UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Ciências Biológicas - Bacharelado

Trabalho Acadêmico

Potencial antibacteriano de condimentos frente a isolados de carne moída

Lisiane Martins Volcão

Pelotas, 2013

LISIANE MARTINS VOLCÃO

POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE CONDIMENTOS FRENTE A ISOLADOS DE CARNE MOÍDA.

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

Orientadora: Prof[a] Dr[a] Gladis Aver Ribeiro

PELOTAS, 2013

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

V899p Volcão, Lisiane Martins

Potencial antibacteriano de condimentos frente a isolados de carne moída / Lisiane Martins Volcão. – 77f. : il. color. – Monografia (Conclusão de curso). Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2013. – Orientador Gladis Aver Ribeiro.

1.Biologia. 2.Alecrim. 3.*Salmonella* spp. 4.*Enterococcus* spp.. 4.*Staphylococcus* coagulase positiva. 5.*Escherichia coli*. 6.Manjericão. 7.Sálvia. I.Ribeiro, Gladis Aver. II.Título.

Banca Examinadora

Prof. Drª. Gladis Aver Ribeiro

Prof. Dr. Claiton Leoneti Lencina

Prof. Drª. Daniela Isabel Brayer Pereira

Prof. Drª. Patrícia da Silva Nascente

A minha família

AGRADECIMENTOS

As minhas mães, Mara e Leny, responsáveis pelo que sou hoje.

Ao meu pai, pelo apoio incondicional nestes cinco anos e sempre.

A Josi, prima, amiga e irmã, por me conceder a vinte e cinco anos a maior e mais sincera amizade que eu jamais vou ter igual.

A mana Lizandra, ao Marcelo, Pedro, Deco e Mario por fazerem a minha alegria.

A Profª Gladis, orientadora e a melhor professora que já conheci, pelos ensinamentos e apoio em todas as horas dos meus três anos no laboratório.

A Rosana por ter me ajudado a dar os primeiro passos neste TCC, é admirável a paixão que alguém pode ter pelo que faz. A Mari, Melina, Igor e Anelize por terem feito meu início no laboratório o melhor possível.

A colega de aula e laboratório Juliana, pelo apoio e companhia, dentro e fora do laboratório, durante a realização deste trabalho. A Suzane por sempre me oferecer uma ajuda e por aturar a minha hiperatividade.

Ao Eduardo, por me aguentar sempre incomodando com as revisões dos meus trabalhos, inclusive deste. A ajuda nos detalhes, e principalmente a companhia foram essenciais.

Aos amigos do salão, vocês não fazem idéia do quanto são e foram importantes neste período.

Aos colegas de aula e café, Marcelo, Alexandre, Darlan e Diego. São amigos que eu vou sempre lembrar com enorme carinho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, em especial ao Isaias, indispensável para o funcionamento do mesmo.

A todos os colegas e amigos os quais fizeram, direta ou indiretamente, parte desta trajetória.

“... O mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito curta para ser insignificante...”

(Charles Chaplin)

RESUMO

VOLCÃO, Lisiane Martins. **Potencial antibacteriano de condimentos frente a isolados de carne moída**. 2013. 77f. Trabalho de Graduação - Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A carne moída está entre os alimentos mais frequentemente envolvidos na veiculação de patógenos, sendo um excelente meio para a multiplicação de micro-organismos, devido principalmente, a sua composição e suas características físico-químicas. Dentre os condimentos utilizados na culinária está o manjericão, o alecrim e a sálvia, os quais possuem compostos antimicrobianos e antioxidantes naturais. Neste momento surgem novas perspectivas para que possam atuar como conservadores naturais de alimentos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antibacteriano dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* L. (manjericão), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e *Salvia officinalis* L. (sálvia) através da técnica de difusão em disco e microdiluição em caldo, frente a isolados bacterianos de carne moída obtidas de estabelecimentos comerciais localizados na cidade de Pelotas, RS – Brasil. De um total de 20 amostras analisadas, 45% estavam contaminadas por *E. coli*, em 60% houve presença de *Salmonella* spp., 95% apresentaram contaminação por *Enterococcus* spp. e em 75% foram detectadas *Staphylococcus* coagulase positiva. As cepas que apresentaram maior sensibilidade aos extratos testados através da concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida foram *E. coli* e *Salmonella* spp., com concentrações variando de 3,125 $\mu L.mL^{-1}$ a $100 \mu L.mL^{-1}$. A inibição das bactérias Gram-positivas foi alcançada somente em maiores concentrações dos óleos essenciais. Conclui-se, portanto, que os óleos essenciais apresentam potencial antibacteriano contra patógenos isolados de alimentos.

Palavras-chaves: Alecrim. *Enterococcus* spp. *Escherichia coli*. Manjericão. Sálvia. *Salmonella* spp. *Staphylococcus* coagulase positiva.

ABSTRACT

VOLCÃO, Lisiane Martins. **Antibacterial potential of condiments against isolated from ground beef.** 2013. 77f. Trabalho de Graduação - Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Ground beef is considered one of majors food transmitters more of pathogens, and is an excellent medium for multiplication of microorganisms, mainly due to its composition and physic-chemical characteristics. The spices most used in culinary are basil, rosemary and sage, which have antimicrobials and natural antioxidants compounds, and could act like conservatives natural foods. The objective of this study was to assess the antibacterial potential of *Ocimum basilicum* L. (basil), *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) and *Salvia officinalis* L. (sage) by disk diffusion technique and broth microdiluition, against to bacterial isolates from ground beef obtained of commercial establishments in the Pelotas city, southern, Brazil. From a total of 20 samples analyzed, 45% were contaminated by *E. coli*, 60% showed the presence of *Salmonella* spp., 95% were contaminated by *Enterococcus* spp., and 75% were found coagulase-positive *Staphylococcus*. Strains that showed higher sensitivity to the extracts employed through the minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration were *E. coli* and *Salmonella* spp., with concentrations ranging from 3,125µL.mL^{-1} to 100µL.mL^{-1}. Inhibition of Gram-positive bacteria was achieved only at higher concentrations of essential oils. We concluded that those olis scents presented an antibacterial potential against pathogens isolated from food.

