UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Ciências Biológicas - Bacharelado

Trabalho Acadêmico

Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Origanum majorana* L. frente a cepas bacterianas patogênicas de alimentos

Juliana de Lima Marques

Pelotas, 2013

JULIANA DE LIMA MARQUES

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* L. E *Origanum majorana* L. FRENTE A CEPAS BACTERIANAS PATOGÊNICAS DE ALIMENTOS

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profª Drª Gladis Aver Ribeiro

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M357a **Marques, Juliana de Lima**

Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Origanum majorana* L. frente a cepas bacterianas patogênicas de alimentos / Juliana de Lima Marques. – 63f. : il. color. – Monografia (Conclusão de curso). Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2013. – Orientador Gladis Aver Ribeiro.

1.Biologia. 2.Antimicrobianos. 3.Especiarias. 4.*Origanum vulgare*. 4.*Origanum majorana*. 5.Micro-organismos. 6.Orégano. I.Ribeiro, Gladis Aver. II.Título.

Banca examinadora:

Dra. Gladis Aver Ribeiro

Dr. Claiton Leoneti Lencina

Dra. Daniela Brayer Pereira

Dra. Patrícia da Silva Nascente

Agradecimentos

Aos meus pais, Ilton e Leda, por tudo que me proporcionaram até hoje. Por terem sempre me apoiado em todas as decisões que tomei e nunca deixado de acreditar em mim.

Ao meu irmão, Fernando, pelo companheirismo, por ter sempre me incentivado durante todos esses anos.

A minha orientadora Prof. Dra. Gladis Aver Ribeiro, por ter me acolhido, me proporcionado tempo e espaço, e principalmente por todos os ensinamentos que me fizeram cativar ainda mais por essa área de pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, principalmente ao Luis, Alessandra, Isaias que sempre me auxiliaram no que precisei.

A Rosana, que me incentivou a trabalhar com a linha de pesquisa que optei, me auxiliando com muita paciência nos primeiros instantes desse trabalho.

A minha colega de laboratório, Suzane, pelo companheirismo durante todo esse tempo.

A minha amiga e também colega de estágio, Lisiane, por ser a minha dupla de infindáveis pesquisas e trabalhos de laboratório, sempre com muito incentivo.

A Marília, William, Thainá e Mateus por estarem sempre ao meu lado durante esses cinco anos de graduação, por todos os incentivos, festas, noites viradas de estudos, e principalmente por toda a amizade dedicada. Digo e repito: viveria tudo isso outra vez.

A todos que de alguma forma fazem parte da minha vida, e que me incentivaram e aturaram minhas alegrias e frustrações ao longo da realização deste trabalho.

A todos vocês, o meu sincero muito obrigada!

Resumo

MARQUES, Juliana de Lima. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Origanum majorana* L. frente a cepas bacterianas patogênicas de alimentos**. 63f. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Um dos principais problemas de saúde pública hoje em dia é a contaminação microbiana dos alimentos. Diversos estudos acerca da ciência e tecnologia de alimentos têm ressaltado o potencial antimicrobiano das especiarias, considerando a sua inserção no sistema de bioconservação de alimentos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais *Origanum majorana* L. (manjerona) e *Origanum vulgare* L. (orégano) frente a cepas bacterianas patogênicas isoladas de alimentos comercializados na cidade de Pelotas, RS, Brasil. Foram analisadas amostras de frangos de dois estabelecimentos, totalizando 20 amostras, em um período de quatro meses. Foi realizado o isolamento e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.. Para determinação da ação antibacteriana dos óleos, foram utilizadas as técnicas de Difusão em Disco e Microdiluição em Caldo, ambas com inóculo padronizado na escala de Mac Farland, e para a técnica de Microdiluição em Caldo as concentrações dos óleos entre 0,781 a 100 $\mu L.mL^{-1}$. Os resultados mostram que das 20 amostras de frango analisadas, 18 apresentaram contaminação bacteriana, correspondendo a 90% do total. Quanto à avaliação da atividade antibacteriana, os óleos essenciais testados apresentaram atividade frente a todas as cepas bacterianas testadas, indicando a possibilidade de substituição aos conservadores químicos em alimentos.

Palavras-Chave: Antimicrobianos. Especiarias. Manjerona. Micro-organismos. Orégano.

Abstract

MARQUES, Juliana de Lima. **Antibacterial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against food-borne pathogenic bacterial strains.** 63f. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Currently, microbial contamination in food is one of the major public health problem. Several studies about science and food technology have highlighted the antimicrobial potential of spices, considering their integration into food biopreservation system. The present study aimed to evaluate *in vitro* the antibacterial activity of essential oils *Origanum majorana* L. (marjoram) and *Origanum vulgare* L. (oregano) against pathogenic bacterial strains isolated from foods that are sold in Pelotas city, RS, Brazil. It was analyzed 20 samples of chickens from two different sites for a period of four months. It was carried out the isolation and identification of coagulase positive *Staphylococcus, Escherichia coli, Salmonella* spp. In order to determinate antibacterial action in oils, it was used Disk Diffusion and Broth Microdilution, both with standardized inoculum on Mac Farland scale, and the concentrations of oil between 0.781 and 100 µL.m mL^{-1} for Technical of Broth Microdilution. It was found bacterial contamination in 18 of samples of chicken, corresponding to 90% of the total. Regarding the evaluation of antibacterial activity, these essential oils tested showed activity in all strains tested, indicating the possibility of replacing the chemicals conservatives in foods.

Keywords: Antimicrobial. Marjoram. Microorganisms. Oregano. Spices.

Lista de Figuras

Figura 1 *Origanum vulgare* L. 18

Figura 2 *Origanum majorana* L. 19

Figura 3 Placa de Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), com colônias negras, características de *Salmonella* spp. 25

Figura 4 Placa de Ágar *Hektoen-Enteric* (HE), com colônias negras, características de *Salmonella* spp. 25

Figura 5 Placa de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), apresentando colônias mucóides com brilho metálico, características de *Escherichia coli* 26

Figura 6 Placa de Ágar *Baird Parker* apresentando colônias negras, características de *Staphylococcus* spp. 26

Figura 7 Placa de Ágar *Baird Parker* apresentando colônias com halo transparente, características de *Staphylococcus* spp. 26

Figura 8 Distribuição dos microrganismos encontrados no estabelecimento I e II 29

Figura 9 Halos de inibição apresentados pelo óleo essencial de *Origanum majorana* L. frente à *Salmonella* spp. (A), *Staphylococcus* coagulase positiva (B) e *Escherichia coli* (C) 33

Figura 10 Halos de inibição apresentados pelo óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente à *Salmonella* spp. (A), *Staphylococcus* coagulase positiva (B) e *Escherichia coli* (C) 33

Figura 11 Placa de microtitulação mostrando a determinação das concentrações inibitórias mínimas do óleo essencial de manjerona frente à *Staphylococcus* coagulase positiva (A) e *Salmonella* spp. (B).... 35

Figura 12 Placa de microtitulação mostrando a determinação das concentrações inibitórias mínimas do óleo essencial de orégano frente à *Staphylococcus* coagulase positiva (A) e *Salmonella* spp. (B).... 36

Lista de Tabelas

Tabela 1 Resultados referentes ao isolamento e identificação de micro-organismos em amostras de frangos, obtidos no período de fevereiro a junho de 2012 em dois estabelecimentos comerciais no município de Pelotas (RS), Brasil 27

Tabela 2 Valores referentes aos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Origanum majorana* L. (manjerona) e *Origanum vulgare* L. (orégano) frente às cepas bacterianas testadas através da técnica de Difusão em Disco 50

Tabela 3 Valores referentes às médias aritméticas e desvio padrão dos halos inibitórios apresentados pelas cepas bacterianas testadas frente aos óleos essenciais de *Origanum majorana* L. (manjerona) e *Origanum vulgare* L. (orégano) 32

Tabela 4 Valores referentes à CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) do Teste de Microdiluição em Caldo utilizando o óleo essencial de *Origanum majorana* L. (manjerona) 54

Tabela 5 Valores referentes às médias aritméticas e desvio padrão da CIM do óleo essencial de *Origanum majorana* L. (manjerona) frente às cepas bacterianas testadas 34

Tabela 6 Valores referentes à CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) no Teste de Microdiluição em Caldo utilizando o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) 58

Tabela 7 Valores referentes às médias aritméticas e desvio padrão da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) frente às cepas bacterianas 37

Lista de Abreviaturas

Ágar Nutriente – AN

Brain Heart Infusion – BHI

Concentração Bactericida Mínima – CBM

Concentração Inibitória Mínima – CIM

Doenças Transmitidas por Alimentos – DTAs

Óleos essenciais – OE

Tryptic Soy Broth – TSB

Tween 80 – T80

Unidades Formadoras de Colônia – UFC

Sumário

1 Introdução 11

1.1 Objetivos 13

1.1.2 Objetivo Geral 13

1.1.3 Objetivos Específicos 13

2 Revisão de Literatura 14

2.1 Bactérias Patogênicas 14

2.1.1 *Staphylococcus* coagulase positiva 14

2.1.2 *Salmonella* spp. 14

2.1.3 *Escherichia coli* 15

2.2 Conservadores alimentares 15

2.3 Uso de plantas como agentes antimicrobianos 16

2.4 Atividade dos óleos essenciais 16

2.5 Óleo essencial de Orégano 17

2.6 Óleo essencial de Manjerona 18

3 Materiais e Métodos 20

3.1 Obtenções das amostras 20

3.2 Isolamento e Identificação bacteriana 20

3.2.1 Isolamento e identificação bacteriana de *Staphylococcus coagulase* positiva 20

3.2.2 Isolamento e Identificação bacteriana de *Escherichia coli* 21

3.2.3 Isolamento e Identificação bacteriana de *Salmonella* spp. 21

3.3 Avaliação da atividade antibacteriana 21

3.3.1 Teste de Difusão em Disco 22

3.3.2 Concentração Inibitória Mínima 22

3.3.3 Preparo das diluições do óleo essencial 23

3.3.4 Preparo do inoculo bacteriano 23

3.3.5 Avaliação do Resultado 23

3.3.6 Concentração Bactericida Mínima 24

4 Resultados e Discussão 25
4.1 Isolamento e Identificação de micro-organismos 25
4.2 Atividade antibacteriana 30
4.2.1 Atividade antibacteriana em meio sólido 30
4.2.2 Atividade antibacteriana em meio líquido 33

5 Conclusões 39

Referências 40

Apêndices 49

Anexos 61

1 Introdução

Entre os séculos XX e XXI, a economia sofreu mudanças, provocando um acelerado movimento de pessoas e inclusão de novos valores aos hábitos alimentares. Da mesma forma, houve um aumento expressivo na contaminação dos alimentos, ultrapassando fronteiras transnacionais na ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos - DTAs (ABRAHÃO, 2005).

As DTAs podem ser definidas como doença infecciosa ou de natureza tóxica originada pela ingestão de água ou alimentos contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos ou metais pesados, sendo a maior parte de origem microbiana (WHO, 2011).

Casos de DTAs ocorrem frequentemente em todos os países, no entanto, na maioria das vezes não são divulgados, fazendo com que a real dimensão do problema não seja conhecida (WHO, 2011), por isso é arriscado estimar a incidência das doenças de natureza alimentar. No ano de 2005, por exemplo, foi descrito cerca de 1,8 milhões de casos de pessoas que morreram em virtude de doenças diarréicas no mundo (WHO, 2011).

Essas doenças de origem alimentar podem ser classificadas em dois grupos:

- Intoxicações alimentares: provocadas pelo consumo de alimentos contendo a toxina pré-formada ou o agente fabricante da toxina, a qual é produzida no período de intensa proliferação do micro-organismo patogênico no alimento. Como exemplo: *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

- Infecções alimentares: provocadas pelo consumo de alimentos que contém células viáveis de micro-organismos patogênicos, os quais se aderem à mucosa intestinal e proliferam, colonizando o intestino. Após, pode ocorrer a colonização da mucosa e penetração nos tecidos, ou até mesmo, a produção de toxinas que modificam o funcionamento das células do trato gastrointestinal. Como exemplo de bactérias invasivas: *Salmonella, Shigella, Escherichia coli* enteroinvasora*, Yersinia enterocolítica*,

entre outras. Entre as toxigênicas, destacam-se *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Campylobacter jejuni* (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A indústria alimentícia almeja à produção de alimentos que ofereçam vida-de-prateleira extensa e inocuidade com relação à presença de micro-organismos patógenos e suas toxinas. A nova tendência do consumidor e da legislação de alimentos tem feito com que essa procura se torne cada vez mais necessária. Os consumidores buscam alimentos de qualidade adequada, livres de preservativos e minimamente processados, porém com vida-útil longa (GOULD, 1995).

