em meio líquido (caldo) com inoculação de *P. fluorescens*

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação do rendimento e atividade antimicrobiana de ervas através da técnica de difusão em placa.

Os óleos resina provenientes de ervas processadas de, alecrim, açafão, orégano, tomilho e sálvia foram caracterizados por uma zona de inibição consistente e altamente superior em relação ao alho porró, que exibiu pequena zona de inibição com crescimento de colônias resistentes e isoladas, Tabela 4.2. O alecrim apresentou maior intensidade de inibição em relação aos outros óleos resinas frente à *P. fluorescens*, exibindo uma zona de inibição transparente, acentuada, cujo disco adquiriu a coloração verde da erva, conforme se verifica na Figura 5.1.



Figura 5.1. Intensidade de inibição óleo resina de alecrim

O orégano, o tomilho e a sálvia ficaram equiparados em relação ao tamanho da zona de inibição, apresentando zonas transparentes e acentuadas, cujos discos também adquiriram a coloração verde da erva. Já o açafão, apresentou zonas de inibição caracterizadas por grumos de óleo, cor laranja forte, pela presença da curcumina, substância predominante do rizoma, porém o tamanho do halo foi menor do que as demais, como demonstra a Figura 5.2.

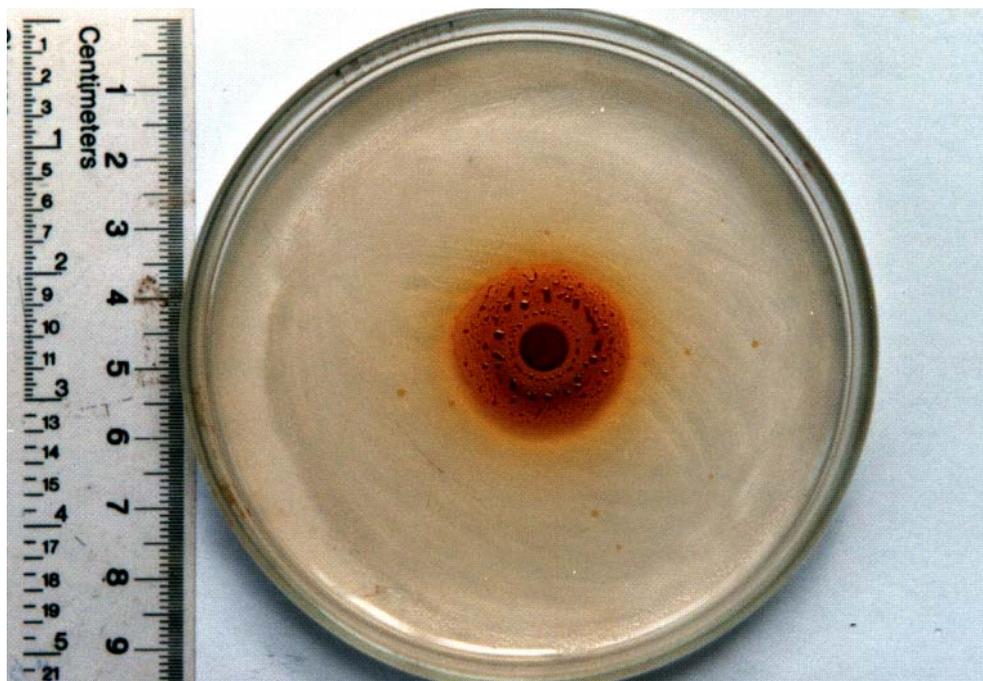


Figura 5.2. Intensidade de inibição do óleo resina do açafraão

O alho porró exibiu pouca atividade inibidora na concentração utilizada frente à *P. fluorescens* através desta técnica. A zona de inibição formada foi menor e não tão acentuada em relação aos outros óleos resinas e detectou-se a presença de crescimento de colônias resistentes e isoladas no interior do halo, próximas do disco, que possui maior concentração do extrato, e o disco também adquiriu a coloração verde da erva, conforme se verifica na Figura 5.3.



Figura 5.3. Intensidade de inibição óleo resina do alho porró

As ervas processadas (ERV-PRO), os resultados evidenciaram uma intensidade menor, porém prevalecendo a mesma ordem de predominância exibida pelo óleo resina, (Tabela 4.2). Então, o alecrim prevaleceu em primeiro, também com zonas significativas, porém com menos intensidade que o alecrim proveniente de óleo resina, mas, com a mesma intensidade que o açafreão proveniente de óleo resina, (Figura 5.4).



Figura 5.4. Intensidade de inibição do alecrim processado

O orégano, o tomilho e a sálvia, também mostrou inibição com zonas significativas e estiveram equiparados quanto ao seu tamanho, conforme demonstra. Entretanto, o açafreão exibiu pouca intensidade de inibição em relação às outras (Figura 5.5). O alho porró, por sua vez, demonstrou não possuir nenhuma atividade inibidora frente à *P. fluorescens* na concentração utilizada 1% P/V.



Figura 5.5. Intensidade de inibição do açafão processado

Todos os óleos essenciais que foram testados, provenientes das ervas *in natura*, exceto o de alecrim, mostraram inibição frente a *P. fluorescens* na concentração utilizada nesta avaliação preliminar, e foram caracterizados por uma zona de inibição transparente e significativa. (Tabela 4.3).

O açafão foi o que apresentou a maior intensidade de inibição em relação aos outros óleos testados, conforme é demonstrado na Figura 5.6. O orégano e a sálvia ficaram equiparados em relação ao tamanho da zona de inibição, mas também mostraram zonas transparentes e bem acentuadas.



Figura 5.6. Intensidade de inibição do óleo essencial de açafrão

Todavia, em relação à erva *in natura*, a intensidade de inibição do açafrão, alecrim, orégano e sálvia frente à *P. fluorescens* foi menor quando comparada com o óleo essencial das mesmas ervas, (Tabela 4.5). Entretanto, a zona de inibição do açafrão foi maior em relação às demais, seguido pela sálvia que mostrou a mesma intensidade de inibição em relação ao alecrim processado e do óleo resina de açafrão, conforme indica a Figura 5.7. Porém o óleo essencial de orégano que se mostrou equiparado a salvia *in natura* não exibiu a mesma intensidade que esta, mas mostrou a mesma intensidade de inibição exibida pelo açafrão, orégano, sálvia e tomilho processado (Figura 5.8). O alecrim, não demonstrou inibição frente à *P. fluorescens*, e não exibiu zona de inibição. Os resultados mostram que na concentração e técnica utilizada neste estudo, a erva *in natura* e óleo essencial do alecrim não apresentou efeito inibidor frente à bactéria estudada. Mas, verifica-se que a intensidade de inibição do óleo essencial comparado às ervas processadas e *in natura* que apresentaram efeito inibidor foi maior. Constata-se que o óleo essencial, óleo resina, erva *in natura* e processada de açafrão mostraram efeito inibidor frente a *P. fluorescens*.



Figura 5.7. Intensidade de inibição da sálvia *in natura*



Figura 5.8. Intensidade de inibição do orégano *in natura*

Na avaliação do rendimento, evidenciaram-se diferenças entre os óleos resina de ervas processada, obtidos pelo aparelho de Soxhlet, bem como entre os óleos essenciais de ervas *in natura*, obtidos pelo aparelho de Clevenger. Os resultados podem ser vistos nas Figuras 4.1 e 4.2, respectivamente. Entre os óleos resina, o tomilho teve o maior rendimento entre as ervas processadas com 34.89%; o alecrim

com 23,69%; a sálvia com 20,64%; o alho porró com 18,82%; o orégano com 17,66% e o açafão com 14,23%. Dos óleos essenciais, o açafão entre as ervas *in natura* teve maior rendimento apresentando 2%. O orégano com 0,3%, a sálvia com 0,1% e o alecrim com 0,02%.

## **5.2. Avaliação do efeito inibidor das formas de ervas pela técnica do gradiente de concentração em placa.**

Na avaliação do efeito inibidor frente à *P. fluorescens* realizada em duas temperaturas de incubação, 30°C e 25°C, pelo período de sete dias, através da técnica do gradiente de concentração em placas de Agar, das ervas (ERV-IN e ERV-PRO), evidenciou-se pelos resultados obtidos, variações no comportamento do efeito inibidor entre as ervas *in natura* e processada e entre as temperaturas de incubação. Conforme se verifica na Tabela 4.4, complementada com as Figuras 4.3.; 4.4.; 4.5. e 4.6.

A erva *in natura* de açafão a concentração de 1% (P/V), em média, exibiu maior inibição frente à *P. fluorescens* (Figura 5.9), em relação a sálvia e orégano, que também mostraram inibição. Evidenciou-se influência da temperatura no aumento do efeito inibidor das três ervas. Pelos resultados, constata-se que o efeito inibidor dessas ervas aumentou na temperatura de incubação a 25°C, comparado a temperatura de 30°C, na proporção de 51.06% para o açafão, 50% para a sálvia, 46.06% para o orégano e 12.48% para o alecrim, que não apresentou atividade inibidora na temperatura de 30°C, demonstrando ser mais bacteriostático. (Tabela 4.4 e Figuras 4.3; 4.4.; 4.5. e 4.6).

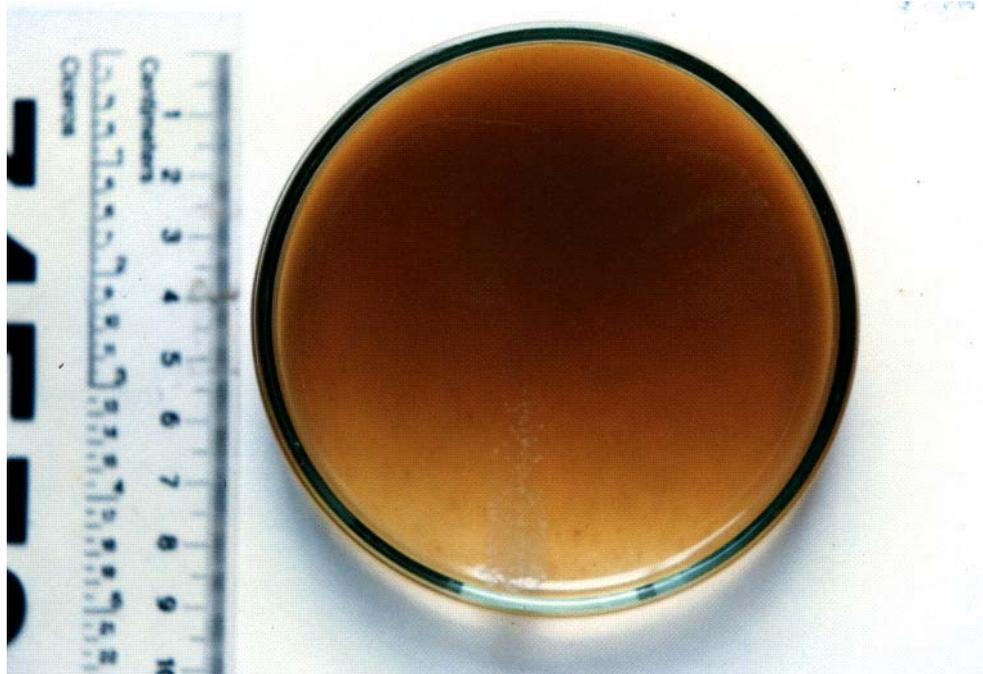


Figura 5.9. Efeito inibidor do açafão *in natura* a temperatura de 30°C em relação a *P. fluorescens*

Estes resultados também podem ser vistos na Tabela 4.5, através do comportamento do MIC nas duas temperaturas (25°C e 30°C), verificando-se que, em ordem decrescente de inibição, o açafão, a sálvia e o orégano, exibiram, na temperatura de 30°C, MIC de 0.208%, 0.316%, 0.357%, e na temperatura de 25°C, MIC de 0.102%, 0.158%, 0.192%, respectivamente. E o alecrim MIC de 0.875, somente na temperatura de 25°C. Apesar do alecrim não ter apresentado efeito inibidor à temperatura de 30°C, demonstrou efeito inibidor maior que as outras ervas a temperatura de 25°C.