Keywords: Basil. Coagulase-positive *Staphylococcus*. *Enterococcus* spp. *Escherichia coli*. Rosemary. Sage. *Salmonella* spp.

Lista de Tabelas

Tabela 1 Valores das médias aritméticas (mm), desvio padrão, diâmetros máximo e mínimo dos halos inibitórios apresentados pelas cepas bacterianas frente aos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* 44

Tabela 2 Valores das médias aritméticas ($\mu L.mL^{-1}$), desvio padrão, número máximo e número mínimo das concentrações inibitórias mínimas apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as *Salmonella* spp. 47

Tabela 3 Valores das médias aritméticas ($\mu L.mL^{-1}$), desvio padrão, número máximo e número mínimo das concentrações inibitórias mínimas apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente a *Escherichia coli* 48

Tabela 4 Valores das concentrações bactericidas mínimas ($\mu L.mL^{-1}$), apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente a *Escherichia coli* 49

Tabela 5 Valores das concentrações bactericidas mínimas ($\mu L.mL^{-1}$), apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente *Salmonella* spp. 50

Tabela 6 Valores das médias aritméticas ($\mu L.mL^{-1}$), desvio padrão, número máximo e número mínimo das concentrações inibitórias mínimas apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente *Enterococcus* spp. 52

Tabela 7 Valores das concentrações bactericidas mínimas ($\mu L.mL^{-1}$), apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* por *Enterococcus* spp. 53

Tabela 8 Valores das médias aritméticas ($\mu L.mL^{-1}$), desvio padrão, número máximo e número mínimo das concentrações inibitórias mínimas apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente *Staphylococcus* coagulase positiva 55

Tabela 9 Valores das concentrações bactericidas mínimas ($\mu L.mL^{-1}$), apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente *Staphylococcus* coagulase positiva 56

Tabela 10 Valores das médias aritméticas das concentrações mínimas inibitórias ($\mu L.mL^{-1}$), apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e *Enterococcus* spp. 57

Lista de Figuras

Figura 1 Planta de *Ocimum basilicum* (manjericão) 25

Figura 2 Planta de *Salvia officinalis* (sálvia) 25

Figura 3 Planta de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) 25

Figura 4 Esquema da metodologia utilizada na placa de microtitulação para o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) 31

Figura 5 Número de amostras de carne moída contaminadas em açougues e supermercados da cidade de Pelotas-RS 33

Figura 6 Presença de *Salmonella* spp. em amostras de carne moída comercializadas na cidade de Pelotas-RS 34

Figura 7 Placa de Ágar Xilose Lisina Desoxilato, com colônias negras características de *Salmonella* spp. 35

Figura 8 Teste sorológico para confirmação de *Salmonella* spp. Os poços em vermelho indicam positividade do teste devido a aglutinação do inóculo, já o poço circulado em azul indica teste negativo para *Salmonella* spp. 35

Figura 9 Placa de Ágar Baird Parker apresentando colônias negras com halo características de *Staphylococcus* spp. 36

Figura 10 Teste de coagulase livre, com formação de coágulo, para confirmação de *Staphylococcus* coagulase positiva 37

Figura 11 Presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de carne moída na cidade de Pelotas-RS 37

Figura 12 Presença de *Escherichia coli* em amostras de carne moída na cidade de Pelotas-RS 38

Figura 13 Placa de Ágar Eosina Metilene Blue apresentando colônias verdes e brilhantes, características de Escherichia coli 39

Figura 14 Presença de *Enterococcus* spp. em amostras de carne moída na cidade de Pelotas-RS 40

Figura 15 Mudança na coloração dos meios *Streptococcus faecalis* Broth (líquido e sólido), de púrpura para amarelo, indicando cepas suspeitas para *Enterococcus* spp. 40

Figura 16 Valores dos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de

Ocimum basilicum, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Escherichia coli* 42

Figura 17 Valores dos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Salmonella* spp. 42

Figura 18 Valores dos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Enterococcus* spp. 43

Figura 19 Valores dos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva 44

Figura 20 Valores da Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Salmonella* spp. 46

Figura 21 Valores da Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Escherichia coli* 47

Figura 22 Valores da Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Enterococcus* spp. 52

Figura 23 Valores da Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva 54

Lista de Abreviaturas

Tryptic Soy Broth -	TSB
Caldo Lactosado -	CL
Eosina Metilene Blue – Levine -	EMB - lev
Methyl Red Voges-Proskauer -	MRVP
Baird-Parker -	BP
Nutriente Agar -	NA
Brain Heart Infusion -	BHI
Rapapport -	RR
Tetrationato -	TT
Hektoen-Enteric -	HE
Xilose Lisina Desoxilato -	XLD
Lisina Iron Agar -	LIA
Tríplice Sulfur Iron -	TSI
Sulfide Indol Motil -	SIM
Twenn 80 -	TW80
Meio *Streptococcus faecalis* -	SF Broth
Atividade da água -	α_W