Vale ressaltar que o uso indiscriminado e prolongado de antibacterianos acaba desencadeando um processo, em que os micro-organismos patogênicos mutantes que oferecem maior resistência frente aos compostos químicos utilizados que comumente são selecionados, fazendo com que o uso de antimicrobianos de linhagem natural torne-se uma opção eficaz e econômica (VARGAS et al., 2004). Além disso, muitos conservantes químicos por apresentarem atividade carcinogênica e teratogênica quando utilizados à longo prazo, estão sendo rejeitados pelos consumidores (MOREIRA et al., 2005).

De acordo com Silva et al. (2008), na sociedade contemporânea, o interesse em terapias alternativas e o uso de produtos naturais vem crescendo nos últimos anos. Há muitos anos, as plantas já eram aproveitadas nas sociedades humanas com finalidades terapêuticas. Suas propriedades tóxicas ou curativas foram descobertas ao acaso durante a busca por alimentos.

Substâncias antibacterianas de plantas foram descobertas, especialmente, através da observação de sua habilidade de inibir o crescimento de micro-organismos expostos a estes compostos, tendo por consequência a influência dos métodos e micro-organismos utilizados nos resultados (SOUZA; AVANCINI; WIEST, 2000).

O conhecimento sobre conservantes químicos apontam que seu uso prolongado pode acarretar em prejuízos à saúde, provocando até mesmo efeitos carcinogênicos. Com base nisso, pesquisas sobre o potencial antibacteriano dos óleos essenciais são extremamente válidos e de grande valor para a descoberta de novas alternativas com o intuito de substituir os conservantes sintéticos por naturais, visando dessa forma, reduzir os riscos tanto à saúde do consumidor quanto prejuízos à economia provocados por micro-organismos que contaminam alimentos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais das espécies vegetais *Origanum majorana* L. (manjerona) e *Origanum vulgare* L. (orégano) frente a cepas bacterianas patogênicas oriundas de carnes de frangos comercializadas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificar a ocorrência e identificar bactérias patogênicas em amostras de frango;
- Determinar a suscetibilidade das cepas isoladas de frango aos óleos essenciais de *O. majorana* e *O. vulgare*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais testados através das técnicas de Difusão em Disco e Microdiluição em Caldo.

2 Revisão de Literatura

2.1 Bactérias patogênicas

2.1.1 *Staphylococcus* coagulase positiva

Os estafilococos são considerados bactérias mesófilas, as quais se desenvolvem na faixa de 7ºC a 48ºC, e as enterotoxinas responsáveis pela intoxicação alimentar são formadas entre 10ºC e 46ºC (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Em condições adequadas, o micro-organismo se multiplica no alimento, atingindo alta carga microbiana, provocando a síntese das enterotoxinas no período de quatro a seis horas, as quais são consideradas termoestáveis, permanecendo no alimento após o cozimento, favorecendo a instalação de um quadro de intoxicação alimentar (CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002). A incubação de um surto é de 30 minutos a oito horas após a ingestão do alimento (SANTOS, 1997). Os principais sintomas são vômitos, diarréias e náuseas, e no caso de idosos e crianças que já apresentem outras doenças, a intoxicação pode ser fatal (CLEMENTE; VALLE; ABREU, 2003).

Vale ressaltar o gênero *Staphylococcus* como uma das principais fontes de ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no mundo, tendo origem nos manipuladores de alimentos contaminados, sendo as fossas nasais o principal reservatório desse micro-organismo (BRYAN, 1998).

2.1.2 *Salmonella* spp.

É considerada um micro-organismo gram-negativo, anaeróbio facultativo, fermentativo, oxidase negativa e catalase positiva. É conhecida por causar gastrenterite em humanos. Tem sido constatado que o aumento de enfermidades provocadas por alimentos nos últimos tempos é decorrente da intensificação da produção e a criação intensiva de animais de produção (MICHAEL et al., 2007). De acordo com estudos de Nadvorny, Figueiredo e Schmidt (2004), desde o ano de

1993, a DTA de maior incidência no Rio Grande do Sul é a salmonelose. A precária qualidade dos alimentos remete a riscos de veiculação de enfermidades para o consumidor, e perdas econômicas. Os sintomas decorrentes da salmonelose são cólicas abdominais, vômitos, febre e diarréia. Em idosos e crianças pode se tornar grave (SANTOS et al., 2001).

2.1.3 *Escherichia coli*

E. coli é comumente encontrada na microbiota intestinal de animais. Estudos relatam que grande parte dos sorotipos deste micro-organismo não apresentam fatores de virulência, porém determinadas cepas adquiriram conjuntos diferentes de genes que lhe ofereceram a capacidade de provocar a doença (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002), podendo ser agrupadas conforme seus mecanismos de patogenicidade (BARNES et al., 2003; KNOBL et al., 2006; BERCHIERI JUNIOR et al., 2009). Os alimentos mais relacionados a surtos provocados por *E. coli* enteropatogênica são as carnes cruas e frangos, porém qualquer alimento quando exposto à contaminação fecal já é considerado suspeito (SILVA; SILVA, 2005).

2.2 Conservadores alimentares

Os conservadores alimentares podem ser definidos como qualquer substância ou mistura de substâncias, que são adicionadas aos alimentos com a finalidade de conservá-los, em concentrações controladas, e que não façam parte da constituição do mesmo. Os conservantes podem ser acrescentados aos alimentos durante as fases de produção, processamento, tratamento, embalagem, transporte e armazenamento (MPOUNTOUKAS et al., 2008).

A legislação tem limitado o uso de conservantes em alguns alimentos, o que por sua vez tem provocado problemas para a indústria, pois determinados micro-organismos oferecem resistência perante os agentes conservantes utilizados de forma rotineira (PIPER et al., 1998). Esta nova tendência tem feito com que a indústria de alimentos procure compostos alternativos para atingir seus objetivos, os quais estão relacionados à estabilidade microbiana dos seus produtos acabados em relação à atividade de micro-organismos causadores de deterioração ou até mesmo de doenças. Dessa forma, nasce um novo ponto de vista de conservação de alimentos, utilizando o sistema antimicrobiano natural, que nada mais seria que a

interligação de vários compostos, especialmente os condimentos que possuem ação antimicrobiana (BEDIN; GUTKOSKI; WIEST, 1999).

2.3 Uso de plantas como agentes antimicrobianos

É válida a busca de novos antimicrobianos de origem natural, visto que o Brasil apresenta uma das maiores biodiversidade do planeta. Cerca de 80% da população brasileira utiliza somente 37% dos medicamentos disponíveis no mercado, dependendo de medicamentos de origem vegetal (STANGARLIN; SCHWAN-ESTRADA; NOZAKI, 1999; FUNARI; FERRO, 2005).

O tratamento com remédios naturais vem crescendo nos últimos tempos, pois a população busca menores custos, menor probabilidade de efeitos colaterais e combater a resistência de determinados micro-organismos frente aos fármacos convencionais (POZZATTI, 2007), o que pode acabar justificando o aumento em mais de 50% da produção de óleos e gorduras vegetais na última década, classificando o Brasil como o sexto produtor desses compostos, perdendo somente para a Malásia, China, Indonésia, Estados Unidos e Índia (FAO, 2011).

Os óleos essenciais (OE) são considerados os produtos resultantes de partes das plantas por meio de destilação de arraste com vapor d’água (ISO 9235, 1997). De maneira mais genérica, são misturas de substâncias constituídas por terpenóides, hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular, fenóis, ácidos, alcoóis, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas (DORMAN; DEANS, 2000).

2.4 Atividade dos óleos essenciais

De acordo com alguns estudos, a ação antibacteriana dos OE pode sofrer influencia por vários aspectos, como a composição, concentração, processamento e estocagem. Em contrapartida, a composição do substrato e o micro-organismo utilizado para o crescimento do mesmo também pode alterar determinados resultados relacionados a essas propriedades dos óleos (BERTINI et al., 2005). No caso dos óleos essenciais extraídos de condimentos, como por exemplo, orégano, tomilho e cravo, os quais normalmente são hidrofóbicos, podem acabar provocando a ruptura da membrana de micro-organismos (HELANDER et al., 1998).

Sabe-se que os OE apresentam atividade antibacteriana, porém não se tem conhecimento suficiente sobre seu mecanismo de ação. Há concordância acerca de que a maior parte dos compostos aromáticos e fenólicos desempenham sua

atividade antimicrobiana na membrana plasmática, fazendo com que haja modificações em sua estrutura e funções (HOLEY; PATEL, 2005), ou seja, há maiores probabilidades de que sua atividade antimicrobiana não seja devido a um determinado mecanismo, e sim aos vários alvos existentes na célula (BURT, 2004).

Porém, alguns componentes presentes nos alimentos como proteínas e gorduras se ligam e solubilizam compostos fenólicos, o que acaba restringindo sua atividade antimicrobiana. Este fato demonstra que a ação antibacteriana de plantas condimentares pode ser mais reduzida em sistemas alimentares do que em meios de cultura (SHELEF; JYOTHI; BULGARELLI, 1984).

Há alguns pressupostos de que a substituição de conservantes químicos por condimentos naturais pode acarretar em uma alteração na microbiota intestinal, reduzindo os riscos de desenvolver câncer, pelo fato dos condimentos apresentarem um efeito inibidor no crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, presentes nos alimentos (MAIA; FERREIRA; ABREU, 2004).

Os condimentos naturais não apresentam somente propriedade aromatizante, como também podem estender a vida útil dos alimentos através da sua atividade bacteriostática e bactericida, dilatando o início do crescimento e deterioração de micro-organismos não desejáveis, influenciando por sua vez na epidemiologia e profilaxia de intoxicações alimentares (BEDIN; GUTKOSKI; WIEST, 1999; SOUZA, 2003).

2.5 Óleo essencial de Orégano

O OE de orégano é extraído da *Origanum vulgare* pertencente à família Lamiaceae. Esta planta é considerada perene, ereta, aromática, com cerca de 30 a 50cm de altura, caracterizando seu hábito herbáceo. É também utilizada como condimento ou como flor ornamental (LAMBERT; SKANDAMIS; COOTE, 2001; ARANGO; SÁNCHEZ; GALVIS, 2004; BAYDAR; OZKAN, 2004; BUSATTA, 2006). É de origem Mediterrânea, apresentando folhas simples e flores esbranquiçadas, rosas ou violáceas, dispostas em glomérulos e ligados por inflorescências paniculadas terminais (Fig. 1). Os seus OE são abundantes em polifenóis que fazem a proteção das células, retardando o envelhecimento (LORENZI; MATOS, 2002),.

O orégano é um dos mais populares condimentos utilizados no mundo, sendo utilizado na culinária e também como terapia medicinal, despertando interesse não só na utilização das folhas na medicina popular, mas também em

relação ao seu óleo essencial com finalidades terapêuticas (CLEFF et al., 2008). Com base nisso, tem sido bastante estudado em relação aos compostos que compõem parte de seu OE, pois acredita-se que há um grande potencial antimicrobiano presente em seus componentes químicos (REHDER et al., 2004; BUSATA, 2006). Entretanto, para as aplicações deste óleo terem resultados satisfatórios é necessário que haja estabilidade em algumas condições, como a suscetibilidade de determinadas linhagens de bactérias e a concentração ótima para inibição dos patógenos (MOREIRA et al., 2005) para que o mesmo possa ser empregado com sucesso em um sistema de bioconservação de alimentos (GOULD, 1995).

Figura 1 – *Origanum vulgare* L.
Fonte: <http://kaubic.in/spicesdatabase/Oregano/soils.htm>

2.6 Óleo essencial de Manjerona

Um dos condimentos mais empregados com fins culinários é a manjerona (*Origanum majorana*). Seus produtos são, normalmente, compostos extraídos das folhas e das inflorescências (Fig. 2). Em seu óleo essencial são identificados isômeros terpênicos (carvacrol e timol) e fenólicos. Já outros compostos contêm triacontano, sitosterol, ácido oleanólico e ursólico, ácido rosmarínico, flavanóides, hidroquinonas, taninos e glicosídeos fenólicos (arbutina e metilarbutina) (FELTROW; ÁVILA, 2000; RODRIGUES; CARAMÃO; ZINI, 2011).

O OE de manjerona vem despertando interesse dos pesquisadores nos últimos tempos, por apresentar atividade biológica como: antibacteriana, antifúngica e antioxidante. Sabendo-se da vasta estabilidade de conservação e ausência de contaminação microbiológica do óleo destilado, pode-se prever que na indústria de alimentos tal óleo teria grande aplicação (RODRIGUES; CARAMÃO; ZINI, 2011; BLANCO, 2011; OKA; ROPERTO, 2011).