Todavia, a erva processada, apesar dos resultados mostrarem que em média a maioria inibiram *P. fluorescens*, em ordem decrescente de inibição com alecrim > açafão > orégano > sálvia > tomilho, a mesma concentração (1% P/V) da erva *in natura*, evidenciou-se que o alecrim provocou maior inibição, seguido pelo açafão. Também se verificou que a temperatura de incubação não influenciou o aumento de inibição em ambas as ervas, então elas foram mais bactericidas que bacteriostáticas nas duas temperaturas testadas. Porém, o orégano, o tomilho e a sálvia tiveram influência da temperatura em relação ao efeito inibidor, que aumentou na temperatura de 25° C em relação à temperatura de 30° C, então elas foram mais bacteriostáticas, na proporção de 41.83% para o orégano, 46.58% para o tomilho e

48.58% para a sálvia (Tabela 4.4 e Figuras 4.4.; 4.5. e 4.6.). A Figura 5.10 mostra o efeito inibidor do orégano e a Figura 5.11. mostra o efeito inibidor do tomilho.

A Tabela 4.6 reforça estes resultados através da MIC nas duas temperaturas, verificando-se que o alecrim, o açafreão, o orégano, a sálvia e o tomilho, na temperatura de 30° C, apresentaram MIC de 0.111%, 0.294%, 0.326%, 0.407%, 0.447%, e, na temperatura de 25° C, MIC de 0.108%, 0.288%, 0.190%, 0.210%, 0.239%, respectivamente.

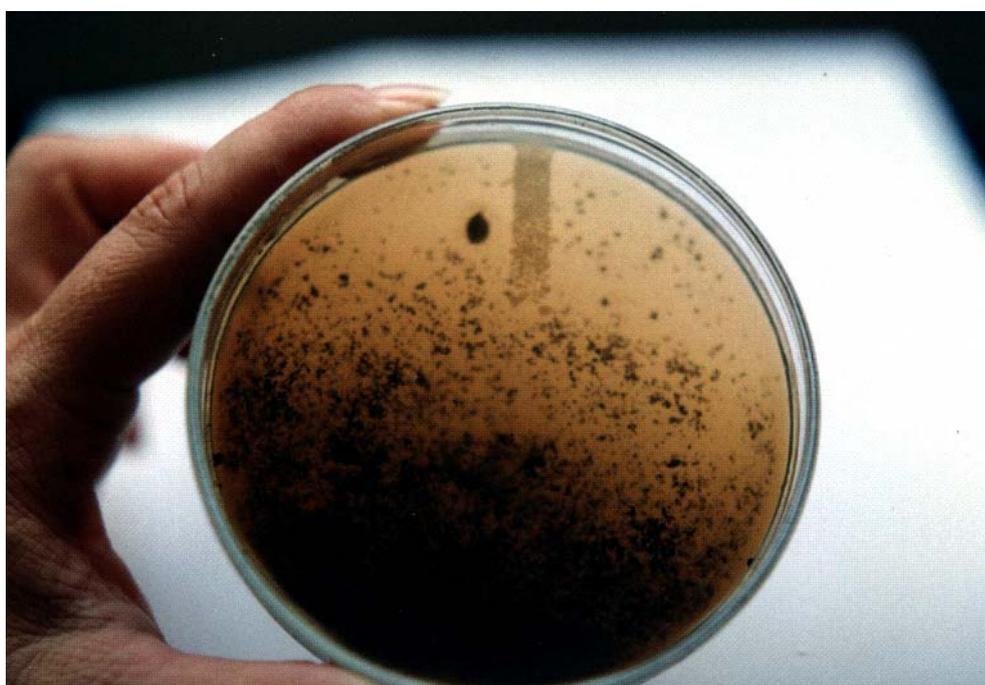


Figura 5.10. Efeito inibidor do orégano a temperatura de 30°C em relação a *P. fluorescens*

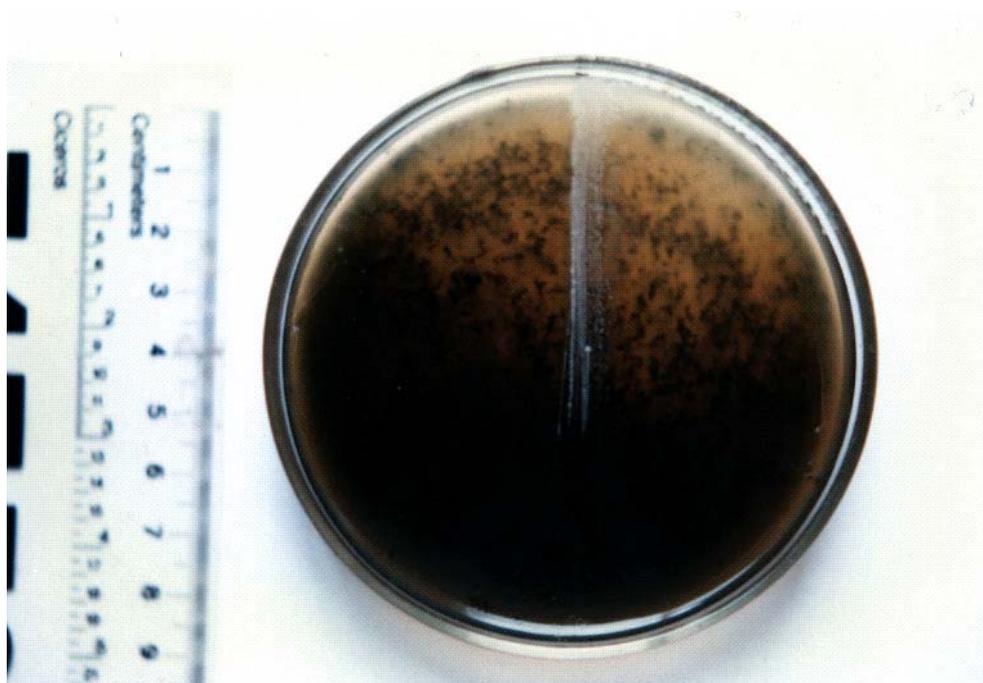


Figura 5.11. Efeito inibidor do tomilho a temperatura de 30°C em relação a *P. fluorescens*

Então, podemos dizer que a influência da temperatura sob o efeito inibidor, da sálvia > do tomilho > do orégano > do alecrim e do açafreão foi mínima, não considerada. O alho porró *in natura* e processado não demonstrou qualquer efeito inibidor após 24 horas de incubação nas duas temperaturas, 30°C e 25 C, tal como verificado na amostra controle. (Tabela 4.4).

Realizando uma comparação entre as ervas ERV-PRO e ERV-IN em termos de seus efeitos inibidores, percebe-se que ocorreu uma variação muito grande nos resultados, exibindo uma dependência marcante da temperatura, Tabela 4.4 e Figuras 4.3.; 4.4.; 4.5. e 4.6. O alecrim (PRO) apresentou resultados melhor que o alecrim (IN). O alecrim (PRO) foi bactericida nas duas temperaturas, e o alecrim (IN) foi mais bacteriostático pois, exibiu inibição somente a 25°C. O açafreão (PRO) e o açafreão (IN) tiveram o mesmo comportamento que o alecrim (PRO), ou seja, apresentaram inibição nas duas temperaturas, não sofreram influência das mesmas, mostrando ser bactericida. Todavia, o açafreão (IN) apresentou resultado semelhante ao alecrim (IN), teve influência da temperatura mostrando ser bacteriostático. O orégano (PRO) e a sálvia (PRO) tiveram o mesmo comportamento e mostrou efeito inibidor maior do que o orégano (IN) e a sálvia (IN), e ambos, tiveram influência da temperatura em proporções aproximadas.

Em estudos realizados por EVERTING & DEIBEL (1992), também se evidenciou o aumento do efeito inibidor pela temperatura de incubação de determinadas ervas, tal como o orégano e a sálvia processada na mesma concentração utilizada neste estudo. BAHK et al (1990), utilizando concentrações abaixo de 1% de ervas processadas, verificaram a mesma interferência da temperatura no aumento do efeito inibidor, afirmando que tais efeitos são estimulados devido aos componentes das mesmas serem afetados pela temperatura.

Essas variações ocorridas em nosso estudo são bem explicadas por FARREL, 1995; PRAKASH, 1995, pois, de acordo com esses autores, a composição e o conteúdo do óleo essencial varia de uma erva para a outra, inclusive dentro de uma mesma espécie, e dependem de muitos fatores, como práticas agrícolas, área geográfica e condições climáticas durante a época de crescimento. Do ponto de vista botânico, as ervas precedem de plantas que cresceram em solos e climas diferentes, e as partes utilizadas podem ser: talos, frutos, sementes, folhas, flores, raízes, rizoma, ou, uma mistura dessas partes. E do ponto de vista histológico e químico, bem detalhado no livro de PARRY (1969), as ervas são demasiadamente heterogêneas. A atividade antimicrobiana ocorre devido ao conteúdo em óleo essencial presente em células especiais ou glândulas dos seus tecidos e tais reservatórios pode achar-se em qualquer órgão da planta, desde a raiz até os frutos, dependendo às vezes só de um dos muitos componentes existentes no óleo essencial (FARREL, 1995; PRAKASH, 1995).

Na nossa pesquisa, as ervas processadas e *in natura* foram adquiridas no comércio local, do qual não sabemos a procedência e que, naturalmente precederam de solos, clima, práticas agrícolas diferentes, o que pode, além de outros fatores, justificar as variações ocorridas. Ervas processadas vendidas a granel dão um *pool* perfeito, ou seja, uma mistura de várias safras, de diferentes solos, climas e práticas agrícolas, além de uma mistura das diversas partes da erva. E outro fator relevante é o período que as mesmas ficaram confinadas, expostas à luz e constantes variações da temperatura ambiente. O efeito inibidor, bem como outros efeitos pode ter sido acentuado da degradação dos seus componentes quando expostos nas condições citadas acima.

De acordo com RIZZINI & MORS (1976), uma mesma planta, descoberta em 1939 no Estado de Santa Catarina, contendo óleo essencial de sassafrás brasileiro,

possuindo como constituinte principal o safrol, foi encontrada também em São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo, porém com o óleo essencial inteiramente destituído de safrol, contendo como componente principal o metil-eugenol, substância antimicrobiana, considerada tão eficaz quanto às do ftalato de dimetila. É um caso interessante de variação fisiológica ou química, sendo as duas morfológicamente e anatomicamente indistinguíveis, afirma RIZZINI & MORS (1976).

Da mesma maneira, na avaliação do efeito inibidor frente à *P. fluorescens*, realizada em duas temperaturas de incubação, 30° C e 25° C, pelo período de sete dias através da técnica do gradiente de concentração em placas de Agar, pelas ervas na forma de óleo resina provenientes das ervas na forma processada, tiveram variações entre a temperatura de incubação, tipo de erva e diferenças de inibição entre a erva sem extração e com extração do óleo resina (Tabela 4.7., complementada com as Figuras: 4.7.; 4.8.; 4.9.; 4.10. e 4.11.).