Sumário

1. INTRODUÇÃO 15

2. OBJETIVOS 17
2.1 OBJETIVO GERAL 17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 17

3. JUSTIFICATIVA 18

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
4.1 CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR..... 19
4.2 COMÉRCIO PADRÕES DE QUALIDADE DA CARNE 19
4.3 AGENTES DE CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICAS 20
4.3.1 *Salmonella* spp..... 20
4.3.2 *Escherichia coli* 21
4.3.3 *Staphylococcus* coagulase positiva..... 21
4.3.4 *Enterococcus* spp 22
4.4 OLEOS ESSENCIAIS 22
4.4.1 FAMÍLIA Lamiaceae 23
4.4.1.2 *Ocimum basilicum* L. (manjericão), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e *Salvia officinalis* L. (sálvia) 24
4.4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS.. 26

5 METODOLOGIA..... 27
5.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICAS 27
5.1.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE COLETA 27
5.1.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS..... 27
5.1.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli*..... 27

5.1.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA 28
5.1.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* SPP..... 28
5.1.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Enterococcus* SPP 29
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA 29
5.2.1 TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO 29
5.2.2 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA..... 30
5.2.2.1 PREPARO DAS DILUIÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL 30
5.2.2.2 PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO 31
5.2.2.3 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS 31
5.2.3 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA..... 32

6. RESULTADOS 33
6.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA 33
6.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA 41
6.2.1 TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO..... 41
6.2.2 TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO..... 45

7. CONCLUSÃO..... 60

8. REFERÊNCIAS..... 61

ANEXOS..... 70

1 Introdução

A alimentação dentro dos padrões higiênicos satisfatórios é uma das condições essenciais para a promoção e manutenção da saúde. Quando há deficiência deste controle ocorrem os chamados surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), termo utilizado para definir enfermidades causadas pela ingestão de micro-organismos viáveis (infecção) ou toxinas por eles produzidas (intoxicação) em quantidades suficientes para o desenvolvimento de um quadro patológico (ANVISA, 2001).

A capacidade de sobrevivência ou de multiplicação dos micro-organismos os quais estão presentes em um alimento depende de uma série de fatores. Entre eles, estão aqueles relacionados com as características próprias do alimento, os fatores intrínsecos, como sua composição química e atividade da água, e os relacionados com o ambiente em que o alimento se encontra, fatores extrínsecos, como umidade e temperatura (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Com exceção do mel, que deve sua estabilidade principalmente à baixa atividade de água, os alimentos de origem animal são produtos altamente perecíveis (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Os micro-organismos encontrados na carne provêm do próprio animal ou da contaminação durante os processos de abate e processamento tecnológico. Sendo a higiene do animal antes do abate, as condições de higiene dos abatedouros, tempo de exposição a temperatura ambiente, condições de estocagem e distribuição no locais de comercialização, fatores importantes e determinantes a sua qualidade microbiológica (HEUVELINK et al., 2001). A Resolução RDC nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, que dispõem sobre os padrões microbiológicos nos alimentos, exige para carnes *in natura* apenas a ausência de *Salmonella* spp. em 25g de alimento.

A presença de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* neste alimento em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal (ANVISA, 2001). Já a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos tem como finalidade relacionar este micro-organismo à saúde pública, para confirmar

seu envolvimento em surtos de intoxicação alimentar, e para controlar a qualidade higiênico-sanitária nos processos de produção e manipulação de alimentos. Neste último caso, serve como indicador de contaminação pós-processamento ou das condições de sanitização das superfícies que entram em contato com os alimentos (SILVA, 2000).

As técnicas de conservação dos alimentos têm como objetivo principal impedir a deterioração microbiana, aumentando o tempo de “vida-de-prateleira”, impedindo assim, perdas econômicas. Contudo, há ainda preocupação com a saúde pública, impedindo a veiculação de patógenos causadores de doença pelos alimentos (HOBBS; ROBERTS, 1993). Apesar da conservação química dos alimentos imitar as condições de “alimento natural”, esta é ainda uma das questões fundamentais na segurança alimentar (SOUZA; LIMA; NARAIN, 2003). Com isso, torna-se necessário o desenvolvimento de alternativas de conservação para que, aliadas às tecnologias já existentes seja possível disponibilizar para a população alimentos de qualidade e cada vez mais seguros sob o ponto de vista microbiológico e toxicológico (JAY, 2000).

A utilização de plantas aromáticas, possuidoras de óleos essenciais, geralmente tem ação flavorizante, porém a combinação de ervas e condimentos com comprovada ação antibacteriana e antioxidante pode ser utilizada na conservação de alimentos, diminuindo a concentração de aditivos sintéticos nestes produtos (BARA; VANETTI, 1999). Os óleos essenciais são líquidos voláteis, refringentes e de odor característico, que formam-se em um grande número de plantas como subprodutos do metabolismo secundário (ROCHA, 1998). Shelef (1983) descreve condimentos como plantas secas usadas para aromatizar alimentos e bebidas, incluindo folhas como do alecrim e da sálvia; flores e germinações como do cravo-da-índia; bulbos como alho e cebola, rizomas como a asafetida, frutos como a pimenta, cardamomo, bem como outras partes da planta.

O desenvolvimento de métodos de investigação *in vitro* do potencial antimicrobiano dos óleos essenciais que produzam resultados confiáveis e que possam ser reproduzidos e validados é uma tarefa difícil, devido as peculiaridades que os mesmos apresentam, como: volatilidade, insolubilidade em água e complexidade, as quais influenciam os resultados finais (NASCIMENTO et al., 2007). A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais pode ser avaliada através da

determinação de uma pequena quantidade da(s) substância(s) necessária(s) para inibir o crescimento do micro-organismo teste; esse valor é conhecido como a Concentração Mínima Inibitória (CMI), ou através da Concentração Mínima Bactericida (CMB), quantidade da substância necessária para matar o micro-organismo. Um aspecto bastante relevante na determinação da CMI e CBM de extratos vegetais é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Além disso, estudos realizados com óleos essenciais revelam que as quantidades a serem empregadas variam muito conforme o sabor e, além disso, a eficiência relativa muda muito conforme a composição do produto assim como a metodologia utilizada nos testes pode gerar dificuldades na comparação dos resultados obtidos (JAY, 2005).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* L. (manjericão), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e *Salvia officinalis* L. (sálvia), frente a cepas bacterianas isoladas de carne moída proveniente de estabelecimentos comerciais da cidade de Pelotas, RS, Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Isolamento e identificação de bactérias em carne moída;
- Determinar a suscetibilidade das cepas isoladas frente aos óleos essenciais de plantas medicinais como manjericão, sálvia e alecrim;
- Avaliação dos halos inibitórios apresentados pelas cepas bacterianas através da técnica de Difusão em Disco;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB) através da técnica de microdiluição em caldo;