Figura 2 – *Origanum majorana* L.
Fonte: <http://www.floriculturawinge.com.br/temperos_ervas.html>

3 Materiais e Métodos

3.1 Obtenções das amostras

Foram realizadas coletas de amostras de frango, de fevereiro a junho de 2012. As amostras foram obtidas de dois estabelecimentos (I – supermercado, II – açougue) na cidade de Pelotas, RS, e conduzidas em sua própria embalagem, dentro de uma caixa isotérmica até o Laboratório de Bacteriologia, pertencente ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia, onde foram realizadas as análises microbiológicas. Os estabelecimentos foram sorteados aleatoriamente. Foram feitas 10 repetições dos testes por estabelecimento, totalizando um número de 20 amostras.

3.2 Isolamento e identificação bacteriana (SILVA et al., 1997)

3.2.1 Isolamento e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva

Para isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp., 25g da amostra de frango foi homogeneizada com 225mL de Caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB) com NaCl. A mistura foi incubada a 36ºC por 24h. Após esse período, foi semeada uma alçada da mistura em placas de Ágar *Baird-Parker* (BP) para a confirmação das espécies bacterianas. Após, as placas foram incubadas a 36ºC por 48h.

As colônias típicas de *Staphylococcus* spp. apresentam-se como: circulares, pretas, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por uma zona opaca ou halo transparente se estendendo para além da zona opaca. Quando houve a presença dessas colônias, foram selecionadas uma ou mais colônias de cada placa e semeadas em tubos de Ágar Nutriente (AN) e incubadas a 36ºC por 24h. Após esse período, foram feitas a coloração de Gram e a prova de coagulase.

A prova de coagulase foi realizada por meio da transferência do inóculo, através do método de dispersão para um tubo de ensaio contendo 2mL de Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubados a 36ºC por 24h. Logo após esse período, foram retirados 1,8mL do inóculo e acrescentado 0,2mL de coagu-plasma®, homogeneizando com movimentos de rotação. Novamente os tubos foram

incubados a 36ºC, verificando a cada hora se houve formação de coágulo, em um período total de seis horas.

3.2.2 Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

Para isolamento e identificação de *E. coli,* foi homogeneizado 25g da amostra em 225mL de Caldo TSB. Após esse período, a mistura foi incubada a 36ºC por 24h.

Para a identificação de *E. coli*, foi semeada uma alçada da mistura através da técnica de esgotamento para placas de Ágar Eosina Azul de Metileno Levine (EMB - Levine) e incubadas a 36ºC durante 24-48h. Após este período, foram selecionadas as colônias típicas, as quais são caracterizadas por apresentarem aspecto seco com brilho metálico e, em seguida, foram cultivadas em AN para conservação e realização das seguintes provas bioquímicas: *Methyl Red* e *Voges-Proskauer* (MRVP), Ágar Citrato de Simmons e Motilidade, Indol e produção de Ácido Sulfídrico (SIM), de acordo com Koneman, Allen e Janda (2001).

3.2.3 Isolamento e identificação de *Salmonella* spp.

Para isolamento e identificação de *Salmonella* spp., foram homogeneizadas 25g de cada amostra em 225mL de Caldo Lactosado (CL), e incubado a 36°C por 24h para recuperação das células injuriadas. Após esse período, as amostras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo os meios de enriquecimento seletivo: Rapapport (RR) e Tetrationato (TT), e novamente, foram incubados a 36°C por 24h. Em seguida, foram semeadas alíquotas de cada um desses tubos, por meio da técnica de esgotamento, contendo os seguintes meios seletivos: Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar *Hektoen-Enteric* (HE), e incubadas a 36°C por 24h.

Segundo Koneman, Allen e Janda (2001), as colônias suspeitas de *Salmonella* spp., devem ser submetidas às seguintes provas bioquímicas: Ágar Lisina Ferro (LIA), Ágar Tríplice de Ferro (TSI) e Caldo de Uréia. No caso de resultados positivos das provas bioquímicas, as colônias foram identificadas sorologicamente utilizando o soro anti-salmonela polivalente somático, o qual é adquirido comercialmente.

3.3 Avaliação da atividade antibacteriana

Após o procedimento de isolamento e identificação das espécies bacterianas propostas, as amostras foram repicadas em Ágar BHI inclinado e incubadas a 36°C por 24h. As colônias foram repicadas para a obtenção de massa bacteriana, assim

como para viabilizar a utilização dos óleos essenciais nos próximos testes. Foram realizadas colorações de Gram para avaliar a pureza dos inóculos.

3.3.1 Teste de Difusão em Disco

De acordo com Sahin et al. (2004), a técnica de difusão em disco é determinada como um tipo de avaliação preliminar em relação à ação antibacteriana dos OE de *O. vulgare* e *O. majorana*.

Os OE utilizados foram obtidos comercialmente. O OE de *O. majorana* foi adquirido da empresa Bioessência® e o de *O. vulgare* da empresa Viessence®. Ambos foram extraídos por destilação por arraste a vapor (Anexos A e B).

A técnica foi realizada em placas de Ágar BHI, e os inóculos foram padronizados de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland, correspondendo a $1{,}5x10^{8}$ $UFC.mL^{-1}$ a partir dos cultivos bacterianos recentes. Após, foram semeados na superfície do meio de cultivo com o auxílio de *swabs* estéreis. Então, discos de papel-filtro estéreis foram dispostos na superfície do Ágar.

Em seguida, 10µL dos OE puros foram adicionados sobre os discos, para a difusão do óleo no meio de cultivo. As placas foram incubadas a 36°C durante 24h. A atividade antibacteriana foi avaliada pela formação de um halo inibitório provocado pelos óleos essenciais sobre as cepas testadas. O experimento foi realizado em duplicata para cada cepa bacteriana, ou seja, foram três discos por placa, dois discos correspondendo a duas repetições do óleo por micro-organismo e um funcionando como controle negativo, embebido com água destilada. A leitura foi realizada medindo-se em milímetros os halos de inibição, e calculando a média entre os dois halos inibitórios.

3.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM é avaliada como sendo a menor concentração do óleo com capacidade de inibir o crescimento microbiano. Para a sua determinação, foi utilizada a técnica de Microdiluição em Caldo, a qual é proposta pelo NCCLS/CLSI M7-A6 (NCCLS, 2003).

Para a realização dos testes, foram utilizadas placas de microtitulação estéreis, cada uma com 96 cavidades. O meio de cultura utilizado foi composto por Caldo BHI (Acumedia®) e agente emulsificante, Tween 80 (T80) a 1%. Vale

ressaltar, que todo o procedimento foi realizado em uma Gabine de Biossegurança Classe II.

3.3.3 Preparo das diluições do óleo essencial

Em condições assépticas, foram realizadas diluições seriadas de razão dois do óleo essencial acrescido ao meio de cultura, com a finalidade de obter concentrações finais de 1,562µL.mL^{-1} a 100µL.mL^{-1}. Em seguida, foram adicionados 180µL de cada uma das concentrações às cavidades na placa, seguindo a uma ordem decrescente de concentrações.

Como controle negativo, foi usado o meio de cultivo com emulsificante T80 livre de inóculo, caracterizando ausência de contaminação. Como controle positivo, foi utilizado o meio de cultivo com emulsificante T80 e inóculo, caracterizando a viabilidade celular bacteriana. Para descartar qualquer possibilidade de contaminação dos óleos essenciais, foi colocado em linhas adicionais, apenas o meio de cultivo+T80+óleo essencial, sem inoculo bacteriano.

3.3.4 Preparo do inóculo bacteriano

A partir dos cultivos de 24h em BHI, foram preparados os inóculos bacterianos. Para isso, as amostras foram dispersas em caldo BHI até atingir uma concentração de microrganismos relativa à escala 0,5 de Mac Farland, equivalendo a 1,5x10^{8} UFC.mL^{-1} e após, foram realizadas diluições de 1:10 com a finalidade de atingir uma população bacteriana final de 1,5x10^{7} UFC.mL^{-1} para exposição às concentrações dos óleos.

Em seguida, foram adicionados 20µL de cada inóculo em todas as cavidades correspondentes, com exceção do controle negativo. Ao final, foi obtida uma concentração de 3x10^{4} células/cavidade. O experimento foi feito em triplicata, ou seja, foram realizadas três repetições para cada micro-organismo. As placas foram tampadas, agitando-as levemente e então, incubadas a 36ºC por 24h.

3.3.5 Avaliação do resultado

A leitura dos resultados foi a partir da adição de 20µL de Cloreto de 2,3,5 Trifenil Tetrazólio a 0,5% em todas as cavidades. As placas foram incubadas a 36ºC por 20min. A alteração na coloração (de transparente a vermelho) foi um indicativo

de atividade metabólica bacteriana, o que por conseqüência comprovou a ausência de inibição do crescimento bacteriano pelos óleos essenciais testados.

3.3.6 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Com base dos resultados da CIM foi determinada a CBM, a qual se refere à menor concentração do óleo essencial capaz de impedir o crescimento microbiano em meio de cultura na ausência do óleo. Então, foram retiradas alíquotas de 5µL de cada uma das cavidades que apresentaram inibição de micro-organismos, repicadas em Ágar BHI e incubadas a 36°C por 24h. Nos casos em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultivo, foi indício de que os óleos essenciais testados não apresentaram atividade bacteriostática e sim bactericida.

4 Resultados e Discussão

4.1 Isolamento e Identificação de Micro-organismos

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que das 20 amostras de frango analisadas, 18 (90%) apresentaram contaminação bacteriana (tab. 1), sendo sete (35%) por *Salmonella* spp. (Fig. 3 e 4), nove (45%) por *E. coli* (Fig. 5) e 17 (85%) por *Staphylococcus* coagulase positiva (Fig. 6 e 7), o que pode ser justificado pelo fato da carne de aves ser muito suscetível à deterioração devido ao seu pH próximo à neutralidade, elevado teor de nutrientes e à atividade de água elevada, que são fatores propícios ao desenvolvimento de micro-organismos provenientes da própria ave ou de fontes externas, e por essas razões deve ser mantida sob refrigeração ou congelamento (SILVA et al., 2002; BLOOD; JARVIS, 1974).

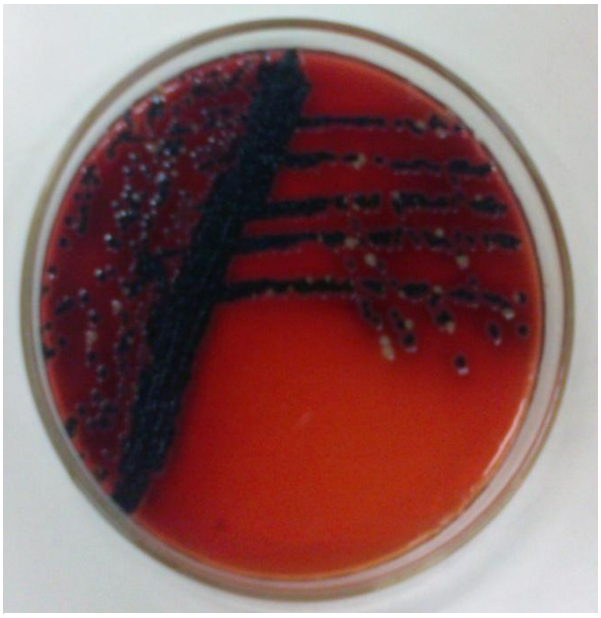


Figura 3 – Placa de Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) com colônias negras, características de *Salmonella* spp.

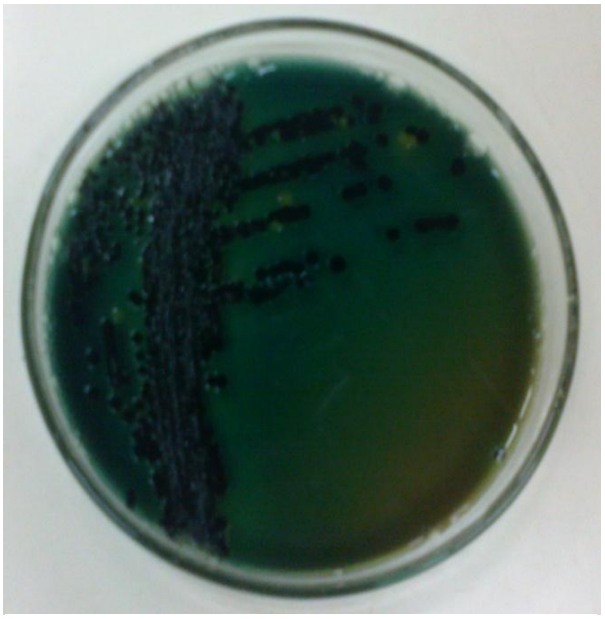


Figura 4 – Placa de Ágar *Hektoen-Enteric (HE)*, com colônias negras, características de *Salmonella* spp.