O óleo resina de alecrim, exibiu maior efeito inibidor em relação aos demais, porém, sem interferência da temperatura de incubação, resultados já evidenciados anteriormente na erva processada (sem extração). Em seguida, em ordem decrescente de inibição, aparece o orégano > o tomilho > a sálvia > açafirão na temperatura de 30° C. O orégano, o tomilho e a sálvia apresentaram efeito bacteriostático, ressaltando que a diferença entre eles foi pouca, já o açafirão não teve influência da temperatura em relação ao poder inibidor. Entretanto, na temperatura de 25° C, a sálvia, com muito pouca diferença, foi mais inibitória que o orégano e o tomilho, que não tiveram diferenças significativas entre si, e o açafirão continuou menos inibitório que os demais, mas sem sofrer influências da temperatura. O alecrim e o açafirão foram bactericidas nas duas temperaturas, resultados já encontrados na erva processada (Tabela 4.7 Figuras 4.7.; 4.8.; 4.9.; 4.10. e 4.11.).

Desse modo, de acordo com a influência da temperatura, a sálvia > o orégano > o tomilho na proporção de 54.17%, 53.33%, 53.17% e o alecrim e o açafirão em proporções insignificantes. A Tabela 4.8 confirma estes resultados, através da MIC nas duas temperaturas. Na temperatura de 30° C, o alecrim exibiu MIC de 0.248%, o açafirão MIC de 0.468%, o orégano MIC de 0.300%, o tomilho MIC de 0.308 e a sálvia MIC de 0.324%, já na temperatura de 25° C, as mesmas obtiveram MIC de 0.244%, 0.462%, 0.144%, 0.149%, 0.140%, respectivamente.

Porém, quando comparamos estes resultados com os resultados obtidos pelas ervas processadas, das quais os óleos resinas foram extraídos, observamos que em ordem decrescente de inibição, o efeito inibidor do tomilho, da sálvia, e do orégano, aumentou, e que, em relação ao alecrim e ao açafraão, esse efeito diminuiu (Tabela 4.7 e Figuras: 4.7.; 4.8.; 4.9.; 4.10. e 4.11.). Em relação ao aumento do efeito inibidor do orégano, do tomilho e da sálvia, justifica-se pela extração do princípio ativo contido em seus componentes.

E em relação ao alecrim e ao açafraão, que exibiram menos poder inibidor quando comparados a sua forma processada sem extração, atribuímos a duas possibilidades: a primeira, poderia ser ao solvente utilizado, que foi o etanol, e que possivelmente pode ter favorecido a extração de substâncias inibidoras contidas no tomilho, sálvia e orégano do que no alecrim e açafraão. Ou seja, os componentes inibitórios do alecrim e do açafraão podem não ter sido tão solúveis ao solvente utilizado.

A segunda possibilidade seria uma reação química entre os componentes do açafraão e do alecrim com os componentes do meio de cultura utilizado em fase aquosa em alta temperatura. Ressalta-se que, na metodologia empregada, tanto o alecrim como o açafraão, bem como as demais ervas junto ao meio de cultura e água destilada sofreram processo de esterilização em autoclave com a finalidade de prevenir contaminação. Todavia, esta interação pode não ter ocorrido com o orégano, o tomilho e a sálvia, que também sofreram o mesmo processo de esterilização em autoclave. Entretanto, a possibilidade dessa interação só ter ocorrido com componentes específicos do alecrim e do açafraão não presentes nas demais ervas não pode ser descartada.

Os resultados reportados por ABDU & ABDU-ZEID (1972) confirmam a primeira possibilidade atribuída ao solvente utilizado. Os autores (op. cit) realizaram o estudo extraído o princípio ativo de várias espécies de ervas com vários solventes, entre eles o etanol. Evidenciaram que, o etanol foi eficaz para algumas ervas mas não o foi para outras, quando se aplicaram testes para inibir diferentes microrganismos. Entretanto, nos estudos realizados por HUHTANEM, C.N. (1980), que utilizou o etanol para obtenção do extrato de 33 ervas, testando-as frente à inibição de *Clostridium botulinum*, comprovou que a maioria dos extratos usados foi eficaz na inibição.

Estes resultados demonstram que há possibilidades de ter ocorrido o mesmo em relação ao alecrim, açafraão, sálvia, tomilho e orégano, ervas utilizadas neste estudo para inibir *P. fluorescens*.

Nos resultados obtidos por TORRES et al (1986) verifica-se que o extrato proveniente da esterilização conjunta do alecrim e o meio de cultura em autoclave mostraram-se mais efetivo na inibição do que o óleo resina de alecrim. Os autores concluíram que esse efeito bactericida pode ter ocorrido pela interação entre os componentes do meio de cultura utilizados e os componentes do alecrim. Esses resultados nos remetem a possibilidade de ter acontecido algo semelhante nesta pesquisa.

Porém, é interessante mencionar que os pesquisadores (op. cit) utilizaram o etanol como solvente no processo de extração do óleo resina de alecrim. Em nossos estudos, na avaliação preliminar pela técnica de difusão em Agar, as ervas processadas, que foram esterilizadas em autoclave apenas com água destilada, tiveram menor intensidade de inibição do que o óleo resina, demonstrando a possibilidade de que a interação pode não ter ocorrido em nossa pesquisa.

Contudo, é também válido considerar as limitações que existem quando se compara uma técnica com a outra quando o assunto é avaliar ervas, pois, de acordo com pesquisas realizadas, das quais podemos citar a realizada por MORRIS & SEITZ (1979), que ao avaliarem diferentes tipos de ervas, compararam a técnica de difusão (medida do halo) com a técnica em caldo (contagem de células) e verificaram resultados diferentes. Os autores afirmam que a técnica do disco de papel não reflete a relativa atividade antimicrobiana desses materiais, pois o tamanho da zona de inibição no método da difusão depende da solubilidade e da maneira de difundir da amostra no meio aquoso. Alguns materiais podem não apresentar zonas de inibição claras e bem definidas, mas mostrar óbvia redução de crescimento em outro método.

Estas afirmações também foram reportadas por NARASIMHA et al (1972, 1976), nas quais evidenciaram que a medida da zona de inibição não mostra uma medida direta da atividade antimicrobiana desses materiais, pois depende da habilidade de difusão no meio.

Essa interação ocorrida no processo de esterilização em autoclave também foi reportada por FARBOARD et al (1976), que ao utilizarem o extrato de alecrim para inibir *Salmonella* e *S. aureus*, constataram que o efeito inibidor do óleo resina

de alecrim foi maior quando esterilizado junto ao meio de cultura em autoclave. Os autores também atribuíram o aumento do efeito a uma reação química entre o extrato e os constituintes do meio de cultura, resultando na extração dos componentes bactericidas do extrato de alecrim na fase aquosa.

Em nossos estudos, tanto o óleo resina do alecrim, como de açafão, orégano, tomilho e sálvia, exibiram efeito inibidor em diferentes temperaturas. E eles foram adicionados ao meio de cultura após o processo de esterilização em autoclave a uma temperatura de aproximadamente 45°C.

Também, da mesma forma realizada anteriormente, com as *ervas in natura*, processada e óleo resina (op. cit.), avaliou-se neste estudo a potencialidade inibidora a concentração de 1% e 0,2% os óleos essenciais de alecrim, açafão, orégano e sálvia, obtidos de *ervas in natura*. Evidenciaram-se, nos resultados obtidos, as mesmas variações na temperatura de incubação observadas nos experimentos anteriores. Os resultados encontram-se na Tabela 4.9, complementada pelas Figuras: 4.12.; 4.13.; 4.14., e 4.15; 4.16; 4.17.; 4.18. e 4.19.

Nesta avaliação, se verificou que o óleo essencial de açafão a concentração de 0,2% (V/V) foi suficiente para inibir uma população padronizada de aproximadamente  $10^6$  UFC/mL de *P. fluorescens* e que comparado aos outros óleos essenciais foi o mais inibitório. O óleo essencial de açafão também se mostrou dependente da temperatura de incubação. Sua potencialidade acentuou quando ocorreu mudança da temperatura de 30° C para de 25° C (Tabela 4.9 e Figura 4.12.; 4.17.). Esse resultado pode ser visto também na Figura 5.12 e Figura 5.13.

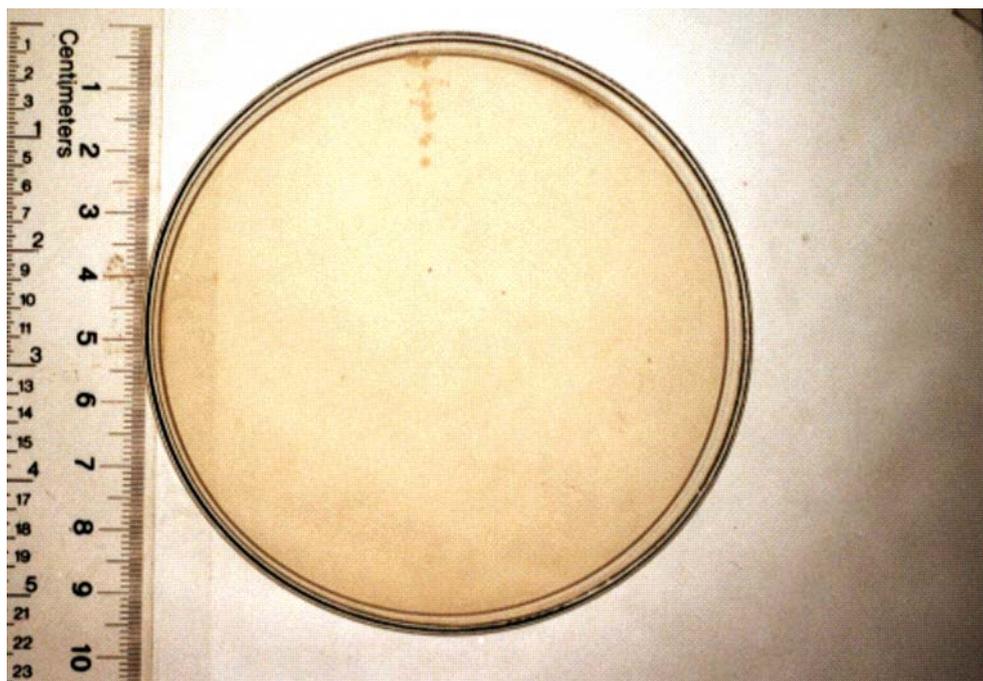


Figura 5.12. Efeito inibidor do óleo essencial de açafão a temperatura de 25°C em relação a *P. fluorescens*

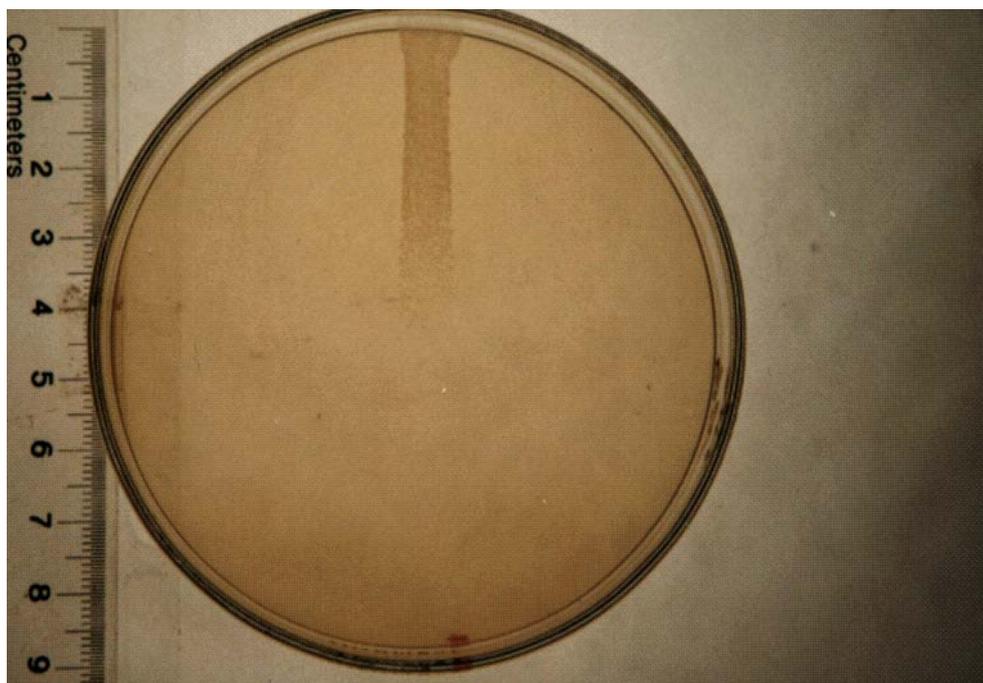


Figura 5.13. Efeito inibidor do óleo essencial de açafão a temperatura de 30°C em relação a *P. fluorescens*