3 Justificativa

Sendo a carne um alimento nobre de fundamental importância na alimentação humana, é de extrema necessidade um rígido controle de qualidade químico e microbiológico da mesma. Com isso, é também muito importante o conhecimento de novas alternativas para a conservação dos produtos cárneos, como o uso de aditivos naturais para aumentar a vida útil dos alimentos.

4 Revisão de literatura

4.1 Contaminação alimentar

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são causadas por agentes, as quais penetram no organismo humano através da ingestão de água ou de alimentos contaminados. Podem ser agentes químicos, como pesticidas, ou biológicos, como micro-organismos patogênicos. Destes o segundo, é a maior causa de enfermidades (NOTERMANS; VERDEGAAL, 1992). Os micro-organismos estão intimamente associados com a disponibilidade, abundância e a qualidade do alimento para consumo humano (CHAN; KRIEG; PELCZAR, 1996).

O fator segurança alimentar cada vez mais se torna uma questão básica nas decisões estratégicas. A segurança alimentar é fundamental para o desenvolvimento de sistemas que promovam a saúde do consumidor. Além de atender as exigências legais, também garantem a qualidade dos alimentos (PIRAGINI, 2005). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), “a alimentação deve ser disponível em quantidade e qualidade nutricionalmente adequadas, além de ser livre de contaminações que possam levar ao desenvolvimento de doenças de origem alimentar”. A contaminação por micro-organismos pode ocorrer em diversas fases do processamento do alimento, frente a isto, são necessárias medidas de controle em todas as etapas do processamento: colheita, conservação, manipulação, transporte, armazenamento, preparo e distribuição do mesmo (BOULOS, 1999).

4.2 Comércio e padrões de qualidade da carne

Em 2008 o Brasil liderou o ranking dos maiores exportadores de carne bovina no mundo, somando o volume de 2,2 milhões de toneladas equivalente carcaça e receita cambial de US$ 5,3 bilhões. Estes valores representam uma participação de 28% do comércio internacional, exportando para mais de 170 países (ABIEC, 2009). Segundo a FAO (*Food Agriculture Organization*) um quinto da população mundial alimenta-se de carne. Por isso, atualmente tem-se a

preocupação de proporcionar um produto mais saudável a população, uma vez que este alimento se caracteriza pela natureza das proteínas que o compõe (PIGATTO; BARROS, 2003). No Brasil, os padrões microbiológicos são seguidos de acordo com o mercado importador, e para o comércio interno os padrões são estabelecidos pela ANVISA, de acordo com a RDC n°12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

O alimento é quem determina qual o micro-organismo é capaz ou incapaz de se desenvolver. Conhecendo então, as características do alimento, pode-se predizer a flora microbiana que nela poderá se multiplicar (SILVA, 2000). A carne fresca, por sua composição química e por sua elevada atividade de água, é um produto altamente perecível. Uma vez que sacrificado o animal, a carne fica exposta à contaminação por uma diversidade de micro-organismos que levam à sua alteração, além do risco da presença de micro-organismos patogênicos (ORDÓÑEZ, 2005). Portanto, é essencial o controle da temperatura ao longo da cadeia de frio, caso contrário pode ocorrer o desenvolvimento microbiano rápido, diminuindo a vida de prateleira do produto e podendo colocar em risco a saúde do consumidor (MASSAGUER, 2005).

4.3 Agentes de contaminação microbiológica

4.3.1 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence a família Enterobacteriaceae e compreende bacilos Gram-negativos não produtores de esporos, são anaeróbios facultativos e capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono (FRANCO; LADGRAF, 2008). Seu habitat normal é o trato intestinal dos seres humanos e de muitos animais. Todas as salmonelas são consideradas patogênicas em algum grau, causando salmonelose, ou gastrenterite por *Salmonella* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Esta bactéria é o principal agente de doenças de origem alimentar em várias partes do mundo (WHO, 2005). O consumo de ovos crus e carne bovina mal passada propicia a transmissão destas bactérias para o homem (SANDERS, 1999). No caso dos manipuladores de alimentos, deve-se considerar que eles possam atuar como transmissores da doença, já que, quando infectados, os seres humanos

podem desenvolver a doença ou tornarem-se portadores, podendo transmitir o micro-organismo, caso as condições de higiene sejam precárias (MARCHI, 2006). Além disso, sabe-se que a exposição da *Salmonella* sp. a ácidos graxos de cadeia curta comumente utilizados como conservadores de alimentos, pode aumentar a virulência da bactéria, por torna–lá mais resistente a acidez gástrica (SATCHER, 2000).