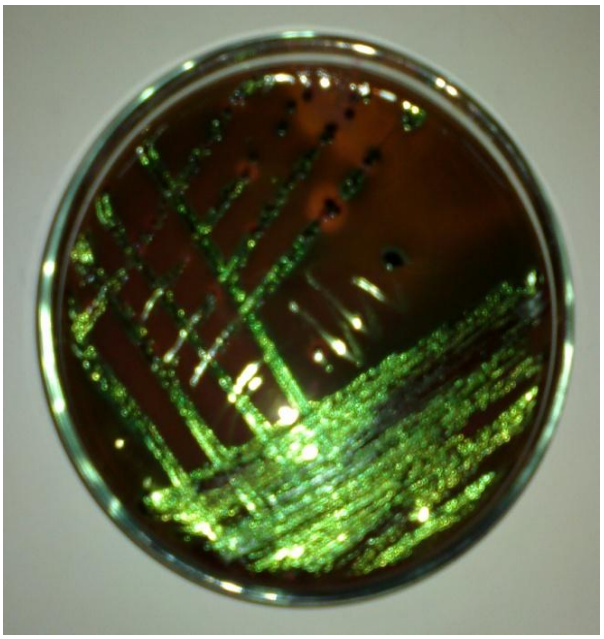


Figura 5 – Placa de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), apresentando colônias mucóides com brilho metálico, características de *Escherichia coli*.

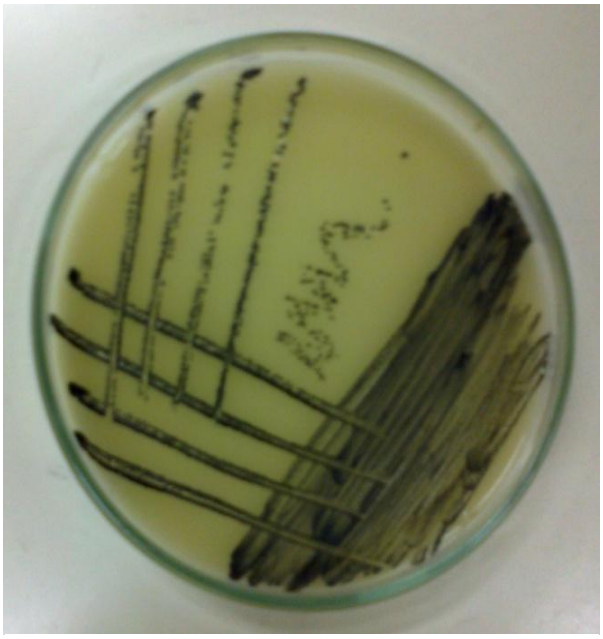


Figura 6 – Placa de Ágar *Baird Parker*, apresentando colônias negras, características de *Staphylococcus* spp.

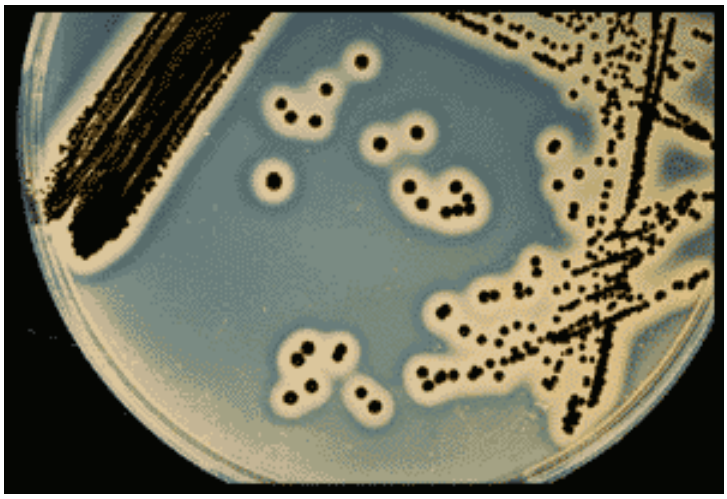


Figura 7 – Placa de Ágar *Baird Parker*, apresentando colônias com halos transparentes, características de *Staphylococcus* coagulase positiva.

Fonte: <http://www.medicine-material.com/A-Dehydrated-Culture-Media/Baird-Parker-Medium-Base-500gm/#.UPTrIB34Iq4>

Tabela 1 – Resultados referentes ao isolamento e identificação de micro-organismos em amostras de frangos, obtidos no período de fevereiro a junho de 2012 em dois estabelecimentos comerciais no município de Pelotas (RS), Brasil.

Amostras	Micro-organismos		
	Escherichia coli	*Salmonella* spp.	*Staphylococcus* coagulase positiva
01 II	X	X	X
02 I	X		X
03 I	X		X
04 II		X	X
05 I			
06 II		X	X
07 I			
08 II		X	X
09 I	X		
10 II	X		X
11 I			X
12 II	X	X	X
13 II	X		X
14 I			X
15 II	X	X	X
16 II	X		X
17 I			X

Tabela 1 - Resultados referentes ao isolamento e identificação de micro-organismos em amostras de frangos, obtidos no período de fevereiro a junho de 2012 em dois estabelecimentos comerciais no município de Pelotas (RS), Brasil.

Amostras	Micro-organismos		
	Escherichia coli	*Salmonella* spp.	*Staphylococcus* coagulase positiva
18 I			X
19 II		X	X
20 I			X

X - Presença do micro-organismo

I - Supermercado
II – Açougue

Verificou-se que dos 33 micro-organismos isolados, 10 (30%) foram oriundos do estabelecimento I, e 23 (70%) do estabelecimento II (Fig. 8). Esses índices de contaminação podem estar relacionados com o local que as amostras são provenientes como açougues e supermercados. Pode-se inferir que o índice foi maior no estabelecimento II (açougue) pelo fato do mesmo apresentar, na maioria das vezes, condições higiênico-sanitárias visivelmente mais precárias do que o estabelecimento I (supermercado), proporcionando melhores condições para o desenvolvimento de micro-organismos. Estas observações vão ao encontro do que foi ressaltado por Panetta (1972), quando afirma que os locais onde são obtidas as amostras, os utensílios usados, a deficiência no processamento de matéria-prima, condições inadequadas de temperatura e manipulação destas carnes vendidas ao varejo influenciam no processo de contaminação dos alimentos.

Por isso, as mãos do manipulador após a lavagem com água e sabonete líquido, com ou sem anti-sepsia, devem estar isentas de micro-organismos patogênicos ou indicadores de contaminação fecal, visto que as mãos são consideradas os principais veículos de transferência de agentes infecciosos (ABERC, 2000; VANZO; AZEVEDO, 2003).

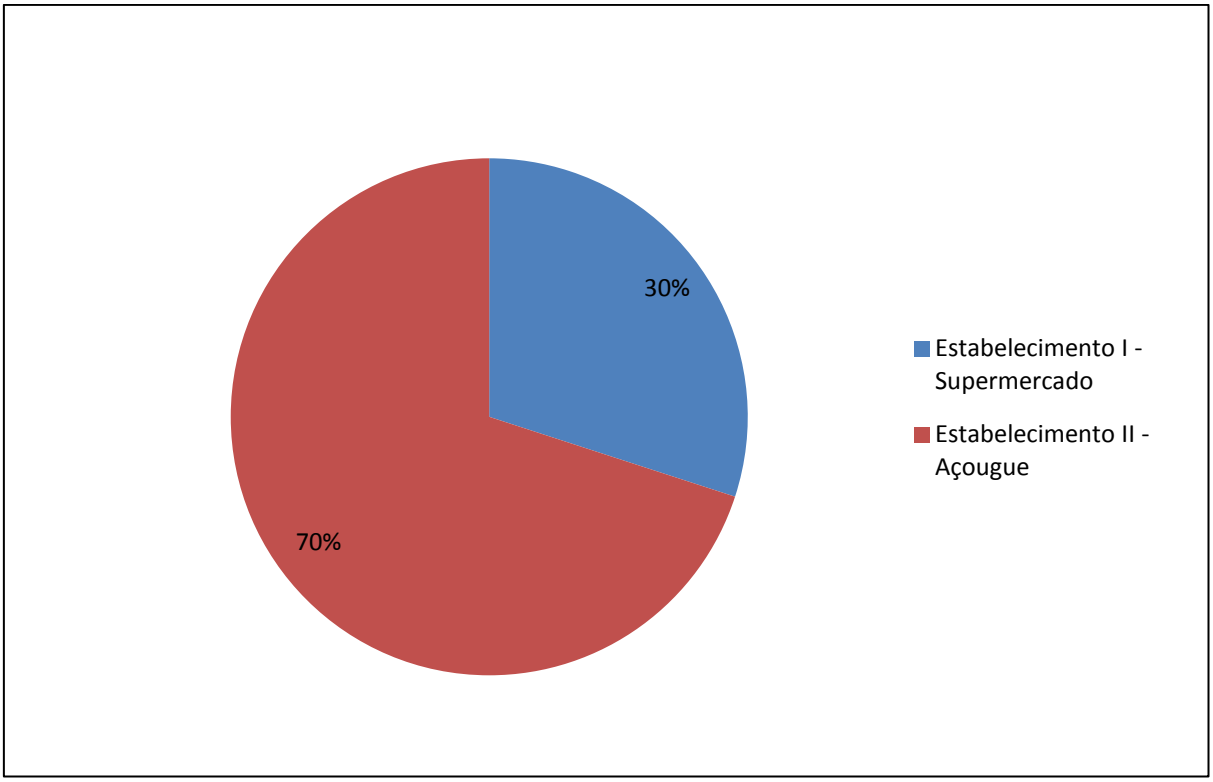


Figura 8 – Distribuição dos micro-organismos encontrados no estabelecimento I e II.

A salmonelose é uma das zoonoses que mais resulta em problemas para a saúde pública em todo o mundo, em virtude da alta endemicidade, morbidade, além da dificuldade no seu controle (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997). Sabendo-se disso, pode-se verificar nos resultados obtidos nesse trabalho que a presença de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas foi elevada, em virtude de todos os riscos que as doenças oriundas desse microrganismo podem causar. Vale ressaltar que as aves situam-se neste contexto, como um dos principais veículos de infecção das salmonelas, propagando-se a outras espécies animais, inclusive ao homem, com relativa facilidade. Este acontecimento ocorre na maioria dos países, devido ao extraordinário crescimento da indústria avícola, dentro de uma visão econômica tipicamente de produção (MORSE; DUNCAN, 1974).

O percentual (35%) encontrado para *Salmonella* spp. no presente trabalho não foi ao encontro dos resultados obtidos por Watson e Brown (1975) e Sharma (1992), que encontraram 24,4% e 14,8% respectivamente. Porém, a literatura também apresenta dados referentes à níveis de contaminação superiores aos encontrados nesta pesquisa, como os descritos por Bernardo e Machado (1989), Tessari, Cardoso e Castro (2003), correspondendo respectivamente a 47% e 19%. O

resultado mais semelhante foi o destacado por Silva, Ramalho e Figueredo (2004), de 43%.

Já a presença de *E. coli* se deu em 45% das amostras analisadas, não corroborando com os resultados encontrados por Silva et al. (2002), onde foram analisados cortes de carne de aves, e constataram que o micro-organismo de maior incidência foi a *E. coli*. Neste caso, o micro-organismo de maior incidência foi o *Staphylococcus* coagulase positiva. Vale salientar que a presença de coliformes está associada à má higiene, seja durante o processamento das matérias-primas e os diversos produtos alimentícios de origem animal, ou até mesmo da água de lavagem utilizada (SIMÕES et al., 2001; BRIGIDO et al., 2004; SALVATORI; BESSA; CARDOSO, 2003; SILVA; ANDRADE; STAMFORD, 2005; SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006). Além disso, fazem parte da microbiota intestinal e podem contaminar a carne durante a evisceração (NOTERMANS; TERBIJHE; VAN SCHOTHORST, 1980).

Na verificação da ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva, constatou-se que 17 (85%) amostras estavam contaminadas. A intensa manipulação que as carnes de frango passam desde a sua manipulação até o consumo final e a qualidade da matéria-prima podem ter sido fatores que influenciaram na detecção do micro-organismo. De acordo com Morot-Bizot, Leroy e Talon (2006), muitas espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva encontradas em amostras de frango estão relacionadas às condições de produção e matérias-primas que as amostras foram submetidas, visto que estes micro-organismos são conhecidos por colonizar superfícies e equipamentos mal higienizados. Além disso, são encontrados naturalmente em cerca de 30 a 50% dos indivíduos (JAY, 1992).

Sendo assim, é de extrema importância que haja comunicação entre o fomento e a indústria, com a inclusão de medidas sanitárias e tecnológicas severas, para que tenham influência significativa sobre a redução da ocorrência desses micro-organismos patogênicos nos alimentos (BERSOT, 2006).

4.2 Atividade antibacteriana

4.2.1 Atividade antibacteriana em meio sólido

Foram aplicados OE de *O. majorana* e *O. vulgare* tanto para a técnica de Difusão em Disco como para a Microdiluição em Caldo em 18 amostras isoladas e identificadas bioquimicamente.