Na temperatura de 30° C, o óleo essencial de sálvia foi o segundo mais inibidor, seguido pelo orégano, porém, o alecrim não inibiu *P. fluorescens* nessa população e concentração utilizadas. Todavia, quando expostos na temperatura de 25° C, o orégano foi melhor inibidor que a sálvia e o alecrim, também demonstrou inibição. A

influência da temperatura sob o efeito inibidor do açafirão, sálvia, orégano e alecrim foi de 57.29%, 25.15%, 59.86% e 32.57%, que também podem ser vistos pela determinação da MIC na Tabela 4.10. Na temperatura de 30° C, o açafirão exibiu MIC de 0.027%, a sálvia MIC de 0.089%, o orégano MIC de 0.131%. Já na temperatura de 25° C, exibiram MIC de 0.011%, 0.066, 0.052%, respectivamente, e o alecrim, apenas nesta temperatura, exibiu MIC de 0.127%.

Entretanto, quando comparamos estes resultados com os resultados obtidos na forma *in natura*, do qual os óleos essenciais provieram, observamos que não revelaram o mesmo perfil de comportamento como evidenciado pelas ervas processadas quando comparadas com os óleos resinas. Sendo assim, verificamos que o açafirão predominou às demais, a sálvia foi mais inibitória que o orégano e o alecrim não exibiu inibição frente a *P. fluorescens* na temperatura de 30°C. Contudo, já na temperatura de 25° C, o alecrim exibiu pequena inibição, a sálvia ficou em segundo lugar, seguida pelo orégano, que ficou em terceiro lugar, e o açafirão manteve a preferência em primeiro.

Sem exceção, todas exibiram dependência da temperatura em relação ao aumento do poder inibidor, principalmente o alecrim, que foi exclusivamente bacteriostático, tanto a erva *in natura* como o óleo essencial. Observamos, também, que os óleos essenciais de açafirão e orégano aumentaram o poder inibidor na mesma proporcionalidade na mudança de temperatura do que a erva *in natura*. Já a sálvia teve uma redução de aproximadamente 25%, e o alecrim, por sua vez, teve um aumento de 20% em relação ao aumento do poder inibidor verificado na erva *in natura*.

Então, evidenciamos a potencialidade inibidora do óleo essencial aumentou em relação à erva *in natura*, e que o óleo essencial também sofreu influência da temperatura de incubação, resultado já obtido por WEBB & TANNER (1945), os quais afirmaram que os óleos essenciais de ervas, em razão da maior concentração de princípio ativo, são mais diretos na ação preservativa do que as ervas na sua forma natural ou processada.

### **5.3. Avaliação da atividade inibidora através de contagem de células bacteriana em meio caldo**

Após a avaliação da atividade inibitória frente à *P. fluorescens*, através da medida do crescimento com o cálculo da MIC, selecionou-se as ervas (processada, *in natura*, óleo resina e óleo essencial), que obtiveram MIC de até 0.5%, pois o MIC delas ficou próximo de 0.5%. A partir da seleção, realizou-se avaliação da atividade inibidora em meio de cultura caldo com contagem de células bacterianas durante o período de sete dias em duas temperaturas de incubação, a 25° C e 4° C, e na concentração de 0.5%. A utilização de temperaturas mais baixas ocorreu devido à variação ocorrida no comportamento das ervas em experimento anterior, e também porque um dos objetivos deste trabalho é aplicá-las em um alimento submetido à temperatura de refrigeração (4° C).

Em relação às ervas *in natura*, o açafraão foi o que demonstrou maior poder inibidor, apresentando 88.34% na temperatura de 25° C e 90.7% na temperatura de 4° C, conforme Tabela 4.11, que corresponde uma redução de > 3 Log e > 4 Log., respectivamente. Em seguida, a sálvia com 78.92% na temperatura de 25° C e 88.07% na temperatura de 4° C, como exposto na Tabela 4.11, que corresponde uma redução > 3 Log. e > 4 Log., respectivamente. Depois, veio o orégano, com 71.66% na temperatura de 25° C e 83.38% na temperatura de 4° C, respectivamente, como mostra a Tabela 4.11. Evidenciou-se que todas aumentaram o poder inibidor quando se reduziu a temperatura de incubação. Resultados já observados anteriormente pela técnica do gradiente de concentração em placas.

Porém quando se avaliaram as ervas processadas, os resultados foram bem diferentes. Nas duas temperaturas, 25° C e 4° C, durante o período de sete dias, o alecrim foi superior às outras em redução de células e porcentagem de inibição, exibindo uma inibição de 92.91% com redução de > 5 Log. e 93.45% com redução de > 5 Log., respectivamente, resultados mostrados na Tabela 4.12. A sálvia foi instável na inibição durante todo o período de sete dias de incubação, e também o seu poder de inibição foi influenciado pela temperatura. Na temperatura de 25° C, a sálvia inibiu 71.18% com redução de > 2 Log. e na temperatura de 4° C inibiu 86.21% com redução de > 4 Log., como demonstrado na Tabela 4.12.

Em termos de redução de células e porcentagem de inibição durante o período de sete dias na temperatura de 25° C, o açafraão foi o segundo melhor, exibindo > 3 Log. e 85.49%. Entretanto, na temperatura de 4° C, ficou em terceiro lugar no que se refere à porcentagem de inibição com 86.03%, com pouca diferença em relação ao segundo melhor. Já na redução de células bacterianas, ficou com a

última colocação, exibindo  $> 3$  Log. Todavia, o açafraão foi estável tanto na porcentagem de inibição como na mudança de temperatura, ou seja, a temperatura nada influenciou o seu poder inibidor. Resultado similar também foi evidenciado pelo alecrim, o que conduz a interpretação de que ambas são estáveis à mudança de temperatura, conforme se verifica na Tabela 4.12.

Contudo, como mostra a Tabela 4.12., o tomilho, a sálvia e o orégano a temperatura de 25°C, exibiram resultados similares no que se refere à redução de células. Todas as ervas apresentaram  $> 2$  Log. Porém, na porcentagem de inibição, os resultados se diferenciaram. O tomilho e a sálvia mostraram diferença insignificante, 71.76% e 71.18%, respectivamente, e o orégano apresentou 58.04%. Resultados similares foram encontrados a temperatura de 4°C, mas todas, com acréscimo no poder inibidor devido à influência da temperatura.

Então, a sálvia apresentou redução de  $> 4$  Log. e 86.21% de inibição, ficando como a segunda melhor inibidora nesta temperatura. O orégano e o tomilho com  $> 4$  Log. e diferença mínima na porcentagem de inibição, 71.11% e 70.74%, respectivamente. O orégano foi à erva mais influenciada pela temperatura de incubação. Resultado que pode ser evidenciado pelo aumento na porcentagem de inibição da temperatura de 25° C para a temperatura de 4° C. Outro fator relevante em relação ao orégano é que na concentração utilizada, no período de cinco dias de incubação, a bactéria mostrou-se resistente, caracterizando uma resistência de 28.33% com uma média de 7.08% na temperatura de 25° C. Essa resistência se acentuou a temperatura de 4° C, apresentando uma resistência de 71.11% com uma média de 17.77%. Estes resultados podem ser evidenciados através da Tabela 4.12.

A mesma constatação com a concentração utilizada também foi observada com o tomilho, que mostrou porcentagem de inibição menor na temperatura de 4°C em relação à porcentagem de inibição obtida na temperatura de 25° C. Porém, este fato ocorreu no segundo dia. A porcentagem de resistência foi maior na temperatura de 25° C, com 71.76% e uma média de 17.94% de resistência. Enquanto na temperatura de 4°C com 66.26%, e uma média de resistência de 16.56%.

Estes resultados explicam porque o orégano e o tomilho, apesar de terem sido influenciados pela temperatura de incubação e exibirem uma redução bacteriana de  $> 4$  Log. na temperatura de 4° C, redução inclusive maior que a adquirida pelo açafraão que foi de  $> 3$  Log. na mesma temperatura, mostraram porcentagens de inibição menores que a do açafraão. Também direciona a

interpretação de que as ervas que foram mais estáveis no percentual de inibição durante o período de sete dias obtiveram percentual de inibição maior, mesmo com redução de células menores no período estabelecido.

Na avaliação do efeito inibidor frente à *P. fluorescens* realizada em duas temperaturas, 25° C e 4° C, no período de sete dias em meio de cultura caldo na forma de óleo resina, através dos resultados obtidos evidenciou-se que houve variações da temperatura de incubação, entre os óleos resinas, conforme se observa na Tabela 4.13 e Figura 4.20. Resultados também já observados pela técnica do gradiente de concentração em placa.

Nesta avaliação, o alecrim foi o que demonstrou maior poder de inibidor em termos de percentual de inibição, com 91.15% na temperatura de 25°C e 89.94% na temperatura de 4°C. Em termos de células bacterianas, essa inibição correspondeu a uma redução de > 4 Log. no período de sete dias nas duas temperaturas, assemelhando-se a sálvia na temperatura de 25° C e inferior à mesma na temperatura de 4° C. Então, a temperatura não alterou o comportamento do alecrim, que se mostrou com inibição similar nas duas temperaturas e sem variações no percentual inibidor durante o período de incubação. Ou seja, o percentual mostrou-se em equilíbrio durante o período de sete dias, o que demonstra que o alecrim foi estável nas duas temperaturas (Tabela 4.13 e Figura 4.20.).

A sálvia foi a segunda melhor, com percentual inibidor de 84.94% na temperatura de 25° C e 88.17% na temperatura de 4°C, o que correspondeu a uma redução de > 4 Log. , igual ao do alecrim, e > 5 Log., superior ao alecrim, respectivamente. Evidenciou-se uma interferência da temperatura de incubação no aumento do efeito inibidor de 1 ciclo Logarítmico. Entretanto, a sálvia demonstrou instabilidade no percentual de inibição durante o período de sete dias nas duas temperaturas de incubação, exibindo 84.94% com redução de > 4 Log. na temperatura de 25° C, e 88.17% de inibição e > 5 Log. de redução na temperatura de 4° C. A diferença entre o alecrim e a sálvia no percentual de inibição foi devido à estabilidade do alecrim em relação a sálvia (Tabela 4.13 e Figura 4.20.).

O tomilho e o orégano obtiveram resultados similares, exibindo uma redução de > 3 Log. na temperatura de 25° C e > 4 Log. na temperatura de 4° C, com 81.47%, 82.78% e 68.47%, 77.92%, respectivamente. O açafraão exibiu muito pouca atividade em relação às outras, apresentando uma redução de > 1 Log. nas duas temperaturas e 48.52% na temperatura de 25° C e 50.41% na temperatura de

4°C. Porém, demonstrou estabilidade e não teve interferência da temperatura no poder inibidor, similarmente ao ocorrido com o alecrim. Resultados já evidenciados anteriormente pela técnica do gradiente de concentração (Tabela 4.13 e Figura 4.20.).