4.3.2 *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria Gram-negativa, não esporogênica. Não demonstra termoresistência, sendo destruída a 60°C, em poucos segundos, mas é capaz de resistir por longo tempo em temperaturas de refrigeração (GERMANO; GERMANO, 2003). Todas as linhagens patogênicas de *E. coli* possuem fímbrias especializadas que permitem que ela se ligue a certas células do epitélio intestinal, além disso elas podem produzir toxinas as quais causam distúrbios gastrintestinais, denominados coletivamente gastrenterite por *E. coli* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Nos processos industriais de abate de bovinos e processamento de carne, são utilizados micro-organismos indicadores de higiene, como aeróbios mesófilos e coliformes (DUFFY et al, 2006). A detecção de coliformes, especialmente *E. coli*, em alimentos processados é uma indicação de contaminação fecal, uma vez que compõem a microbiota intestinal dos animais. Também revelam um controle inadequado do material cru, a contaminação do manipulador envolvido no processo de produção, e por conseqüência a pobre qualidade do produto final (CÂMARA; AMARAL; MULLER, 2002).

4.3.3 *Staphylococcus* coagulase positiva

O gênero *Staphylococcus* pertence a família Micrococaceae, possuindo 32 espécies (SILVA; GRANDA, 2004), são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos e por dividirem-se em planos diferentes, quando vistos ao microscópio, aparecem na forma de cacho de uva (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Dentro deste gênero, o *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias patogênicas mais importantes, uma vez que atua como agente de uma ampla gama de toxinfecções. Em geral, as doenças causadas por este micro-organismo podem ser classificadas como

superficiais, invasivas ou tóxicas, ou ainda apresentar características mistas, tóxicas e invasivas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Devido as semelhanças metabólicas existentes entre as espécies de *Staphylococcus* spp. houve uma mudança na legislação brasileira, a qual passou a estabelecer a pesquisa e enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva ao invés da enumeração de *S. aureus* (SILVA; SOUZA; SOUZA, 2004). A contaminação do alimento por *Staphylococcus* coagulase positiva pode indicar a utilização de equipamentos e materiais inadequadamente higienizados (FRANÇA et al., 2006), além de indicar má higiene por parte do manipulador de alimentos, já que este micro-organismo está presente nas vias nasais, garganta, cabelo e pele de 50% ou mais dos indivíduos saudáveis (FORSTHE, 2002).

4.3.4 *Enterococcus* spp.

Este gênero compreende cocos Gram-positivos, os quais ocorrem isolados, em pares ou formando pequenas cadeias. São anaeróbios facultativos, alguns são móveis e a temperatura ótima de crescimento é de 35 a 37ºC, sendo que muitas cepas apresentam capacidade de multiplicação entre 10 a 45ºC (HARDIE; WHILEY, 1997; DOMING et al., 2003).

O interesse no uso de *Enterococcus* spp. como indicador de higiene e contaminação fecal pode ser justificado pelo fato deste gênero ser geralmente mais tolerante a refrigeração quando comparado a *E. coli* e outros coliformes e parece sobreviver por mais tempo durante a estocagem refrigerada de carcaças de carne (INGHAM; SCHMIDT, 2000). A presença de enterococos no trato gastrointestinal de animais pode levar a contaminação da carne durante o abate. *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies predominantes em diversos tipos de produtos cárneos fermentados ou não (FRANZ et al., 2003; FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006) e encontradas como sendo as principais causadoras de infecções em humanos, estas espécies já foram encontradas em 80-90% e 5-10% dos isolados clínicos, respectivamente (KAYSER, 2003).

4.4 Óleos essenciais

Nas últimas décadas observa-se o grande interesse pelo potencial terapêutico das plantas medicinais (YUNES; PEDROSA; CECHINEL, 2001). Este

fato é comprovado pela evidência, de que hoje, cerca de 30% dos medicamentos prescritas no mundo são obtidas direta ou indiretamente das plantas. Somado a isto, 50% das drogas desenvolvidas no período de 1981 a 2002 foram obtidas de produtos naturais, ou análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais (KOEHN; CARTER, 2005). Um bom exemplo disto são os condimentos, pois contêm vários óleos essenciais com atividade antimicrobiana, tais como o eugenol no cravo e na canela, o timol e isotimol no orégano, e a alicina no alho (FRANCO; LADGRAF, 2008).

Os óleos essenciais são produtos voláteis resultantes do metabolismo secundário das plantas, normalmente formados em células ou grupo de células especializadas, geralmente encontradas nos caules e folhas (HILI; EVANS; VENESS, 2007). A composição dos óleos essencias de plantas é muito complexa, geralmente engloba vários tipos de substâncias (LARCHER, 2000), seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e até compostos com enxofre (SIMÔES; SPITZER, 2003). Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades, conhecidos como constituintes-traços (SIMÕES; SPITIZER, 2003).

4.4.1 Família Lamiaceae

Lamiaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas, e apesar da incerteza quanto ao número de gêneros e de espécies, Souza e Lorenzi (2005) atribuiram a esta 300 gêneros e 7500 espécies.

Esta família é representada por diversas plantas medicinais e condimentares, tais como erva cidreira (*Hyptis* sp.), alfazema (*Lavandula* sp.), cordão-de-frade (*Leonotis* sp.), malvão (*Marrubium* sp.), macaé (*Leonurus* sp.), cordão-de-são-francisco (*Leucas* sp.), hortelã (*Mentha* sp.), manjericão (*Ocimum* sp.), alecrim (*Rosmarinus* sp.), alfava (*Ocimum* sp.), sálvia (*Salvia* sp.) e tomilho (*Thymus* sp.) (LORENZI; MATOS, 2002).

A grande importância econômica da família Lamiaceae deve-se a produção de óleos essenciais nos pêlos e tricomas glandulares (FAHN, 1979).