Na tab. 2 (Apêndice A) estão expressos os valores das médias do diâmetro dos halos inibitórios apresentados pelas cepas bacterianas, demonstrando que todas foram inibidas (Fig. 9 e 10), quando expostas aos óleos essenciais, através da técnica de Difusão em Disco. De acordo com Arora e Kaur (1999), o tamanho dos halos inibitórios indica a maior ou menor sensibilidade dos micro-organismos frente aos óleos essenciais.

Foram calculadas médias aritméticas e desvio padrão a partir do tamanho dos halos inibitórios, e constatou-se que o micro-organismo que apresentou a média mais alta, indicando maior sensibilidade em relação aos OE de manjerona e orégano foi *Salmonella* spp., o que não corrobora com alguns estudos que constataram o crescente perfil de resistência desse micro-organismo frente aos agentes antimicrobianos, constituindo-se numa ameaça tanto ao homem como aos animais (VAN DUIJKEREN et al., 2003; BOPP et al., 2003). Em contrapartida, o micro-organismo que apresentou média mais baixa, sendo mais resistente em relação ao OE de manjerona foi *Staphylococcus* coagulase positiva, e *E. coli* ao OE de orégano (tab. 3). Estes resultados não corroboraram com os encontrados por Busatta (2006), que verificou através do método de Difusão em Disco alta sensibilidade para *Staphylococcus* spp. frente aos óleos essenciais de *O. majorana* e *O. vulgare.* Estudos de Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (1998) e Hoferl et al. (2009), detectaram significativa a atividade antimicrobiana do OE de *O. vulgare* frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, principalmente *E. coli*.

Alguns autores defendem que os envolvidos mais freqüentes pela atividade antimicrobiana nos OE sejam os componentes fenólicos, que sensibilizam a bicamada lipídica da membrana celular, modificando a atividade dos canais de cálcio, provocando um aumento na permeabilidade e liberação dos componentes intracelulares vitais. O sistema enzimático do micro-organismo envolvido também pode ser prejudicado, no que tange à produção de energia e síntese de componentes estruturais, assim como a inativação ou destruição do material genético (PORTE; GODOY, 2001). Koyama et al. (1997), complementa que diversos constituintes presentes nos OE se apresentam em diferentes proporções em cada um, e possuem uma função específica para romper ou penetrar na estrutura bacteriana. Para descobrir o modo de ação dos OE seria necessário analisar individualmente cada componente e a combinação entre eles, para verificar se a ação bactericida é desenvolvida por cada componente ou de forma sincronizada.

Sendo assim, pode-se constatar neste estudo que o espectro de ação quanto à formação dos halos de inibição foi maior na presença do óleo essencial de *O. vulgare* do que no de *O. majorana*, podendo-se inferir à eficiência do extrato de orégano em relação ao de manjerona. Segundo estudos de Sivropoulou et al. (1996), *O. majorana* apresenta menor potencial antibacteriano pelo fato de apresentar índices reduzidos de carvacrol e ausência de timol, os quais são compostos majoritários presentes no *O. vulgare*, e responsáveis por sua atividade antibacteriana. Em contrapartida, Cox et al. (2000), afirma que o terpineol, composto majoritário no OE de *O. majorana*, leva à inibição da respiração oxidativa, induzindo a dilatação da membrana, e consequentemente provocando alterações na permeabilidade da membrana celular bacteriana.

Tabela 3 – Valores referentes às médias aritméticas e desvio padrão dos halos inibitórios apresentados pelas cepas bacterianas testadas frente aos óleos essenciais de *Origanum majorana* L. (manjerona) e *Origanum vulgare* L. (orégano).

Micro-organismo	Óleo essencial	Média Aritmética (mm)	Desvio Padrão (mm)
Escherichia coli	*O. majorana*	16,11	4,19
	O. vulgare	26,88	5,51
Salmonella spp.	*O. majorana*	15,28	1,70
	O. vulgare	28,28	9,17
Staphylococcus coagulase positiva	*O. majorana*	14,41	7,39
	O. vulgare	28,17	9,73

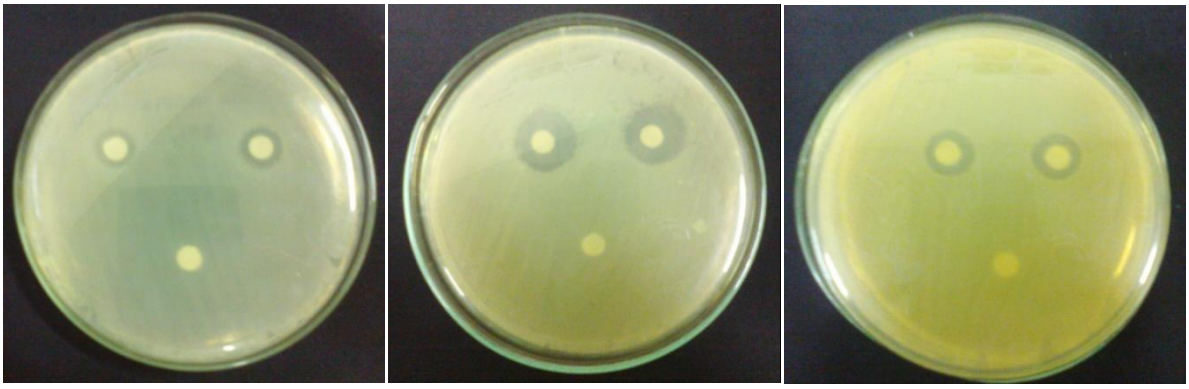


Figura 9 – Halos de inibição apresentados pelo óleo essencial de *Origanum majorana* L. frente à *Salmonella* spp. (A), *Staphylococcus* coagulase positiva (B) e *Escherichia coli* (C).

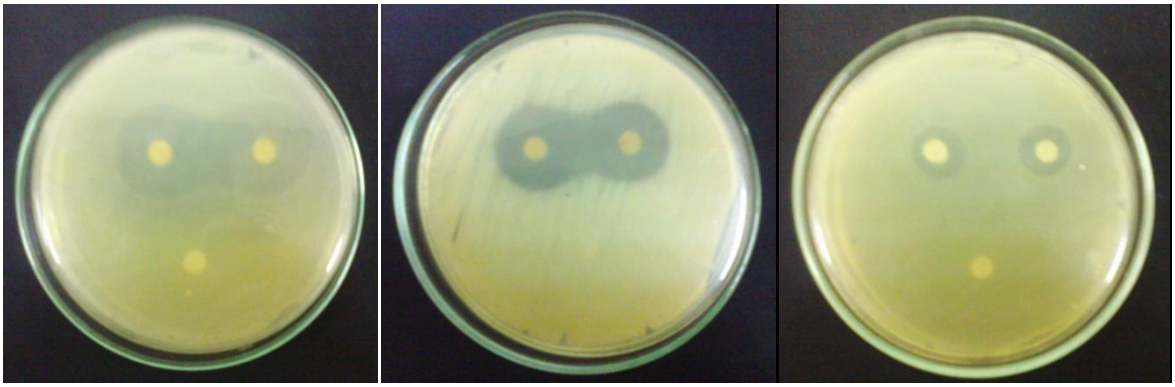


Figura 10 – Halos de inibição apresentados pelo óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente à *Salmonella* spp. (A), *Staphylococcus* coagulase positiva (B) e *Escherichia coli* (C).

4.2.2 Atividade antibacteriana em meio líquido

A partir dos resultados obtidos na técnica de Difusão em Disco, foi realizada a Microdiluição em Caldo com a finalidade de obter a CIM e a CBM. De acordo com Koutsoumanis et al. (1998), a aplicação de OE em alimentos como substâncias antibacterianas é limitada devido à avaliação dos sabores, já que determinadas doses contra micro-organismos podem influenciar na aceitabilidade dos produtos. Em virtude disso, há uma demanda crescente para determinar as CIM dos OE, com a finalidade de atingir um equilíbrio entre a eficácia como agente antibacteriano e aceitabilidade sensorial.

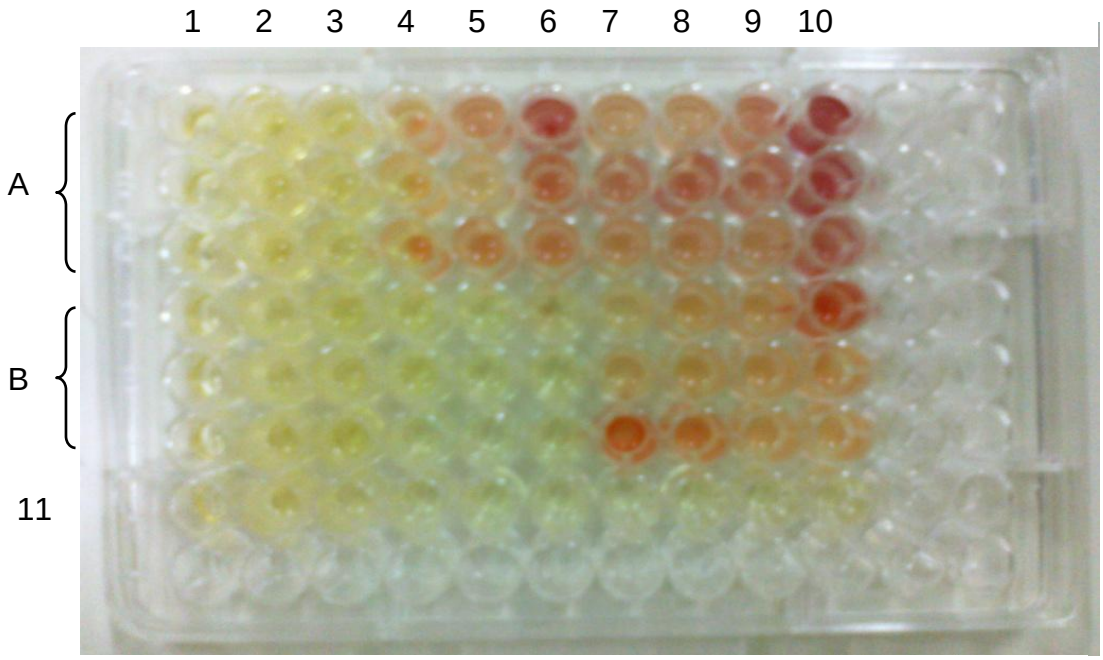
Na tab. 4 (Apêndice B) estão expressos os valores encontrados como CIM e CBM do OE de manjerona. Podemos verificar que o OE de *O. majorana* apresentou

atividade antibacteriana em relação às cepas analisadas (Fig. 11), corroborando com os resultados encontrados por Deans e Svoboda (2006), que em pesquisa sobre o potencial antimicrobiano do OE de *O. majorana* frente a algumas cepas de bactérias e fungos, verificaram poder inibitório sobre bactérias.

Foi calculada a média aritmética da CIM do óleo essencial frente a cada micro-organismo com a finalidade de avaliar a eficácia dos mesmos. Com base nas médias calculadas, pode-se constatar que *Salmonella* spp. foi o micro-organismo mais suscetível ao OE de manjerona. Carvalho, Cruz e Wiest (2005), pesquisaram sobre a atividade antimicrobiana em condimentos na cidade de Porto Alegre – RS, e constataram, nas condições em que o experimento foi submetido, significativa inibição de *Salmonella* spp. frente ao OE de *O. majorana*. Em contrapartida, verificou-se que a cepa *E. coli* mostrou-se mais resistente ao OE (tab. 5), não indo ao encontro dos resultados encontrados por Vagi et al. (2005), que constataram que o OE de *O. majorana* promoveu considerável inibição no crescimento de *E. coli*.

Tabela 5 – Valores referentes às médias aritméticas e desvio padrão da CIM do óleo essencial de *Origanum majorana* L. (manjerona) frente às cepas bacterianas testadas.