Entretanto, observamos que a bactéria não demonstrou resistência ao óleo resina do orégano e tomilho na concentração utilizada (0.5%), como demonstrado anteriormente. Atribuímos isso a fatores como:

1. Na forma de óleo resina, o componente que estimulou a bioquímica bacteriana pode não ter sido extraído pelo etanol, fato já discutido nas etapas anteriores.
2. Uma possível reação do meio de cultura utilizado e os componentes das ervas durante o processo de esterilização em autoclave provocando um efeito bactericida, também não podem ser ignorados.

Porém, fatores como estabilidade do alecrim e do açafrao nas duas temperaturas, diferenças na inibição do açafrao e do alecrim, que foi maior na erva que no óleo resina, conforme Tabela 4.13 e Figura 4.20, já demonstrados anteriormente, também foram evidenciados nesta técnica empregada.

Em relação ao óleo essencial avaliados através desta técnica, podemos verificar através da Tabela 4.14 e Figura 4.21, que o óleo de açafrao foi o que demonstrou maior poder de inibição, com 95.53%, e redução de > 5 Log. sob controle, até o quinto dia de incubação a 25° C, em uma concentração de 0.5%. Entretanto, apesar da estabilidade do óleo de açafrao no percentual de inibição, com 97.35% na temperatura de 4° C, ocorreu uma redução no número de células bacterianas em um período mais curto, que foi de > 5 Log. em dois dias.

O óleo essencial de sálvia teve uma redução de > 5 Log. em um período de cinco dias com 94.37% na temperatura de 25° C e 96.09% na temperatura de 4°C. E o óleo essencial do orégano teve um comportamento similar, com redução no número de células de > 5 Log. por um período de cinco dias com 91.32% de inibição na temperatura de 25° C e 93.25% de inibição na temperatura de 4°C. O óleo essencial, de sálvia e orégano, mostraram-se mais estável em relação ao percentual de inibição, resultado não observado na erva *in natura* (Tabela 4.14 e Figura 4.21.).

O óleo essencial de alecrim não foi tão inibitório, exibindo 38.4% de inibição e redução de > 1 Log. à temperatura de 25° C, por um período de sete dias, porém na temperatura de 4° C, observou-se que o efeito inibidor aumentou para 61.2% com uma redução de > 2 Log. (Tabela 4.14 e Figura 4.21).

O óleo essencial de açafraão, foi o que demonstrou maior poder inibitório frente à *P. fluorescens*, e foi novamente avaliado em caldo com uma concentração mais baixa, de 0.2%, a mesma utilizada para determinação da MIC, através da técnica gradiente de concentração em placa, com o intuito de usá-la no teste de aplicação em alimento. Os resultados demonstraram que o óleo essencial de açafraão apresentou poder inibidor de 87.55% e redução de > 5 Log. em 25° C e 93.02% de inibição com redução de > 5 Log. em temperatura de 4° C, por um período monitorado de sete dias (Figura 4.21.).

Essas variações ocorridas decorrentes da baixa concentração utilizada (0.5%), concordam com as comprovações realizadas por WRIGHT, et al (1954). Esses autores constataram que níveis baixos de determinadas ervas processadas estimulam o crescimento microbiano, entretanto, em relação ao óleo essencial testado, tal efeito não foi verificado na concentração utilizada.

ZAIKA & KINSSINGER, 1979, reportaram, também, que concentrações baixas de determinadas ervas processadas estimulam o metabolismo microbiano ao passo que concentrações mais altas proporcionam um efeito inibidor. Os mesmos autores verificaram, ainda, em outro estudo, em 1981, realizado com as ervas processadas de orégano, que determinada bactéria poderá ser inibida pelo orégano adicionado ao alimento, mas que também, poderá desenvolver resistência ao efeito inibidor em baixas concentrações.

Em 1983, os autores (op. cit.) evidenciaram que ervas processadas, tal como orégano, alecrim, sálvia e tomilho, retardaram o crescimento de bactérias lácticas em meio líquido, e que, após ter sido superado o efeito da atividade bacteriostática, todas essas ervas promoveram uma forte estimulação no metabolismo das bactérias em estudo.

Estes, entre outros fatores, explicam porque as ervas avaliadas pela técnica do gradiente se portaram diferentemente quando avaliadas pela técnica em caldo, como a constatação reportada por ZAIKA (1988), que interpretações e comparações são complicadas por ocorrer muitas variações nas metodologias utilizadas para determinação da atividade antimicrobiana.

#### **5.4. Avaliação da atividade inibidora do óleo essencial de açafraão em peito de frango picado**

Na avaliação realizada através de uma simulação a uma temperatura de 4°C com carne de frango, que se adicionou 0.2% de óleo essencial de açafraão, e se inoculou uma população de aproximadamente  $10^6$  UFC/g de *P. fluorescens*, considerando a microbiota natural do frango. Verificou-se uma inibição de 57.14% de *P. fluorescens* durante um período de sete dias, e, em relação a microbiota natural, de apenas 50%, somente durante o dia zero e dia um. (Figura 4.22).

A população da microbiota natural do frango foi relativamente baixa no dia zero com 80 células/g. Após adição dos óleos essenciais de açafraão, 50% de redução foi verificado. No dia um, houve novamente uma redução de 50% da população sobrevivente do dia zero. Entretanto, no dia três, o óleo essencial de açafraão na concentração utilizada não foi suficiente para impedir o crescimento da população sobrevivente do dia um, que cresceu 75% no dia três, evoluindo o crescimento para o dia cinco, com 71.42% e no dia sete, com 78.46%.

Exibindo, em média, uma evolução quase equivalente à evolução da amostra controle, que foi de 79.31% no dia três, 74.41% no dia cinco e 77.33% no dia sete. Então, observa-se que o óleo essencial de açafraão pode ter interferido na fase Logarítmica, aumentando o tempo de geração e alterando o crescimento máximo, conseqüentemente proporcionando uma redução microbiana de  $> 2$  Log. nos dias zero e um, em relação à amostra controle. Esse resultado conduz a interpretação de que houve um aumento da vida de prateleira desse frango em temperatura de refrigeração em relação a sua microbiota natural. Estes resultados são mostrados na Figura 4.22.

Todavia, em relação à simulação realizada com *P. fluorescens* inoculada em carne de frango, o óleo essencial de açafraão foi um pouco mais eficiente. Da população inoculada de  $3.4 \times 10^6$  UFC/g, apenas  $5.8 \times 10^5$  UFC/g foi verificada no dia zero na amostra controle, indicando que 82.94% da população foi inibida, pois não conseguiu sobreviver e penetrar no frango. Então, verifica-se que a população inicial no frango foi de  $5.8 \times 10^5$  UFC/g dentro das condições averiguadas.

No dia zero, observou-se uma inibição de 99% na amostra que continha óleo essencial de açafraão. Descontando as que não conseguiram sobreviver em relação à amostra controle, podemos verificar uma diferença de 16.2% e uma inibição de 95.34% com redução de  $> 1$  Log.

Essa inibição foi monitorada durante sete dias e se evidenciou uma inibição de 68.89% no dia um, 48.80% no dia três, 58.13% no dia cinco e 52.77% no dia sete, perfazendo uma média de 61.75% de inibição e uma redução em número de células de > 2 Log. em relação à população inicial e > 5 Log. comparado com a população final da amostra controle, como demonstra Figura 4.22.

Entretanto, verificou-se que a redução foi gradativa ao longo do período de sete dias na temperatura de 4° C, o que não ocorreu com a microbiota natural, que exibiu inibição apenas nos dias zero e um, evidenciando-se crescimento logo após esse período. Apesar dessa inibição ter provocado um atraso no avanço normal do crescimento quando comparamos com a amostra controle, conforme se verifica na Figura 4.22.

O resultados levam a interpretação de que o óleo essencial de açafraão na concentração utilizada e sob condições monitoradas de laboratório provocou inibição na amostra de frango em que *P. fluorescens* foi inoculada, e também teve um efeito inibidor limitado frente a microbiota natural do frango da amostra em que *P. fluorescens* não foi inoculada.

Porém, é difícil afirmar que apenas *P. fluorescens* foi inibida na amostra de frango na qual foi inoculada, mesmo considerando a realização de testes bioquímicos para controlar a sua presença a partir do 3º período de incubação. Contudo, todas as colônias com característica semelhante ao controle realizado com cultura pura de *P. fluorescens*, coletadas a partir do dia três, 66.66% foram positivas nos testes bioquímicos realizados no estudo para controle da presença de *P. fluorescens* no frango analisado.

Todavia, quando este resultado foi comparado com os resultados obtidos em teste em meio caldo na mesma concentração de óleo essencial de açafraão, com a mesma bactéria, sem a microbiota mista, evidenciamos uma inibição maior em meio caldo do que em carne de frango, (Figura 4.23). Atribuímos a dois fatores possíveis:

1. À insolubilidade do óleo de açafraão na fase sólida
2. Alimento que têm na composição alto percentual de, lipídios e proteínas, e baixo percentual de água, como é o caso da carne de frango, dificultam a penetração e posterior ação de substâncias nas células microbianas. Os lipídeos e proteínas protegem a célula microbiana dificultando a penetração e a ação de substâncias, acrescido da falta de água que também dificulta a penetração.

Em relação aos aspectos levantados, OKA (1964), em um estudo sobre o mecanismo de ação de substâncias antimicrobianas em alimentos, classificou-os em dois grupos baseando-se em seu mecanismo de ação. Um deles foi considerado dependente da absorção da substância antimicrobiana na fase sólida pelas células microbianas, pois essa absorção é equilibrada pela concentração da substância antimicrobiana na fase aquosa e não pela concentração média da mesma no alimento.

FARBOARD, et al (1976), apoiaram a afirmação teórica de OKA sobre a explicação do efeito bactericida e bacteriostático de substâncias antimicrobianas em carnes.. De acordo com os autores, a probabilidade da existência de células bacterianas cobertas com óleo é um fator adicional que diminui a velocidade de penetração da substância antimicrobiana dentro da célula.

SHELEF, et al (1984) também concordaram com essas afirmações, verificando que ocorreu diminuição do efeito inibidor de substância antimicrobiana pela pouca quantidade em água e aumento em proteína e lipídeo. Segundo os autores citados, em geral, alimentos com composição mais complexa requerem uma concentração maior de substância antimicrobiana para uma efetiva inibição de crescimento microbiano.

Esses autores chegaram a essa conclusão após a realização de um experimento em três alimentos distintos (arroz, frango, talharim e carne vermelha). Através da composição aproximada desses alimentos e seu pH, verificaram que o arroz não contém lipídeos, tem baixa proteína e alto carboidrato, porém o frango e o talharim possuem moderado nível dos três nutrientes, já a carne vermelha é alta em proteína e lipídeo, mas não contém carboidrato, e o pH desses três alimentos variou entre 5.9 - 6.3. Os autores evidenciaram que lipídeos e proteínas são mais efetivos que os carboidratos para proteger a bactéria da ação dos componentes inibidores contidos na substância antimicrobiana analisada. Então, a maior proteção da bactéria foi pela carne vermelha, que tem baixo conteúdo em água, não tem carboidratos e tem alto conteúdo em proteína e lipídeo.

SHELEFF et al também compararam a sensibilidade do microrganismo em meio caldo e nesses três alimentos com diferentes composições e constataram que todos os microrganismos testados foram mais sensíveis em meio caldo do que nos três alimentos testados. Os autores argumentam que no estudo realizado, a atividade inibidora da substância aumentou com o aumento em óleo volátil,

afirmando que é plausível que substâncias com alto conteúdo em óleo volátil também contenha altos níveis de antimicrobianos.