4.4.1.2 *Ocimum basilicum* L. (manjericão), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Salvia officinalis* (Sálvia)

As três espécies fazem parte da família Lamiaceae. O manjericão (*O. basilicum*) (Fig. 1) também conhecido como alfava, possui ação contra infecções bacterianas e parasitárias. Seu óleo essencial é composto de timol, metil-chevicol, linalol, eugenol e cineol (LORENZI; MATOS, 2002). A sálvia (*S. officinalis*) (Fig. 2) é um condimento com alta atividade antimicrobiana (SHELEF, 1983), apresenta óleo essencial rico em terpenóides como tujona, cineol, cânfora e borneol (LORENZI; MATOS, 2002). O alecrim (*R. officinalis*) (Fig. 3), entre suas propriedades medicinais é conhecida como antiséptica, Santoyo et al. (2005) identificaram 33 compostos químicos do óleo essencial desta planta, entre eles: α-pineno, 1,8-cineol, cânfora, verbenona e bomeol.

Horiuchi et al. (2007) ao testarem o composto efetivo proveniente de *S. officinalis*, o carnasol, obtiveram ótimos resultados sob diferentes linhagens de *E. faecalis*, *E. faecium* e *S. aureus*. Delamare et al. (2007) pesquisou a atividade antibacteriana de duas espécies de sálvia, *S. officinalis* e *S. triloba*, e obteve melhores resultados contra *S. aureus*, *Aeromonas hydrophila* e *E. coli* por parte da segunda espécie citada.

Trajano et al. (2009) ao testarem 10 cepas bacterianas deteriorantes de alimentos, demonstraram baixo espectro de atividade dos óleos essenciais de *O. basilicum* e *R. officinalis*, sendo estes eficientes apenas contra *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Almeida et al. (2010) verificaram a eficácia de *O. basilicum* sob diferentes sorotipos de *E. coli*, e comprovaram a sensibilidade destas cepas frente ao óleo essencial. Derwich et al. (2011) ao verificarem a eficácia in vitro de *R. officinalis* sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus intermedius*, *B. subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Micrococcus luteus* e *Proteus mirabilis*, obtiveram CIMs que variaram de 4 a 48,2µg.mL^{-1}.

Pozzo et al. (2011) verificaram a eficácia antibacteriana dos óleos essenciais de *O. basilicum*, *R. officinalis* e de *S. officinalis* frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina, e demonstraram que frações de compostos isolados como carvacrol, timol e cinamaldeído foram mais ativas do que os óleos essenciais.

Figura 1 – Planta de *Ocimum basilicum* (manjericão)

Fonte: missouriplants.com

Figura 2 – Planta de *Salvia officinalis* (sálvia)

Fonte: plantasonya.com.br

Figura 3 – Planta de *Rosmarinus officinalis* (alecrim)

Fonte: plantdatabase.co.uk

4.4.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

A maior parte da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias e ervas aromáticas parece estar associada com compostos fenólicos (DAVIDSON; NAIDU, 2000) e o efeito está relacionado, principalmente, a alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT; SKANDAMIS; NYCHAS, 2001). Pode haver ainda danos ao sistema enzimático do micro-organismo envolvido na produção de energia e na síntese de componentes estruturais, assim como inativação ou destruição do material genético (KIM; MARSHALL; WEI, 1995).

Um fator importante para validação de um óleo essencial como antimicrobiano é o conhecimento das particularidades de cada micro-organismo, bem como do óleo a ser analisado (NASCIMENTO et al., 2007). Diversos autores sugerem que os testes de atividade antimicrobiana sejam realizados com isolados múltiplos para cada espécie bacteriana testada (HAMMER et al., 2003; CHANG; CHEN; CHANG, 2001; KARAMAN et al., 2001).

5 Metodologia

5.1 Análises microbiológicas

5.1.1 Descrição do local de coleta

As amostragens foram realizadas em diversos estabelecimentos comerciais, entre eles, açougues e supermercados, localizados na cidade de Pelotas, RS, Brasil, sendo os estabelecimentos escolhidos aleatoriamente.

5.1.2 Obtenção e análise das amostras

As coletas foram realizadas no período de março a setembro de 2012, totalizando 20 amostras de carne moída, as quais foram submetidas à pesquisa de *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e *Escherichia coli*.

Logo após a coleta, as amostras mantidas em sua embalagem original e sob condições de refrigeração, foram encaminhadas ao laboratório de Bacteriologia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), para a realização das análises microbiológicas.

Para todas as análises, exceto para o isolamento de *Salmonella* spp. utilizou-se a metodologia baseada em Silva, Junqueira e Silveira (1997) onde se determina pesar 25g da amostra e homogeneizá-la com 225 mL Caldo Tryptic Soy Broth (TSB) e incubá-las a 36ºC por 24h. Para *Enterococcus* spp. o homogeneizado foi feito em água peptonada a 0,1%. Para a identificação de *Salmonella* spp. a homogeneização das amostras foi feita em 225 mL de Caldo Lactosado (CL), e também incubadas por 24h a 36ºC.

Antes de toda e qualquer análise, foram aplicados métodos de assepsia, como desinfecção da bancada e antissepsia das mãos com álcool 70%, além do uso de vidrarias estéreis.

5.1.3 Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

Para a identificação de *E. coli*, foi retirada uma alçada do homogeneizado de TSB e repicado, pela técnica de esgotamento, para placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno - Levine (EMB - Levine), as quais foram incubadas a 36ºC/24-48h. Após o período de incubação, as colônias características (secas com brilho metálico) foram selecionadas, e passadas para Ágar Nutriente para conservação até o momento dos testes bioquímicos: Methyl Red e Voges-Proskauer (MRVP), Ágar Citrato de Simmons e Motilidade, Indol e produção de Ácido Sulfídrico (SIM), de acordo com Konneman et al. (2001).

5.1.4 Isolamento e identificação de *Staphylococcus* coagulase positivo

Para a confirmação do micro-organismo, foi semeada uma alçada da cultura de TSB, em placas de Ágar Baird-Parker (BP) e posteriormente incubadas a 36ºC/48h. Verificou-se a presença de colônias típicas para este micro-organismo, as quais são: circulares, pretas ou cinzas, lisas, convexas, com bordas perfeitas e rodeadas por uma zona opaca ou halo transparente além da zona opaca.