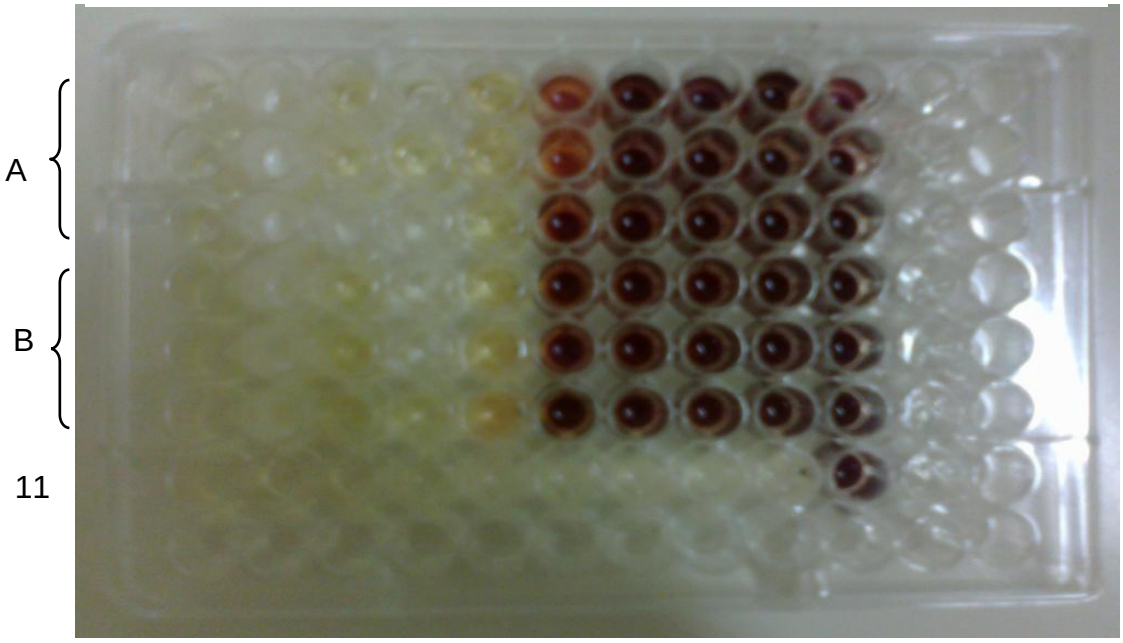
Micro-organismo	Média Aritmética ($\mu L.mL^{-1}$)	Desvio Padrão ($\mu L.mL^{-1}$)
Escherichia coli	36,11	37,07
Salmonella spp.	9,37	8,06
Staphylococcus coagulase positiva	31,61	24,15



1: Meio + T80 – controle negativo de contaminação
2: Meio + inoculo + 200µL.mL^{-1} de óleo essencial
3: Meio + inoculo + 100µL.mL^{-1} de óleo essencial
4: Meio + inoculo + 50µL.mL^{-1} de óleo essencial
5: Meio + inoculo + 25µL.mL^{-1} de óleo essencial
6: Meio + inoculo + 12,5µL.mL^{-1} de óleo essencial
7: Meio + inoculo + 6,25µL.mL^{-1} de óleo essencial
8: Meio + inoculo + 3,125µL.mL^{-1} de óleo essencial
9: Meio + inoculo + 1,562µL.mL^{-1} de óleo essencial
10: Meio + T80 + inoculo – controle positivo
11: Meio + óleo essencial puro – controle de esterilidade do óleo

Figura 11 – Placa de microtitulação mostrando a determinação das concentrações inibitórias mínimas do óleo essencial de manjerona frente à *Staphylococcus* coagulase positiva (A) e *Salmonella* spp. (B).

Na tab. 6 (Apêndice C) estão expressos os valores encontrados como CIM e CBM do OE de orégano. Pode-se constatar que o OE de *O. vulgare* também apresentou atividade antibacteriana em relação às cepas analisadas (Fig. 12).



1: Meio + T80 – controle negativo de contaminação
2: Meio + inoculo + 200µL.mL^{-1} de óleo essencial
3: Meio + inoculo + 100µL.mL^{-1} de óleo essencial
4: Meio + inoculo + 50µL.mL^{-1} de óleo essencial
5: Meio + inoculo + 25µL.mL^{-1} de óleo essencial
6: Meio + inoculo + 12,5µL.mL^{-1} de óleo essencial
7: Meio + inoculo + 6,25µL.mL^{-1} de óleo essencial
8: Meio + inoculo + 3,125µL.mL^{-1} de óleo essencial
9: Meio + inoculo + 1,562µL.mL^{-1} de óleo essencial
10: Meio + T80 + inoculo – controle positivo
11: Meio + óleo essencial puro – controle de esterilidade do óleo

Figura 12 – Placa de microtitulação mostrando a determinação das concentrações inibitórias mínimas do óleo essencial de orégano frente à *Staphylococcus* coagulase positiva (A) e *Salmonella* spp. (B).

A partir das médias aritméticas, pode-se identificar a cepa *Salmonella* spp. como a mais sensível, sendo inibida com menores concentrações do óleo essencial. Pasqua et al. (2005) avaliou a susceptibilidade de micro-organismos de origem alimentar e constatou que o OE de orégano foi mais eficiente contra bactérias Gram-negativas, em especial, *Salmonella* spp. na concentração de 0,04% de óleo. Em estudos de Tassou, Koutsoumanis e Nychas (2000), o OE de orégano foi menos eficiente sobre os micro-organismos testados, com exceção de *Salmonella* spp., indo ao encontro dos resultados obtidos neste trabalho.

Em compensação, verificou-se que *E. coli* mostrou-se mais resistente ao óleo (tab.7). Burt e Reiders (2003) constataram que um minuto seria suficiente para a cepa de *E. coli* ser inviabilizada na concentração de 0,625µL/mL^{-1}, em relação ao

grupo controle. Portanto, esses resultados não corroboram com os encontrados neste trabalho, já que a média aritmética da CIM em relação à *E. coli* foi de 36,80µL.mL^{-1}, o que pode ser justificado pelo fato das condições de cultivo entre os trabalhos terem sido diferentes, assim como o meio de cultivo utilizado.

Lambert, Skandamis e Coote (2001), alegam que determinadas quantidades de timol e carvacrol quando combinadas podem desencadear a inibição total de *Staphylococcus aureus*, correspondendo à ação do OE de orégano. Porém, isso não foi verificado no presente trabalho visto que a média aritmética referente à CIM do OE de orégano frente à *Staphylococcus* coagulase positiva foi de 22,42µL.mL^{-1}, ou seja, não foi inibida totalmente. Vale ressaltar que alguns fatores podem influenciar nos valores da CIM, como por exemplo: crescimento microbiano, temperatura, taxa de oxigênio, tempo de incubação, concentração que as substâncias foram testadas, quantidade de emulsificador, entre outros (RIOS; RECIO, 2005; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

Tabela 7 – Valores referentes às médias aritméticas e desvio padrão da CIM do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) frente às cepas bacterianas.

Micro-organismo	Média Aritmética (µL.mL^{-1})	Desvio Padrão (µL.mL^{-1})
Escherichia coli	36,80	38,45
Salmonella spp.	16,07	16,77
Staphylococcus coagulase positiva	22,42	24,61

Muitos estudos relatam que as bactérias gram-negativas são menos suscetíveis aos OE do que as gram-positivas. Isso devido, provavelmente, à constituição da membrana externa. Os OE podem ter dificuldades em se difundir pela membrana externa das bactérias gram-negativas, devido à presença de uma barreira hidrofílica que acaba dificultando a passagem de macromoléculas e alguns componentes hidrofóbicos (JANSSEN; SCHEFFER; BAERHEIM, 1987; SHAPIRO;

MEIER; GUGGENHEIM, 1994; HELANDER et al.,1998; VELICKOVIC et al., 2002; KALEMBA; KUNIKA, 2003; TEPE et al., 2004). Porte e Godoy (2001) também seguem a mesma linha de resultados, constatando que as bactérias gram-positivas apresentam maior sensibilidade aos OE de especiarias do que as bactérias gram-negativas. No presente trabalho, *E. coli* que é uma bactéria gram-negativa, apresentou a maior média aritmética em relação à CIM, revelando um perfil de resistência frente aos OE testados. Porém, *Salmonella* spp. também é uma bactéria patogênica gram-negativa e apresentou a menor média aritmética em relação à CIM, ou seja, mostrando-se mais sensível frente aos OE testados. Estes resultados vão ao encontro dos estudos de Burt (2004), onde relata que bactérias gram-positivas têm sido igualmente ou menos sensíveis que bactérias gram-negativas quando expostas aos OE.

Burt (2004), também relata que o alto teor de gordura presente nos produtos cárneos provoca uma redução da ação dos OE, e consequentemente baixa ação antimicrobiana contra patógenos existentes em carnes contaminadas, podendo estar relacionado à lipossolubilidade dos OE em relação às partes aquosas dos alimentos.

5 Conclusões

Com base nos dados obtidos, pode-se constatar que houve contaminação bacteriana em 90% das amostras analisadas, prevalecendo a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em 85% das amostras. Já *E. coli* e *Salmonella* spp. foram identificadas, respectivamente, em 45% e 35% das amostras.

Com relação à atividade antibacteriana, os OE de *O. majorana* e *O. vulgare* apresentaram atividade contra todas as cepas bacterianas testadas, observada tanto pela técnica de Difusão em Disco como na Microdiluição em Caldo. Estes dados sugerem, nas condições desenvolvidas neste trabalho, a possibilidade de utilização dos óleos essenciais de orégano e manjerona como possíveis alternativas na substituição de conservadores químicos em alimentos e/ou no desenvolvimento de novos fármacos naturais.

Referências

ABERC. **Manual ABERC de práticas de elaboração e serviço de refeições para coletividades.** 8.ed. São Paulo: Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas, 2003. 288p.

ABRAHÃO, P. **Ocorrência de *Listeria monocytogenes* e de outros microrganismos em gelados comestíveis fabricados e comercializados na região metropolitana de Curitiba, Paraná.** 2005. 123f. Tese (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia)–Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ARANGO, A.; SÁNCHEZ, J.; GALVIS, L. Productos naturales com actividad antimicótica. **Revista Española de Quimioterapia**, v.17, n.4, p.325-331, 2004.

ARORA, S.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobials Agents**, v.12, n.3, p.257-262, 1999.

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. **Diseases of poultry:** Colibacillosis. 11.ed. Ames: Iowa States University Press, 2003. 656p.

BAYDAR, H.; OZKAN, G. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v.15, n.3, p.169-172, 2004.

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

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI M. **Doença das aves.** 1.ed. Campinas: FACTA, 2009. 800p.

BERNARDO, M. A.; MACHADO, C. C. Prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango em Portugal. Perspectiva epidemiológica em humanos. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v.84, n.489, p.31-45, 1989.

BERSOT, L. S. *Salmonella* no Brasil: Sua importância no abate das aves. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 5., 2006. Santa Maria. **Anais do Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM**. Santa Maria: UFSM, 2006. p.90-94.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente

a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n.3, p.80-83, 2005.

BLANCO, R. A.: Manjerona. Disponível em: <www.jardimdeflores.com.br> Acesso em: 10 out. 2011.

BLOOD, R. M.; JARVIS, B. Chilling of poultry: the effects of process parameters on the level of bacteria in spinchiller waters. **Journal of Food Technology**, v.9, n.2, p.157-169, 1974.

BOPP, C. A. et al. **Manual of clinical microbiology:** *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*. 8.ed. Washington: ASM, 2003. 914p.

BRIGIDO, M.; FREITAS, S.; MAZON, A.; PISANI, B.; PRANDI, G.; PASSOS, R. Queijo Minas Frescal: avaliação da qualidade e conformidade com a legislação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.63, n.2, p.177-85, 2004.

BRYAN, F. L. Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. **Journal Food Protection**, v.51, n.8, p.663-673, 1998.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.233-253, 2004.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antimicrobial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, n.3, p.162-167, 2003.

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

CARVALHO, H. C.; CRUZ, F. T.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.7, n.3, p.25-32, 2005.

CHERNAKI-LEFFER, M.; BIESDORF, M.; ALMEIDA, M.; LEFFER, B.; VIGNE, F. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4, n.3, p.243-247, 2002.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, R. M.; SCHUCH, L. D.; RODRIGUES, M. R.; MEIRELES, M. C.; MELLO, J. R. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix schenckii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia***,* v.60, n.2, p.513-516, 2008.

CLEMENTE, M. das G.; VALLE, H. P.; ABREU, L. R. *Staphylococcus* em queijos fabricados com leite cru e pasteurizado. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, n.105, p.38-39, 2003.

COX, S. D.; MANN, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTN, J. R.; WYLLIC, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology***,* v.88, n.1, p.170–175, 2000.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C.; STAMFORD, T. *Staphylococcus* enterotoxigênico em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.3, p.263-271, 2002.

DEANS, S. G.; SVOBODA, K. P. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) Volatile Oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 5, n. 3, p. 187-190, 2006.

DI PASQUA, R.; DE FEO, V.; VILLANI, F.; MAURIELLO, G. In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbanaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. **Annals of Microbiology**, v.55, n.2, p.139-143, 2005.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.2, p.308-316, 2000.

FELTROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de Medicina alternativa para o profissional de saúde**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 743p.

FLORICULTURA WINGE. Disponível em: <http://www.floriculturawinge.com.br/temperos_ervas.html> Acesso em: 01 jan. 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION-FAO. Statistical Databases. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 07 out. 2011.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 1996, 182p.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003, 182p.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira Farmacognosia***,* v.15, n.2, p.178-182, 2005.

GOULD, G. W. Industry perspective on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.1, p.82-86, 1996.

HAMMER, K. A.; CARSON C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and others plants extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, n.6, p.985-990, 1999.