EVERTING & DEIBEL (1992), apesar de ter conseguido o controle de crescimento de *L. monocytogenes* em meio caldo utilizando ervas processadas de orégano, cravo e sálvia em concentrações de 0.1%, 0.5% e 1.0%. Em uma concentração de 1% de ervas processadas de cravo e orégano em carne de frango não obtiveram o mesmo resultado no controle do crescimento de *Listeria monocytogenes*.

Contudo, os autores sugerem que existe a possibilidade do uso dessas ervas associadas a outras substâncias inibidoras para controle de microrganismos em alimentos que contenham percentual baixo de lipídeos e proteínas, ou até o uso direto de seu óleo essencial. Sugestões estas que foram experimentadas por AURELI, et al (1992), com resultado promissor. Os autores, , conseguiram uma redução no número de células de  $> 2$  Log. em *L. monocytogenes*, quando testaram o óleo essencial de tomilho em carne de porco moída.

## 5. CONCLUSÃO

Condimentos vegetais (ervas aromáticas) são freqüentemente utilizados com a única finalidade de proporcionar aroma e sabor aos alimentos e bebidas, embora longos conhecimentos elucidam que alguns condimentos vegetais têm atividade

antimicrobiana. Neste trabalho avaliou-se a atividade antimicrobiana dos condimentos vegetais (ervas aromáticas) *in natura*, processado, óleo resina e de óleo essencial sobre *P. fluorescens*, que é uma bactéria considerada importante na deterioração de carnes.

Avaliou-se também o comportamento do óleo essencial de açafrão, frente a essa mesma bactéria quando inoculada em peito de frango picado e frente a microbiota natural desse frango.

Nessas avaliações, concluiu-se que:

1 - A temperatura utilizada neste trabalho influenciou no comportamento do poder inibidor das ervas *in natura*, processada, óleo essencial e óleo resina de orégano, tomilho e sálvia, e do alecrim *in natura* e óleo essencial apenas na temperatura de 25° C e 4° C, evidenciando uma ação bacteriostática em todas elas.

2 - O alho porró, processado e *in natura*, não exibiu qualquer atividade inibidora na concentração de 1% p/v utilizada.

3 - A erva processada e óleo resina de alecrim e açafrão, não dependeram da temperatura de incubação, mostraram-se estáveis e bactericidas, mas a erva *in natura* e o óleo essencial de alecrim e açafrão dependeram da temperatura e mostraram-se bacteriostáticos.

4 - O óleo essencial de açafrão na concentração utilizada, reduziu a população microbiana da carne de frango picada nas amostras em que *P. fluorescens* foi inoculada, mas teve uma redução limitada nas amostras que continham apenas a microbiota natural do frango.

5 - O óleo essencial de açafrão frente a uma população padronizada de *P. fluorescens*, teve melhor efeito inibidor testado em caldo BHI do que testado em carne de frango picada.

6 - *P. fluorescens* mostrou-se resistente durante o período de incubação em caldo BHI com as ervas processadas de orégano, tomilho e sálvia.

7 - Os óleos essenciais exibiram maior poder de inibição nas técnicas e temperaturas utilizadas.

## REFERÊNCIAS

- ABDOU, I. A. & A. A. ABDOU-ZEID; 1972. Antimicrobial activities of *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum frutescens*, *Eruca sativa*, *Allium kurrat* on bacteria. **Qual. Plant. Mater Veg.** XXII, Egypt, 1: 29-35.
- AKITUG, S.E. % M. KARAPINAR. 1987. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. Int. **Journal Food Microbiol.** 4 : 161-166.
- AL-DELAIMY, K.S. & S. H. ALI; 1970. Antibacterial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria. **Journal Sci. Fd Agric**, London, 21 (2) : 110-112.
- ALLEGRINI, J. & M. S. BUOCHBERG; 1972. Une technique d'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. **Production et Problemas Pharmaceutiques.** Paris, 27 :891-897.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1992. **Compediun of methods for the microbial examitation of foods.** Washington : American Health Association, 3<sup>a</sup> ed., 1219p.
- ANDERSON, E.E., W. B. ESSELEN, JR. & A. R. HANDLEMAN; 1953. The effect of essential oils the inhibition and thermal resistance of microrganisms in acid food products. **Food Research.** Chicago, 18 (1) : 41-47.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO (ABIA). 3<sup>a</sup> revisão,12/24, 1978.
- AURELI, P. , A. CONSTANTINI & S. ZOLEA ; 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection.** italy, 55 (5) : 344 - 348.
- AZZOUZ, M. A. & L. B. BULLERMAN; 1982. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. **Journal of Food Protection.** Nebraska, 45 (14) : 1298-1301.
- BACHAMAN, F.M. 1917. The use of mmicrorganisms to determine the preservative value of different brands of spices. **The journal of industrial ande engineering chemistry** 1 (2) : 121 - 123.
- BACHMANN, F. M. 1916. The inhibiting action of certais spices on the growth of microrganisms. **The journal of industrial and engineering chemistry.** 8 (7) : 620 - 623.
- BAHK, J. A. E. YOUSEF & E. H. MARTH; 1990. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in the presence of selected spices. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** (U.S.A.), 23 : 66-69.

BANWART, G. J. 1979. "**Basic Food MicrobioLogy.**" AVI Pub. Co., Inc., Westport, Conn.

BEERY, J.T., M.B. HUGDAAL, M.P. DOYLE.1988. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. **Appl. Environ. Microbial.** 54 : 2365-2370.

BENJILALI, B., A. TANTAQUI-ELARAKI, A. AYADI & M. IHLAL; 1984. Method to study antimicrobial effects of essential oils : Application to the antifungal activity of six moroccan essences. **Journal of Food Protection. Morocco**, 47 (10) : 748-752.

**BERGY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY.** 1986. v. 2 , 1599p.

BEUCHAT, L. R. & D. A. GOLDEN; 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. **Food TechnoLogy.** Chicago, 43 (1) : 134 - 142.

BEUCHAT, L. R.; 1976. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. **Journal of Food Science.** Chicago, 41 : 899-902.

BEYLIER-MAUREL, MF.; 1976. Activité bactériostatique de certaines matières premières de parfumerie. **Rivista Italiana** Essenge, Piante Officinali, Olii Vegetal, Sapcenì, Milano, 58 : 283-286.

BLUM, H. B. & FABIAN, F. W. 1943. Spices, oils and their components for controlling microbial surface growth. **J. Fruit product.** 22 : 326-329.

BOER, E. W. M. SPIEGELENBER & F. W. JANSSEN; 1985. MicrobioLogy of spices and herbs. **Antonie van Leeuwenhoek.** Netherlands, 51 (4) : 435-438

BOUCHBERG, M. S., J. ALLEGRI, C. BESSIERE, M. ATTISSO, J. PASSET & R. GRANGER; 1976. Propriétés microbioLogiques des huiles essentielles de chimiotypes de *Thymus vulgaris* Linnaeus. **Rivista Italiana EPP OSS.** 58 : 527-536.

BRIESKORN, C. H. & A. FUCHS; 1962. Die struktur des pikrosalvins, eines diterpeno-diphenol-lactons aus dem salbeiblatt. **Chemische Berichte.** 95 : 3034-3041.

BRIESKORN, C. H., A. FUCHS, J. B-SON BREDENBERG, J. D. McCHESNEY, & E. WENKERT; 1964. The structure of carnosol. **Journal of Organic Chemistry.** 29 : 2293-2298.

BRIOZZO, J., L. NUNEZ, J. CHIRIFE, L. HERSZAGE, M. D'AQUINO; 1989. Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrates sugar solution. **Journal of Applied BacterioLogy.** Argentina, 66 (1) : 69-75.

BRYAN, F.L. 1980. Foodborne disease in the United States associated with meat and poultry. **J. Food Protection.** 43 : 140-150.

BULLERMAN, L. B.; 1974. Inhibition of aflatoxin production by cinnamon. **Journal of Food Science**. Nebraska, 39 : 1163-1165.

BULLERMAN, L.B, F.Y. LIEU, A.S. SALLY. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils. cinnamic aldehyde and eugenol. **Journal of Food Science**. 42 (4) : 1107 - 1109.

BURKARD, G. K. WOGAN, G.N. 1984. **Alternativas da alimentação**. 2ª ed., São Paulo : Almed, 176p.

CHANG, S. S., B. OSTRIC-MATIJEVIC, O. A. L. HSIES & CHENG-LI HUANG; 1977. Natural antioxidants from Rosemary and Sage. **Journal of Food Science (USA)**. 42 (4) : 1102-1106.

CHAVEZ, A . & GUERRERO, I. 1991. Detection of biogenic amines as meat spoilage indicators. **Journal of Muscle foods**. 2 : 263 - 278.

COLLINS, M. A. & H. P. CHARLES; 1987. Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid : two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis L.* **Food Microbiology**. 4 (4) : 311-315.

CONNER, D. E. & L. R. BEUCHAT; 1984. Effects of essential oils plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal of Food Science**. Chicago, 49 : 429-434.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Edição da Fundação Colouste Gulbenkian/Lisboa. 3ª ed. v.1, 1976.

COTTA, T. & P. DELPECH; 1995. Efeitos de vários tratamentos pós-abate sobre a distribuição e a multiplicação bacteriana em carcaças resfriadas de frangos. **Ciência Tecnologia de Alimentos**. Brasil, 15 (1) : 37-39.

CRUZ, G.A. **Desidratação de alimentos**. Rio de Janeiro : Globo, 207p. 1989.

DABBAH, R., V. M. EDWARDS & W. A. MOATS; 1970. Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. **Applied Microbiology**, Bethesda, 19 (1) : 27-31.

DAINTY, R. H. & HIBBARD, C. M. 1980. Aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. of **Journal Applied Bacteriology**. 48 : 3

DAINTY, R. H. , EDWARDS, R. A ., HIBBARD, C.M. 1984. Volatile compounds associated with aerobic growth of some *Pseudomonads* species on beef. **Journal of Applied Bacteriology**. 57 : 75 - 81.

DAINTY, R. H. , EDWARDS, R. A ., HIBBARD, C.M. 1985. Time course of volatile compound formation during refrigerated storage of naturally contaminated beef in air. **Journal of Applied Bacteriology**. 59 : 303 - 309.

DAINTY, R. H. , EDWARDS, R. A ., HIBBARD, C.M., Marnewick, J. J. 1989. Volatile compounds associated with microbial growth on normal and high pH beef stored at chill temperature. **Journal of Applied Bacteriology**. 66 : 281 - 290.

DAINTY, R. H. , EDWARDS, R. A ., HIBBARD, C.M., RAMANTANIS, S. V. 1986. Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packaged beef. **Journal of Bacteriology**. 61 : 117 - 123.

DAINTY, R. H. , EDWARDS, R. A , HIBBARD, C.M. 1985. Putrescine and cadaverine in vacuum packed beef. **Journal of Applied Bacteriology**. 58 : 13 - 19.

DAYAL, B. & R. M. PUROHIT; 1971. Screening of some indian essential oils for their antifungal properties. **The Flavour Industry**. London, 2 (8) : 484-485.

DEANS, S.G. & G. RITCHIE. 1987. Antibacterial properties of oils. **Int. Journal Food Microbiol.** 5 : 165-180.

DEIBEL, K. E., BANWART, G.J. 1984. Effect of spices on *Campylobacter jejuni* at three temperatures. **Journal Food Safety**. 6 : 241-251.

DELINE, G. D.1985. Modern spice alternatives. **Cereal foods world**. 30 (10) : 697.