Quando confirmadas as colônias típicas, selecionou-se uma ou mais colônias de cada placa, e em seguida foram semeadas em Ágar Nutriente (NA) e incubadas a 36º/24h, para realização da coloração de Gram e posterior realização da prova de coagulase.

O teste de coagulase foi feito através da transferência do inóculo, pelo método de dispersão, para um tubo contendo 2mL de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e incubados a 36ºC/24h. Retirou-se 1,8mL do inóculo e adicionou-se 0,2ml de coagu-plasma®. Com movimentos de rotação se fez a mistura do meio, sem agitar para não interferir na coagulação. Foram incubadas novamente a 35ºC e a cada hora verificou-se se houve formação de coágulo, por um período de 6h.

5.1.5 Isolamento e identificação de *Salmonella* spp.

Para o isolamento e identificação de *Salmonella* spp., foram pesadas assepticamente 25g de amostra, homogeneizadas em 225mL de CL e incubadas a 36ºC/24h para a recuperação de células injuriadas. Após, uma alíquota da amostra foi inoculada em tubos contendo os meios de enriquecimento seletivo Rapapport (RR), Tetrationato (TT) e novamente incubados a 36ºC/24h. Após este período, alçadas de cada tubo inoculado foram semeadas pelo método de esgotamento em

placas de Ágar Hektoen-Enteric (HE) e Ágar Xilose Lisina Desoxilato (XLD), e incubadas a 36ºC/24h. As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram submetidas a testes bioquímicos em meios Ágar Lisina Ferro (LIA), Ágar Tríplice de Ferro (TSI) e Caldo de Uréia para obtenção de resultados conclusivos, de acordo com Konneman et al. (2001).

Quando houve resultados compatíveis para *Salmonella* spp. nestes testes, as colônias foram submetidas à identificação sorológica com soro anti-salmonela polivalente somático Probac® .

5.1.6 Isolamento e identificação de *Enterococcus* spp.

Após a pesagem de 25g da amostra e homogeneização em Água Peptonada, estas foram incubadas por 24 a 48h a temperatura de 36ºC. Depois deste período, alíquotas da amostra foram transferidas para Caldo SF Broth e incubadas a 36ºC por 24h. Os tubos de Caldo SF que apresentaram reação positiva para *Enterococcus* spp (cor amarela) foram repicados pela técnica de esgotamento para o Ágar SF Broth e incubados a 36ºC por 24-48h.

Frente a colônias características, foram aplicadas provas bioquímicas de acordo com Konnemam et al., 2001 (NaCl 6,5%, Bile esculina, teste SIM, manitol e sacarose).

5.2 Avaliação da atividade antibacteriana

5.2.1 Teste de difusão em disco

A fim de viabilizar a utilização dos óleos essenciais nos testes de potencial antibacteriano, foi realizado um teste preliminar com as espécies bacterianas isoladas da carne moída, através da técnica de difusão em disco, segundo Sahin et al. (2004) utilizando meio Ágar BHI. O inóculo foi feito de acordo com a escala 0,5 de MacFarland, o que corresponde a 1,5 X 10^8 UFC.mL^{-1}, a partir de cultivos bacterianos recentes. Os inóculos foram semeados na superfície dos meios de cultivo com auxilio de swabs estéreis. Sobre as placas contendo o meio de cultura inoculado foram dispostos dois discos de papel filtro estéreis com 6mm de diâmetro (correspondendo a duas repetições do teste por micro-organismo). Os discos de papel foram impregnados com 10µL do óleo essencial a ser testado. Logo as placas foram incubadas a 36ºC/24h e a atividade antimicrobiana determinada pela

ocorrência de um halo de inibição avaliado por medição através de régua milimetrada.

5.2.2 Concentração inibitória mínima

A técnica utilizada para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com a Microdiluição em Caldo proposta pelo NCCLS/CLSI M27-A6 (NCCLS, 2003), com modificações. Foram utilizadas placas de microtitulação estéreis de 96 cavidades. O meio utilizado foi o Caldo BHI (Acumedia®), acrescido de 1% de Tween 80 (T80 - Vetec®), o qual é utilizado como agente emulsificante (NASCIMENTO et al., 2007). O procedimento foi realizado todo em Gabine de Biossegurança Classe II.

5.2.2.1 Preparo das diluições do óleo essencial

Os óleos essenciais de *Salvia officinalis* L., *Ocimum basilicum* L. e *Rosmarinus officinalis* L. foram adquiridos comercialmente através da Florananda Indústria e Comércio de Cosméticos e Produtos Naturais Ltda. Foram feitas diluições seriadas de razão dois dos óleos essenciais diretamente do meio de cultivo estéril, sob condições de assepsia, obtendo-se concentrações finais que variam de 1,562µL.mL^{-1} a 100µL.mL^{-1}. A partir deste procedimento, 180µL de cada uma das concentrações foram adicionados as cavidades, obedecendo a uma ordem decrescente de concentrações. O meio de cultivo com emulsificante sem inóculo foi usado como controle negativo de contaminação e o meio de cultivo com emulsificante e inóculo, como controle positivo de viabilidade celular bacteriana. Linhas adicionais contendo apenas o meio de cultivo+T80+óleo essencial sem nenhum inóculo, foram feitas para descartar a possibilidade de contaminação do óleo essencial (Fig. 4).