HELANDER, I. M.; ALKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.9, p.3590–3595, 1998.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.; Dos REIS, E. Prevalência de sorovares de Salmonella isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.55-62, 1997.

HÖFERL, M.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; SCHIMIDT, E.; STOYANOVA, A.; ZAPRIANA, D.; SLAVCHEV, A.; GEISSLER,M. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, n.2, p.459-464, 2009.

HOLEY, R.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oil and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v.22, n.4, p.273-292, 2005.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. Aromatic natural raw materials – Vocabulary. **ISO 9235:1997**. Genebra, 1997.

JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J.; BAERHEIM, S. A. Antimicrobials activities of essential oils. **Pharmaceutics Week Iad***,* v.9, n.4, p.193-197, 1987.

JAY, J. M. Microbiological food safety. **Critical Reviews Food Science Nutritional**, v.31, n.3, p.177-190, 1992.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, n.10, p.813-829, 2003.

KAUBIC. Disponível em: <http://kaubic.in/spicesdatabase/Oregano/soils.htm> Acesso em: 01 jan. 2013.

KNÖBL, T.; GOMES, T.; VIEIRA, A.; BOTTINO, A.; FERREIRA, P. Occurrence of adhesion-encoding operons in *Escherichia coli* isolated from breeders with salpingitis and chicks with omphalitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.2 , p.140-143, 2006.

KONEMAN, E.; ALLEN, S.; JANDA, D. **Diagnóstico microbiológico**–texto e atlas colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2001. 1465p.

KOUTSOUMANIS, K.; TASSOU, C.; TAOUKIS, P.; NYCHAS, G. Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on Salmonella enteritidis as a function of concentraction, temperature and pH, using conductance measurements. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, n.6, p.981-987, 1998.

KOYAMA, S., YAMAGUCHI, Y., TANAKA, S., MOTOYASHIMA, J. A new substance (yoshixol) with na interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanase traditional tree (kisohinoki), Chamaecyparis obtusa. **General Pharmacology**, v. 28, n.5, p. 797-804, 1997.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal Applied Microbiology**, v.91, n.3, p.453-462, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MAIA, S.; FERREIRA, A.; ABREU, L. Uso de Açafrão (*Curcuma longa* L.) na redução da *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota. **Ciência agrotécnica** [de] Lavras, v.28, n.2, p.358-365, 2004.

MEDICINE-MATERIAL. Disponível em: <http://www.medicine-material.com/A-Dehydrated-Culture-Media/Baird-Parker-Medium-Base-500gm/#.UPbMpB34Iq5> Acesso em: 09 jan. 2013.

MICHAEL, S.; DUC, V.; KATHLEEN, K.; RUTHANNE, M.; VALERIE, D.; BARBARA, D.; BELETSHACHEW, S.; JAMES, H.; OLGA, H.; FREDERICK, A. Consumption of risky foods among adults at high risk for severe foodborne diseases: room for improved targeted prevention messages. **Journal of Food Safety**, v.27, n.2, p.219-232, 2007.

MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; DEL VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **Lebensm Wiss Techno**, v.38, n.5, p.565-570, 2005.

MOROT-BIZOT, C.; LEROY, S.; TALON, R. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n.2, p.210-210, 2006.

MORSE, E. V.; DUNCAN, M. A. Salmonellosis an environmental health problem. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.165, n.11, p.1015-1019, 1974.

MPOUNTOUKAS, P.; VANTARAKIS, A.; SIURIDIS, E.; LIALIARIS, T. Cytogenetic study in culture human lymphocytes treated with three ommonly used preservatives. **Food Chemical Toxic**, v.46, n.7, p.2390-2393, 2008.

NADVORNY,A.; FIGUEIREDO, M.; SCHMIDT, V., Ocorrência de Salmonella sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.1, p.47- 51, 2004.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved standard M7-A6, 2003.

NOTERMANS, S.; TERBIJHE, J.; VAN SCHOTHORST, M. Removing faecal contamination of broilers by spraycleaning during evisceration. **British Poultry Science**, v.21, n.2, p.115-121, 1980.

OKA. C.; ROPERTO, A. Disponível em: <www.cotianet.com.br/jornalatuante/mat071.htm>. Acesso em: 07 out. 2011.

PANETTA, J. C. Bacteriologia dos alimentos. **Atualidades Veterinárias**, v.1, n.1, p.12-14, 1972.

PIPER, P. W.; THOMPSN, S.; PANDAJAINT, R.; HOLYOAK, C.; EGNER, R.; MUHLBAUER, M.; COOTE, P.; KUCGLER, R. The Pdr12 ATP-binding cassete ABC required for the development of weak acid resistence in *Sacharomyces cerevisae*. **EMBO Journal**, v.17, n.15, p.173-181, 1998.

PORTE, A.; GODOY, O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **Boletim do Ceppa**, v.19, n.2, p.193-210, 2001.

POZZATTI, P. **Suscetibilidade de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao Fluconazol frente a óleos essenciais extraídos de condimentos**. 2007. 148f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

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

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1, p.80-84, 2005.

RODRIGUES, M. R. A.; CARAMÃO, E. B.; ZINI, P. P. Estudos dos óleos essenciais de Manjerona e de orégano cultivados no Rio Grande do Sul. Disponível em: <www.sbq.org.br/ranteriores/23/resumos/0622/>. Acesso em: 10 out. 2011.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control,** v.15, n.7, p.549-557, 2004.

SALVATORI, R. U.; BESSA, M. C.; CARDOSO, R. I. Qualidade sanitária de embutidos coletados no mercado público central de Porto Alegre-RS. **Ciência Rural**, v.33, n.4, p.771-773, 2003.

SANTOS, L. M. Avaliação microbiológica de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes industriais da cidade de Belo Horizonte. **Revista Higiene Alimentar**, v.11, n.40, p.26-30, 1997.

SANTOS, R.; NASCIMENTO, P.; OLIVEIRA, D.; FLORES, L.; PONTES,A.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, P.; LOPES, F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.29, n.2, p.87-92, 2001.

SHAPIRO, S.; MEIER, A.; GUGGENHEIM, B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacterias. **Oral Microbial Immunology**, v.9, n.4, p.202-208, 1984.

SHARMA, V. D. *Salmonella* contamination of foods of animal origin. In: *SALMONELLA* AND SALMONELLOSIS SYMPOSIUM, 1992. Ploufragan. **Anais do *Salmonella* and Salmonellosis Symposium.** Ploufragan: França, 1992. p. 137-138.

SHELEF, L. A.; JYOTHI, E. K.; BULGARELLI, M. A. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. **Journal of Food Science**, v.49, n.3, p.737-740, 1984.

SILVA, M. L. N.; FREITAS, P. L.; BLANCANEUAX, P.; CURI, N.; LIMA, J. M. Relação entre parâmetros da chuva e perdas de solo e determinação da erodibilidade de um Latossolo Vermelho-Escuro em Goiânia (GO). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21, n.1, p.131-137, 1997.

SILVA, J. A.; AZERÊDO, G. A.; BARROS, M. R.; COSTA, E. L.; FALCÃO, M. S. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.100, p.97-101, 2002.

SILVA, C. D.; RAMALHO, L. S.; FIGUEREDO, E. T. *Salmonella* spp. em ovos e carcaças de frangos “in natura” comercializados em Maceió, AL. **Higiene Alimentar**, v.18, n.121, p.80-84, 2004.

SILVA, G. M.; ANDRADE, A. C.; STAMFORD, L. M. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e outros parasitas em hortaliças consumidas in natura, no Recife. **Ciência da Saúde Coletiva**, v.10, n.2, p.63-69, 2005.

SILVA, A.; SILVA, D. da. Escherichia coli enteropatogênica (epec) ao contrário da Escherichia coli comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n.3, p.175-196, 2005.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45ºC e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.352-359, 2006.

SILVA, M.; GONDIM, A.; NUNES, I.; SOUSA, F. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* L. sobre bactérias orais lanctônicas. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p.724, 2008.

SIMÕES, M.; PISANI, B.; MARQUES, L.; PRANDI, G.; MARTINI, H.; CHIARINI, T. Hygienic-sanitary conditions of vegetables and irrigation water from kitchen gardens in the municipality of Campinas, SP. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.331-333, 2001.

SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and citotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.5, p.1202-1205, 1996.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology,** v.26, n.2, p.118-122, 1998.

SOUZA, A. S.; AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. – Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.6, p.429-433, 2000.

SOUZA, E. L. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Revista Higiene alimentar,** v.17, n.113, p.38-42, 2003.

STANGARLIN R, J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controles alternativos de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.2, n.11, p.16-21, 1999.

TASSOU, C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, J. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International**, v.33, n.3, p.273-280, 2000.

TEPE, B.; DONNEY, E.; UNLU, M.; CANDAN, F.; DAFERRERA, D.; UNLU, V.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Antimicrobial and oxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *S. cryptanha* (Montbret at Aucher ex Benth.) *S. multicaulis* (Vahl.). **Food chemistry**, v.84, n.4, p.519-525, 2004.

TESSARI, N. C.; CARDOSO, S. P.; CASTRO, G.M. Prevalência de *Salmonela* Enteritidis em carcaças de frango industrialmente processadas. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, n.107, p.52-55, 2003.

VAGI, E.; SIMÁNDI, B.; SUHAJDA, A.; HETHELYI, E. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtaind with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. **Food Research International**, v.38, n.1, p.51-57, 2005.

VAN DUIJKEREN, E.; WANNET, B.; HOUWERS, J.; VAN PELT, W. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.8, p.3574–3578, 2003.

VANZO, S. P.; AZEVEDO, V. P. Detecção de *S. aureus* em manipuladores de alimentos: perfil de resistência a antibióticos e quimioterápicos. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, n.104, p.122-144, 2003.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade Antimicrobiana *in vitro* de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1**,** p.159-163, 2004.

VELICKOVIC, D. T.; RANDJELOVIC, N. V.; RISTIC, M. S.; SMELCEROVIC, A. A.; VELICKOVIC, A. S. Chemical composition and antimicrobial action of the ethanol

extracts of *S. pratensis* L. *S. glutinosa* L. *S. aethiopis* L. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.67, n.10, p.639-646, 2002.

WATSON, W. A.; BROWN, J. M. *Salmonella* infection and meat hygiene: poultry meat. **Veterinary Record**, v.96, n.16, p.351-353, 1975.

WHO - World Health Organization. Disponível em: <http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/74417/E82161.pdf> Acesso em: 19 set. 2011.

Apêndices

APÊNDICE A – Tabela referente aos resultados encontrados por meio da técnica de Difusão em Disco frente aos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Origanum majorana*

Tabela 2 – Valores referentes aos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Origanum majorana* L. (manjerona) e *Origanum vulgare* L. (orégano) frente às cepas bacterianas testadas através da técnica de Difusão em Disco.

Amostra	Micro-organismo	Óleo essencial	Halo inibitório (mm)
01	*Escherichia coli*	*O. majorana*	12
		O. vulgare	15
	Salmonella spp.	*O. majorana*	12
		O. vulgare	15
	Staphylococcus coagulase positiva	*O. majorana*	16
		O. vulgare	32
02	*Escherichia coli*	*O. majorana*	13
		O. vulgare	25
	Staphylococcus coagulase positiva	*O. majorana*	12
		O. vulgare	24
03	*Escherichia coli*	*O. majorana*	11
		O. vulgare	29
	Staphylococcus coagulase positiva	*O. majorana*	7
		O. vulgare	33
04	*Salmonella* spp.	*O. majorana*	17
		O. vulgare	36

Tabela 2 - Valores referentes aos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Origanum majorana* L. (manjerona) e *Origanum vulgare* L. (orégano) frente às cepas bacterianas testadas através da técnica de Difusão em Disco.

Amostra	Micro-organismo	Óleo essencial	Halo inibitório (mm)
04	*Staphylococcus* coagulase positiva	*O. majorana*	9
		O. vulgare	46
06	*Salmonella* spp.	*O. majorana*	16
		O. vulgare	43
	Staphylococcus coagulase positiva	*O. majorana*	13
		O. vulgare	50
08	*Salmonella* spp.	*O. majorana*	15
		O. vulgare	22
	Staphylococcus coagulase positiva	*O. majorana*	14
		O. vulgare	24
09	*Escherichia coli*	*O. majorana*	23
		O. vulgare	24
10	*Escherichia coli*	*O. majorana*	16
		O. vulgare	28
	Staphylococcus coagulase positiva	*O. majorana*	17
		O. vulgare	31
11	*Staphylococcus* coagulase positiva	*O. majorana*	13
		O. vulgare	33

Tabela 2 - Valores referentes aos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Origanum majorana* L. (manjerona) e *Origanum vulgare* L. (orégano) frente às cepas bacterianas testadas através da técnica de Difusão em Disco.