DOBRYNIN, V. N. m. n. KOLOSOV, B. K. CHERNOV & n. a. DERBENTSEVA;1976. Antimicrobial substances from *Salvia Officinalis*. **Chemistry of natural compounds**-(USSR), 12 (5) : 623-624.

DOUDOROF, M. & PALERONI, N.J. 1974. **Pseudomonas**. In : BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 8<sup>a</sup>. ed. (R.E. Buchanan & N.E. GIBBONS, eds.). The Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA, pp. 217-243.

DUXBURY, D. D.; 1992. Extract of rosemary provides natural solution to dehydrated products. **Food Processing**. 53 (5) : 103-104.

DZIEZAK , J. D.; 1989. Spices. **Food Technology**. Chicago, (1) : 102-116.

EDWARDS, R. A ., DAINTY, R. H., HIBBARD, C.M.1987. Volatile compounds produced by meat Pseudomonads and related reference strains during growth on beef stored in air at chill temperatures. **Journal of Applied Bacteriology**. 62 : 403 - 412.

EGAN, A . F., SHAY, B. J. 1982. Significance of lactobacilli and film permeability in the spoilage of vacuum-packaged beef. **Journal of Food Science**. 47 : 1119 - 1122.

EVERTTING, W. T. & K. E. DEIBEL; 1992. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to spices at two temperatures. **Journal of Food Safety**. Hammond, 12 : 129-137.

FARAG R. S., Z. Y. DAW & S. H. ABO-RAYA; 1989. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. **Journal of Food Science**. Egypt, 54 (1) : 74-76.

FARAG, R. S., Z. Y. DAW, F.M. HEWEDI & G. S. A. EL-BAROTY; 1989. Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. **Journal of Food Protection**. Egypt, 52 (9) : 665-667.

FARBOOD, M. I., J. H. MacNEIL & K. OSTOVAR. Effect of rosemary spice extractive on growth of microorganisms in meats. **Journal Milk Food TechnoLogy**. Pennsylvania, 39 (10) : 674-679.

**FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. 1988. São Paulo : Atheneu, 4<sup>a</sup> ed. parte 1,

FARREL, T. K. 1995. **Spices, condiments, and seasonings**. 3<sup>a</sup> ed., New York : Van nostrand reinhold - AVI book, 414p.

FLEMING, H. P., R. L. THOMPSON & R. F. McFEETERS; 1993. Firmness retention in pickled peppers as affected by calcium chloride, acetic acid, and pasteurization. **Journal of Food Science**. 58 (2) : 325-330.

FRAZIER, W.C. & WESHOFF, D.C. 1978. **Food MicrobioLogy**, 3<sup>a</sup> ed., Mcgraw Hill Book Company, New York, USA.

GALLI, A ., FRANZETTI, L., BRIGUGLIO, D. 1985. Attivita antimicrobica in vitro de oli essenziali ed estratti di spezie di uso alimentare. **Ind. Alimnet**. 24 : 463-466.

GERHARDT,U. 1975. **Especias y condimentos**. Espanha : Acribia. 157p.

GIACOMETTI, D. C. 1989. **Ervas condimentares e Especiarias**. São Paulo : Nobel. 127p.

GILL, C. O .1986. The control of microbial spoilage in fresh meats. In : PEARSON, A . M. & DUTSON, T. R. Advances in Meat Research. V. 2 : **Meat and Poultry Processing**. 49 - 88.

GÖNÜL, S. N. A. & M. KARAPINAR; 1987. Inhibitory effect of linden flower (tilia flower) on the growth of foodborne pathogens. **Food MicrobioLogy**, London, 4 (4) : 97-100.

GOULD, E. & PETERS, J. A,1971. **On testing the frescness of frozen fish**. Fishing News. London, England, 80p.

GREER, G. G. Red meats, poultry and fish. In : MCKELLAR, R. C. **Enzymes of Psychrotrophs in raw foods** Boca raton, florida : CRC Press, Inc. pp. 268 - 292.

GVOZDIKOVA, T. B., E. T. OGNESYAN & L. A. AIDINYAN; 1990. Amino acid compositions of lavender, rock rose, and rosemary. **Chemistry of Natural compounds**. 26 (6) : 719-720.

HAMILTON, M. A . E., AHMAD, M. H. 1994. Isolation and characterization of Pseudomonas from processed chicken in Jamaica. **Applied Microbiology**. 18 (1) : 21 - 23.

HEATH, H. B., & REINECCIUS, G. 1986. Flavoring materials of natural origin: Flavor chemistry and technology. In : DZIEZAK , J. D.; 1989. Spices. **Food Technology**. Chicago, (1) : 102-116.

HITOKOTO, H., S. MOROZUMI, T. WAUKE, S. SAKAL & H. KURATA; 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, 39 (4) : 818-822.

HUHTANEN, C. N.; 1980. Inhibition of Clostridium botulinum by spice extracts and aliphatic alcohols. **Journal of Food Protection**. Pennsylvania, 43 (3) : 195-196.

INATANI, R. N. NAKATANI, H. FUWA & H. SETO; 1982. Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*). **Agric. Biol. Chem.** 46 (6) : 1661-1666.

INTERNATIONAL COMMISSION MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMSF).1980. **Microbial ecology of foods**. 2. Food Commodities. New York, Academic Press.

JAY, J. M., RIVERS, G. M. 1984. Antimicrobial activity of some food flavoring compounds. **Journal Food Safety**. 6 : 129 - 139.

JAY, M. J. 1994. **Microbiología moderna de los alimentos**. Acribia: Zaragoza (España), 3ª ed.

JOUBERT, L., M. GATTEFOSSE, J. OUDAR & R. TRUCHOT; 1970. Application des huiles essentielles en désinfection et en thérapeutique animales. **Revue Méd vét.** 121 (1), 55-64.

JULSETH, R. M. & R. H. DEIBEL; 1974. Microbial profile of selected spices and herbs at import. **Journal Milk Food Technology**. 37 (8) : 414-419.

KAJIWARA, T., A. HATANAKA, T. KAWAI, M. ISHIHARA & T. TSUNEYA; 1988. Study of flavor compounds of essential oil extracts from edible Japanese kelps. **Journal of Food Science**. 53 (3) : 960-962.

KAR, a. & S. R. JAIN; 1971. Investigations on the antibacterial activity of some indian indigenous aromatic plants. **The Flavour Industry**. London, 2 (2) : 11-113.

KATAYAMA,T., & E. NAGAI; 1960. Chemical significance of the volatile components of spices in the food preservative viewpoint-iv. Structure and antibacterial activity of terpenes. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**. Japan, 26 (1) : 29-32.

KISSINGER , J.C. & L. L. ZAIKA; 1978. Effect of major spices in lebanon boLogna on acid production by starter culture organisms. **Journal of Food Protection**. Pennsylvania, 41 (6) : 429-431.

KLAENHAMMER, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie** 70 : 337 - 349.

KOSKER, O, FELLER,C.R., ESSELEN, W.B. 1949. Mustard as a preservative for fruit juices. **Glass Packer**. 28 : 818-823.

KRAJEWSKA , A. M. & J. J. POWERS; 1988. Sensory properties of naturally occurring capsaicinoids. **Journal of Food Science**, 53 (3) : 902-905.

KURITA, N. & S. KOIKE; 1982. Synergistic antimicrobial effect of sodium chloride and essencial oil components. **Agricultural and BioLogical Chemistry**. Tokyo, 46 (1) : 159-165.

KURITA, N., M. MIYAJI, R. KURANE & Y. TAKAHARA; 1981. Antifungal activity of components of essential oils. **Agricultural and BioLogical Chemistry**. Tokyo, 45 (4) : 945-952.

LACAZ, S.C. **Antibióticos**. 1969. São Paulo : Sarvier 2<sup>a</sup>. ed. 607p.

LARRY, M. 1992. **Inhibitory substance in milk**. IN : Food and Drug Administration (FDA). BacterioLogical Analytical Manual , 7<sup>a</sup> ed., cap. 20A, p. 245-251.

LAWRENCE, C. A, S. S. BLOCK.1995. **Disinfection,, sterilization, and preservation**. 3<sup>a</sup> ed., Philadelphia : Lea & Fediger, 1049p.

LEITÃO, M.F.F. 1988. **Tratado de microbioLogia : MicrobioLogia de alimentos**. V. 1 São Paulo : Manole. p. 03 - 76.

LI, K., C. P. ONG & S. F. Y. LI; 1994. Systematic multivariate optimization of supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatographic Science**, 32 : 53-56.

LILLARD, H. S. 1989. Factors affecting the persistence of Salmonella during the processing of poultry. **Journal of Food Protection**. 52 (11) : 829 - 832.

LISTON, J. 1980. **Fish and sehellfish and their products**. In : Microbial EcoLogy of Foods, vol II - Food Commodities (INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF, ed.) Academic Press, New York, USA, pp. 567 - 605.

LIU, H. F., A. M. BOOREN, J. I. GRAY & R. L. CRACKEL; 1992. Antioxidante efficacy of oleoresin rosemary and sodium tripolyphosphate in restructured pork steaks. **Journal of Food Science**, 57 (4) : 803-806.

MACHADO, R. A. 1992. **Microbiota bacteriana no processamento de frangos e sua influência na vida útil de carcaças refrigeradas**. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 175p.

MACMEEKIN, T. A . 1975. Spoilage association of chicken breast muscle. **Applied and Environmental MicrobioLogy**. 29 (1) : 44 - 47.

MACMEEKIN, T. A . 1977. Spoilage association of chicken leg muscle. **Applied and Environmental MicrobioLogy**. 33 (6) : 1244 -1246.

MACNEIL, J. H., P. S. DIMICK & M. G. MAST; 1973. Use of chemical compounds and a rosemary spice extract in quality maintenance of deboned poultry meat. **Journal of Food Science**. 38 : 1080-1081.

MALLEA, M., M. SOLER, F. ANFOSSO & J. CHARPIN; 1979. Activité antifungique d'essences aromatiques. **Pathologie BioLogie**. Paris, 27 (10) : 597-602.

MANTIS, A J., KARAIOANNOGLOU, P.G., SPANOS, G.P., PANETSOS, A G. 1978. The effect if garlic extract on food poisoning bacteria in culture media I. Staphylococcus aureus. **Lebensm. - Wiss. U-Technol.**. 12 : 330-332.

MARANCA, G. 1992. **Plantas aromáticas na alimentação**. 1ª ed, São Paulo: Nobel, 259p.

MARSHALL, D. L., ANDREWS, L. S., WELLS, J. H., FARR, A . J. 1992. Influence of modified atmosphere packaging on the competitive growth of Listeria monocutogenes and Pseudmonas fluorescens on precooked chicken. **Food MicrobioLogy**. 9 (4) : 303 - 309.

MARSHALL, D. L., WIESE, L. P. L., WELLS, J. H., FARR, A . J. 1991. Comparitive growth of Listeria monocytogenes and Pseudomonas fluorescens on precooked chicken nuggets stored under modified atmospheres. **Journal Food Protection**. 54 (11) : 841 - 843.

MARTINS, M.C. & O. RUSIG. 1992. Cúrcuma - um corante natural. Boletim **Sociedade Brasileira e Ciências e TecnoLogia de Alimentos**. 26 (1) : 53-65.

MARUZZELLA, J. C. & P. A. HENRY ; 1958. The in vitro antibacterial activity of essential oils and oil combinations. **Journal of the American Pharmaceutical Association**. Coston-USA, 57 (4) : 294-296.

MAY, K. N. 1974. Changes in microbial numbers during final washing and chilling of commercialy slaughtered broilers. **Poultry Science**.53 : 1282-1285.