Amostra	Micro-organismo	Óleo essencial	Halo inibitório (mm)
12	*Escherichia coli*	*O. majorana*	14
		O. vulgare	31
	Salmonella spp.	*O. majorana*	15
		O. vulgare	26
	Staphylococcus coagulase positiva	*O. majorana*	41
		O. vulgare	35
13	*Escherichia coli*	*O. majorana*	17
		O. vulgare	33
	Staphylococcus coagulase positiva	*O. majorana*	8
		O. vulgare	25
14	*Staphylococcus* coagulase positiva	*O. majorana*	13
		O. vulgare	22
15	*Escherichia coli*	*O. majorana*	22
		O. vulgare	32
	Salmonella spp.	*O. majorana*	15
		O. vulgare	30
	Staphylococcus *coagulase positiva*	*O. majorana*	12
		O. vulgare	28

Tabela 2 - Valores referentes aos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Origanum majorana* L. (manjerona) e *Origanum vulgare* L. (orégano) frente às cepas bacterianas testadas através da técnica de Difusão em Disco.

Amostra	Micro-organismo	Óleo essencial	Halo inibitório (mm)
16	*Escherichia coli*	*O. majorana*	17
		O. vulgare	25
	Staphylococcus coagulase positiva	*O. majorana*	13
		O. vulgare	16
17	*Staphylococcus* coagulase positiva	*O. majorana*	15
		O. vulgare	29
18	*Staphylococcus* coagulase positiva	*O. majorana*	15
		O. vulgare	17
19	*Salmonella* spp.	*O. majorana*	17
		O. vulgare	26
	Staphylococcus coagulase positiva	*O. majorana*	16
		O. vulgare	17
20	*Staphylococcus* coagulase positiva	*O. majorana*	11
		O. vulgare	17

APÊNDICE B - Tabela referente aos resultados encontrados por meio da técnica de Microdiluição em Caldo frente ao óleo essencial de *Origanum majorana*

Tabela 4 - Valores referentes à CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) do Teste de Microdiluição em Caldo utilizando o óleo essencial de *Origanum majorana* L. (manjerona).

Amostra	Micro-organismo	Classificação por Gram	CIM ($\mu L.mL^{-1}$)	CBM ($\mu L.mL^{-1}$)
01	*Escherichia coli*	-	25	> que a concentração máxima testada
	Salmonella spp.	-	3,125	> que a concentração máxima testada
	Staphylococcus coagulase positiva	+	12,5	25
02	*Escherichia coli*	-	6,25	6,25
	Staphylococcus coagulase positiva	+	100	> que a concentração máxima testada
03	*Escherichia coli*	-	100	> que a concentração máxima testada
	Staphylococcus coagulase positiva	+	50	100
04	*Salmonella* spp.	-	6,25	100
	Staphylococcus coagulase positiva	+	25	100

Tabela 4 - Valores referentes à CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) do Teste de Microdiluição em Caldo utilizando o óleo essencial de *Origanum majorana* L. (manjerona)

Amostra	Micro-organismo	Classificação por Gram	CIM ($\mu L.mL^{-1}$)	CBM ($\mu L.mL^{-1}$)
06	*Salmonella* spp.	-	12,5	> que a concentração máxima testada
	Staphylococcus coagulase positiva	+	25	> que a concentração máxima testada
08	*Salmonella* spp.	-	3,125	50
	Staphylococcus coagulase positiva	+	6,25	100
09	*Escherichia coli*	-	6,25	50
10	*Escherichia coli*	-	25	100
	Staphylococcus coagulase positiva	+	25	100
11	*Staphylococcus* coagulase positiva	+	50	100

Tabela 4 - Valores referentes à CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) do Teste de Microdiluição em Caldo utilizando o óleo essencial de *Origanum majorana* L. (manjerona)

Amostra	Micro-organismo	Classificação por Gram	CIM ($\mu L.mL^{-1}$)	CBM ($\mu L.mL^{-1}$)
12	*Escherichia coli*	-	100	100
	Salmonella spp.	-	25	50
	Staphylococcus coagulase positiva	+	50	> que a concentração máxima testada
13	*Escherichia coli*	-	25	100
	Staphylococcus coagulase positiva	+	25	100
14	*Staphylococcus* coagulase positiva	+	25	100
15	*Escherichia coli*	-	12,5	25
	Salmonellla spp.	-	12,5	25
	Staphylococcus coagulase positiva	+	50	> que a concentração máxima testada
16	*Escherichia coli*	-	25	100
	Staphylococcus coagulase positiva	+	50	> que a concentração máxima testada

Tabela 4 - Valores referentes à CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) do Teste de Microdiluição em Caldo utilizando o óleo essencial de *Origanum majorana* L. (manjerona)

Amostra	Micro-organismo	Classificação por Gram	CIM ($\mu L.mL^{-1}$)	CBM ($\mu L.mL^{-1}$)
17	*Staphylococcus* coagulase positiva	+	6,25	50
18	*Staphylococcus* coagulase positiva	+	12,5	100
19	*Salmonella* spp.	-	3,125	> que a concentração máxima testada
	Staphylococcus coagulase positiva	+	12,5	100
20	*Staphylococcus* coagulase positiva	+	12,5	100

- - Gram-negativo
+ - Gram-positivo

APÊNDICE C – Tabela referente aos resultados encontrados por meio da técnica de Microdiluição em Caldo frente ao óleo essencial de *Origanum vulgare*

Tabela 6 - Valores referentes à CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) no Teste de Microdiluição em Caldo utilizando o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano).

Amostra	Micro-organismo	Classificação por Gram	CIM ($\mu L.mL^{-1}$)	CBM ($\mu L.mL^{-1}$)
01	*Escherichia coli*	-	100	> que a concentração máxima testada
	Salmonella spp.	-	50	100
	Staphylococcus coagulase positiva	+	50	100
02	*Escherichia coli*	-	50	100
	Staphylococcus coagulase positiva	+	25	100
03	*Escherichia coli*	-	100	> que a concentração máxima testada
	Staphylococcus coagulase positiva	+	100	> que a concentração máxima testada
04	*Salmonella* spp.	-	25	50
	Staphylococcus coagulase positiva	+	25	50

Tabela 6 - Valores referentes à CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) no Teste de Microdiluição em Caldo utilizando o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano)

Amostra	Micro-organismo	Classificação por Gram	CIM ($\mu L.mL^{-1}$)	CBM ($\mu L.mL^{-1}$)
06	*Salmonella* spp.	-	12,5	25
	Staphylococcus coagulase positiva	+	25	100
08	*Salmonella* spp.	-	3,125	25
	Staphylococcus coagulase positiva	+	12,5	50
09	*Escherichia coli*	-	12,5	50
10	*Escherichia coli*	-	6,25	100
	Staphylococcus coagulase positiva	+	6,25	100
11	*Staphylococcus* coagulase positiva	+	6,25	> que a concentração máxima testada
12	*Escherichia coli*	-	25	50
	Salmonella spp.	-	12,5	50
	Staphylococcus coagulase positiva	+	25	50

Tabela 6 - Valores referentes à CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) no Teste de Microdiluição em Caldo utilizando o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano)

Amostra	Micro-organismo	Classificação por Gram	CIM ($\mu L.mL^{-1}$)	CBM ($\mu L.mL^{-1}$)
13	*Escherichia coli*	-	25	50
	Staphylococcus coagulase positiva	+	50	50
14	*Staphylococcus* coagulase positiva	+	25	100
15	*Escherichia coli*	-	6,25	< que a concentração mínima testada
	Salmonella spp.	-	3,125	6,25
	Staphylococcus coagulase positiva	+	12,5	50
16	*Escherichia coli*	-	6,25	100
	Staphylococcus coagulase positiva	+	12,5	25
17	*Staphylococcus* coagulase positiva	+	6,25	50
18	*Staphylococcus* coagulase positiva	+	6,25	50
19	*Salmonella* spp.	-	6,25	50
	Staphylococcus coagulase positiva	+	6,25	25
20	*Staphylococcus* coagulase positiva	+	6,25	50

- - Gram-negativo
+ - Gram-positivo

Anexos

ANEXO A – Óleo essencial de Manjerona

Florananda Ind e Com de Cosm e Prod Nat Ltda Me
Rua Alvarino G. de Oliveira e Silva, 239 – Bairro Itamaraty
Jaú – SP Cep 17.209-410

CERTIFICADO DE ANÁLISE

CLIENTE: Lisiane Martins Volcão
PRODUTO: OE DE MANJERONA/ Origanum majorana
LOTE: 120239
VALIDADE: 09/2013
QUANTIDADE : 5 ml
DATA 03/04/2012

ITENS CONTROLADOS	RESULTADOS	ESPECIFICAÇÕES
APARÊNCIA	LÍQUIDO LÍMPIDO	LÍQUIDO LÍMPIDO
COR	AMARELO PALHA	AMARELO PALHA A AMARELO ESVERDEADO
IMPUREZAS	ISENTO	ISENTO
ODOR	HERBAL/ CONDIMENTADO	HERBAL/ CONDIMENTADO
DENSIDADE (20ºC)	0,893	0,880 – 0,910
ÍNDICE DE REFRAÇÃO (20ºC)	1,471	1,460 -1,480

OS VALORES ACIMA FORAM DETERMINADOS IMEDIATAMENTE APÓS A FABRICAÇÃO DO PRODUTO. ALTERAÇÕES PODEM SER RESULTADOS DE TRANSPORTES E / OU MANUSEIO INADEQUADO.

ESTOCAGEM: DEVE SER ESTOCADO EM LUGAR FRESCO, MAIS PRÓXIMO POSSÍVEL À 20ºC, SECO, PROTEGIDO DA LUZ, EM RECIPIENTE ORIGINAL BEM VEDADO. A QUALIDADE DEVE SER CHECADA QUANDO ESTOCADO POR MAIS DE 24 MESES.

PRODUTO CONCENTRADO PARA USO RIGOROSO. CORRE RISCOS, NÃO USADO ADEQUADAMENTE.

LAUDO EMITIDO ELETRÔNICAMENTE, DISPENSA ASSINATURA.

"ASPIRE BEM ESTAR... INSPIRE-SE COM BIO ESSENCIA "

ANEXO B – Óleo essencial de Orégano

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química / Colegiado de Extensão
Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

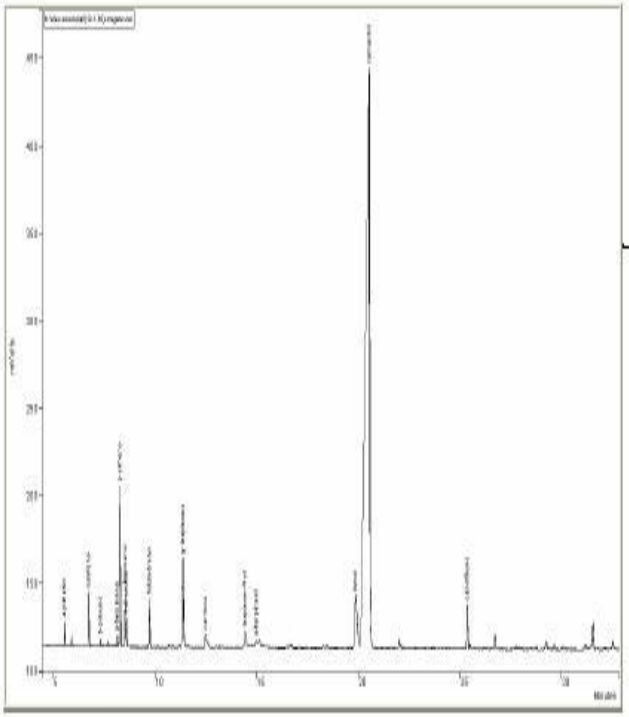
UFMG

CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA. CNPJ: 07.997.093/0001-10

ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

Nome comercial: orégano
Nomenclatura botânica: origanum vulgare
Extração: destilação por arraste a vapor
Método de cultivo: convencional
Parte da planta: folhas
Origem: Brasil



Composição Química:

Pico	Constituinte ID	%
1	α-pineno	0,5
2	canfeno	1,1
3	p-cimeno	4,0
4	limoneno	1,4
5	1,8-cineol	0,7
6	felandreno	1,2
7	γ-terpineno	3,2
8	canfora	0,7
9	terpinen-4ol	0,8
10	α-terpineol	0,2
11	timol	4,3
12	carvacrol	76,5
13	cariofileno	1,5

Obs: Picos menores que 0,1% foram excluídos

Dra. Vany Ferraz
Laboratório de Cromatografia
Departamento de Química – UFMG
vanyferraz@ufmg.br
Belo Horizonte, 07/12/2010

Método de análise:
Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás HP 5890.
Coluna: BP1 30m x 0,25mm (HP). Temp.: Coluna: 50°C (1min), 3°C /min, até 200°C. Injetor: 200°C
Split: 1/50. Detector FID: 220°C. Volume de injeção : 1 ul (conc 1.0 % em clorofórmio)