MCMEEKIN, T. A, PATERSON, J.T. 1975. Characterization of hidrogen sulfide-producing bacteria isolated from meat and poultry plants. **Applaid microbiology**. 29 : 165 - 169.

MCMEEKIN, T. A. 1977. Spoilage association of chicken leg muscle. **Journal Applied and Enviromental Microbiology**. 33 (4) : 1244-1246.

MEAD, G.C. 1990. Food poisoning *Salmonellas* in the poutry - meat industry. **Journal Food**. 92 : 4-12.

MENDES, J.E.F. 1993. **Especiarias**. Instituto de investigação científica e tropical - Secretaria de estado da ciência e tecnoLogia. 200p.

MONTGOMERY, D.C. 1991. **Desingn and anallysis of experimnts**. New York : John wilwy & sons. 33<sup>a</sup> ed. 649p.

MOROZUMI, S.; 1978. Isolation, purification, and antibiotic activity of o-methoxycinnamaldehyde from cinnamon. **Applied and Environmental Microbiology**. (U.S.A.), 36 (4) : 577-583.

MORRIS, J. A., A. KETTRY & E. W. SEITZ; 1979. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. **Journal of the American Oil Chemists Society** New Jersey, 56 : 595-603.

MULLER, G. **Microbiologia de los alimentos vegetables**. Zaraboza (Espanã) : Acribia, p. 291, 1981.

NADAL, N. G. M.; 1973. Antimicrobial properties of bay and other phenolic essential oils. **Cosmetics and Perfumery**. Oak Park, ILL, 88 (10) : 37-38.

NAGY, J.G. & R. P. TENDERDY; 1967. Antibacterial action of essential oils of artemisia as an ecoLogical factor. **Applied Microbiology**, Washington, 15 (4) : 819-821.

NARASIMHA, B. G. V., NIGAM, S. S. 1970. The in vitro antimicrobial efficiency of some essential oils. **The flavour industry**. (1) : 725 - 729.

NASASIMHA, B. G. V., RAO, P. S. 1972. The efficacy of some essential oils on pathogenic fungi. II. **The flavour industry**. London, 7 (3) : 368 - 370.

NETO, V. A, LEVI, G.C., LOPES, H.V., MENDONÇA, J.S., BALDY, J.L.S. 1985. **Antibióticos na prática médica**. São Paulo : Savier. 3<sup>a</sup>. ed.209p.

NKANGA,E.J. & URAIH,N. 1981. Prevalence of Staphylococcus aureus in meat samples from traditional markets in Benin city, Nigeria and possible control by use of condiments. **Journal Food Protection** 44 (1) : 4 - 8.

NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUO ADOLFO LUTZ.. 1985. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo : O instituto, v. 1, 3<sup>a</sup> ed., 533p.

NOSKOWA, G. L. 1972. **MicrobioLogia de las carnes conservadas por el frio**. Acribia: Zaragoza (Espanã), 111 p.

OKA, S. 1964. Mechanism of antimicrobial effect of various preservatives. In : SHELEF, L. A, JYOTHI, E.K., BULGARELLI, M. 1984. Effect of sage on growth of enteropathogenic bacteria in foods and culture media. **Journal Food science**. 49 (3) : 737-809.

OLIVEIRA, L. A T., FRANCO, R.M., CARVALHO, J.G. A P. 1992. Enterobacteriaceae em especiarias utilizadas na elaboração de embutidos cárneos. **Revista higiene alimentar**. 6 (22) : 27 - 33.

OURIVES, E.A.A. & A.J.S. HAMAD. 1994. Atividade antimicrobiana dos condimentos vegetais (ervas aromáticas) in natura versus processados aplicado em alimentos : Uma Revisão. **II Semana da pesquisa da UFSC**. p. 147.

PARRY, W. J. 1969. **Spices : morphoLogy, histoLogy, chemistry**. V. 2 New York : Chemical publishing company, 243p.

PELKSAR, M., REID, R., CHAN, E.C.S. 1980. **MicrobioLogia**. V. 1. São Paulo : McGraw-Hill do Brasil, 566p,

PELLECUER, J. J. L. ROUSSEL, C. ANDARY, G. PRIVAT, M. JACOB & R. TOMEI; 1979. Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles. **Rivista Italiana E.P.P.O.S**. 111 (1) : 10-11.

PRAKASH,V. 1995. **Leafy spices**. 2<sup>a</sup> ed, Florida : Boca raton, 114 p.

PRASAD, G. , A. KOMAR, A. K. SINGH, A. K. BHATTACHARYA, K. SINGH & V. D. SHARMA; 1986. Antimicrobial activity of essential oils of some ocimum species and clove oil. **Fitoterapia**. India, 107 (6) : 429-432.

RACCACH, M.; 1984. The antimicrobial activity of phenolic antioxidants in foods : a review. **Journal of Food Safety**. Westport, 6 : 141-170.

RAMASWAMY, T. S. & BONERJEE, B. N. 1948. Vegetables dyes as antioxidants of vegetable oil. **Ann Biochem Exptl. Med** (India), 8 : 55 - 59.

RAO, B. G. V. N. & P. SUBBA RAO; 1972. The efficacy of some essential oils on pathogenic fungi.II. *The Flavour Industry*. London, 3 (7) : 368-370.

RAO, B. G.V. N. & S. S. NIGAM; 1970. The in vitro antimicrobial efficiency of essential oils. India **J. Med. Res.** 58 (5) : 627-633.

RHYU, H. Y.; 1979. Gas chromatographic characterization of oregano and other selected spices of the labiate family. **Journal of Food Science**. Chicago, 44 : 1373-1378.

RICO-MUÑOZ, E. & P. M. DAVIDSON; 1983. Effect of corn oil and casein on the antimicrobial activity of phenolic antioxidants. **Journal of Food Science**. Ames,Iowa, 48 : 1284-1288.

RIZZINI, C. T., MORS, W. B. 1976. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo : USP. 207P.

RONNING, I. E., FRANK, H. A . 1987. Growth inhibition of putrefactive anaerobe 3679 caused by stringent-type response induced by protonophoric activity of sorbic acid. **Appl. Environ. Microbiol.** 53 : 1020 - 1027.

RONNING, I. E., FRANK, H. A . 1988. Growth response of putrefactive anaerobe 3679 to combinations of potassium sorbate and some common curing ingredients (sucrose, salt, and nitrite), and to noninhibitory levels of sorbic acid. **Journal Food Protection**. 51 : 651 - 652.

ROSENGARTEN, F.J. 1969. **The book of spices**. Filadelfia : Livingston publishing company. 489p.

SABRI, N. N., A. A. ABOU-DONIA, N. M. GHAZY, A. M. ASSAD & A. M. EL-LAKANY; 1989. Two new rearranged abietane diterpene quinones from *Salvia aegyptiaca* L. **J. Org. Chem.**, 54 (17) : 4097-4099.

SALEEM, Z. M. & K. S. AI-DELAIFY; 1982. Inhibition of *Bacillus cereus* by garlic extracts. **Journal of Food Protection**, 45 (11) : 1007-1009.

SALZER, U.J., BROKER, U., KLIE, H.F., LIEPE, H.U. 1977. Wirkung von pfeffer und pfeffer-inhaltstoffen auf die microflora von wurstwaren. **Die fleischwirtschaft**. 57 : 2011-2014.

SHELEF, L. A . 1983. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**. 6 : 29-44.

SHELEF, L. A., E.K. JYOTHI & M. A. BULGARELLI; 1984. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. **Journal of Food Science**. 49 (3) : 737-809.

SHELEF, L. A., O. A. NAGLIK & D. W. BOGEN; 1980. Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary, and allspice. **Journal of Food Science**. 45 : 1042-1044.

SHELEF, L. A.; 1983. Antimicrobial effects of spices. **Journal food safety**. Westport, 6 : 29-44.

SHEWAN, J.M. & MURRAY, C.K. 1979. **The microbial spoilage of fish with special reference to the role of psychrophiles**. In : Cold tolerant microbes in spopilage and the evironment. (A D. Russel & Fuller, eds.) Academic Press, London, England, pp. 117-136.

SHEWAN, J.M. 1976. The biochemistry and microbiology of low temperature spoilage. **Food technol**. 28 : 490-410.

STANIER, R. Y., ADELBERG, E. A, & INGRAHAM, J. 1976. **The microbial word**, 4<sup>a</sup>. ed. Prentice-Hall Inc., New Jercey, USA.

STILES, M.E. 1991. **Modified atmosphere packaging of meat, poutry and their products**. In : OoRAIKUL, B. & STILES, M.E. Modified atmosphere packaging of foods. New York : ellis Horwood Series. 119 - 147.

TORRES, M. C.L., A. S. PEREIRA, M. A. TEIXEIRA & P. C. STRINGHETA;1986. Inibição de salmonella por extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) I - obteção de extratos de alecrim em solventes orgânicos. **Anais Esc. Agron. e Vet**. 14, 15 e 16 : 53-58.

VARELTZIS, K., BUCK, E. M., LABBE, R.G. 1984. Effectiveness of a betalains potassium sorbate system versus sodium nitrite for color development and control of total aerobes, clostriudium perfringens and Clostridium sporogenes in chicken frankfusters. **Journal Food Protection**. 47 : 532 - 536.

VIEIRA, S. , HOFFMANN, R. 1989. **Estatística experimental**. São Paulo : Atlas, 179p.

WALTER, P. & C. JENNINGS; 1970. Isolement et caractérisation des composés responsables de la flaveur. **Industr. alim afr**. Paris, 87 : 537-541.

WEBB, A. H. & F. W. TANNER; 1945. Effect of spices and flavoring materials on growth of yeasts **Food Research**. Chicago, 10 (7) : 273-282.

WIT, J. C., S. NOTERMANS, N. GORIN & E. H. KAMPELMACHER; 1979. Effect of garlic oil or onion oil on toxin production by *Clostridium botulinum* in meat slurry. **Journal of Food Protection**. 42 (3) : 222-224.

WRIGHT, J. W. C. W. BICE & J. M. FOGELBERG; 1954. The effect of spices on yeast fermentation. **Cereal Chemistry**, 31 (2) : 100-112.

WU, J. W., MH. LEE, CT. HO & S. S. CHANG; 1982. Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. **JAACS**. Chicago, 58 (8) : 339-345.

YASHPHE, J., R. SEGAL, A. BREUER & G. ERDREICH-NAFTALI; 1979. Antibacterial activity of artemisia *herba-alba*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. Washington, 68 (7) : 924-925.

ZAICA, L. L., J. C. KISSINGER & A. E. WASSERMAN; 1983. Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. **Journal of Food Science**. Chicago, 48 (5) : 1455-1459.

ZAICA, L. L., ZELL, T. E., PALUMBO, S. A, SMITH, J. L. 1978. Effect of spices and salt on fermentation of Lebanon Bologna-type sausage. **Journal of food science**. 43 : 186 -188.

ZAICA, L. L.; 1988. Spices and herbs : their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9 : 97-118.

ZAICA, L.L. 1988. Spices and herbs : their antimicrobial activity and its determination. **Journal of Food Safety**. 9 : 97 - 115.

ZAICA, L.L., & KISSINGER, J.C. 1979<sup>a</sup>. Effects of some spices on acid production by starter cultures. **Journal food protection** 42 : 572.

ZAICA, L.L., & KISSINGER, J.C. 1979<sup>b</sup>. Inhibitory and stimulatory effects of spices and herbs on lactic acid starter cultures. 39<sup>th</sup> **Annual Meeting, Institute of Food Technologists**, St. Louis, MO, 10 - 13.

ZAICA, L. L. & J. C. KISSINGER, 1981. Inhibitory and stimulatory effects of oregano on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*. **Journal of Food Science**, 46 (4) : 1205-1210.