A: Três repetições para cepa a
B: Três repetições para cepa b

Cavidades de 1 a 8: diferentes concentrações dos óleos essenciais - 100µL.mL^{-1}, 50µL.mL^{-1}, 25µL.mL^{-1}, 12,5µL.mL^{-1}, 6,25µL.mL^{-1}, 3,12µL.mL^{-1}, 1,56µL.mL^{-1} e 0,78lµL.mL^{-1}, respectivamente.

Figura 4 – Esquema da metodologia utilizada na placa de microtitulação para o teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI).

5.2.2.2 Preparo do inóculo bacteriano

Os inóculos bacterianos foram realizados a partir dos cultivos de 24h em ágar BHI. As amostras foram dispersas em caldo BHI até obter-se uma concentração de bactérias relativa a escala 0,5 de Mac Farland (1,5 X 10^8 UFC.mL^{-1}). Depois de feita uma diluição decimal a partir deste inóculo em Caldo BHI, obteve-se uma concentração de 1,5 X 10^7 UFC.mL^{-1}. Logo, 20µL de cada inóculo foi colocado em cada uma das cavidades da placa, exceto nos controles negativos de contaminação, resultando em uma concentração final de 3 X 10^4 células/cavidade. Foram feitas três repetições por micro-organismo. As placas foram então tampadas, agitadas e incubadas a 36ºC/24h.

5.2.2.3 Avaliação dos resultados

A leitura foi realizada com a adição de 20µL de Cloreto de 2, 3, 5 Trifenil Tetrazólio a 0,5% em todas as cavidades. Após, as placas foram incubadas a 36ºC

por 20 min. Este sal ao reagir com o $FADH_2$ disponível no meio, forma cristais de Formazan, de cor vermelha (BRANDT et al., 2006). A mudança na coloração do meio passando de transparente a vermelho indica a atividade celular bacteriana, comprovando assim ausência de inibição do crescimento bacteriano pelo óleo essencial testado.

5.2.3 Concentração mínima bactericida

A Concentração Mínima Bactericida (CMB) foi determinada a partir dos resultados da CIM. Alíquotas de 5µL de cada uma das cavidades que apresentaram inibição foram repicadas em ágar BHI e incubadas a 36ºC/24h. O crescimento bacteriano no meio de cultivo após a incubação indicou que o óleo essencial não teve atividade bactericida, apenas bacteriostática.

6 Resultados e discussão

6.1 Isolamento e identificação bacteriana

Foram analisadas um total de 20 amostras de carne moída, de cinco diferentes estabelecimentos, sendo dois supermercados e três açougues. A Fig. 5 demonstra um estudo comparativo entre as contaminações provenientes de ambos os estabelecimentos.

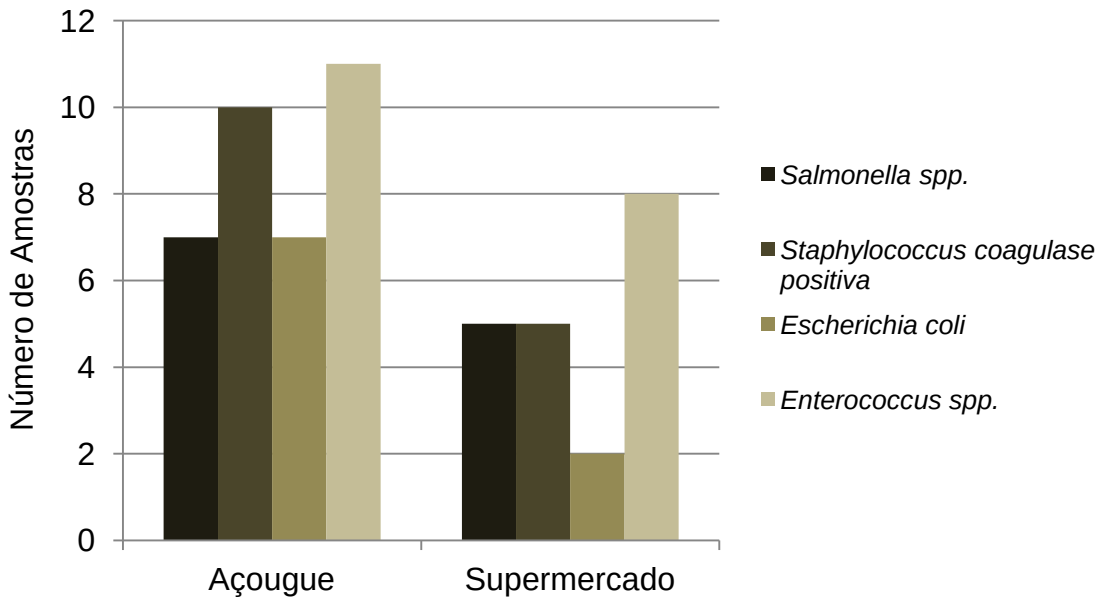


Figura 5 – Número de amostras de carne moída contaminadas obtidas de açougues e supermercados da cidade de Pelotas-RS.

Os níveis de contaminação bacteriana da carne moída foram extremamente altos, pois todas as amostras (100%) apresentaram algum tipo de contaminação. Apesar de apresentar características que fazem dela um produto bastante utilizado, a carne moída apresenta outras características que fazem com que ela seja muito

vulnerável a contaminação (PIGARRO; SANTOS, 2008). O processo de moagem, pela qual a carne moída passa, favorece a contaminação por micro-organismos, pois aumenta a superfície de contato e proporciona a incorporação de resíduos de moagens anteriores (ALMEIDA; GOLÇALVES; FRANCO, 2002).

O dado importante deste trabalho é o alto índice de contaminação por *Salmonella* spp. tanto em açougues como em supermercados, de um total de 20 amostras analisadas 12 (60%) estavam contaminadas (Fig. 6). É importante salientar que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária determina ausência total deste micro-organismo em carne moída *in natura* (ANVISA, 2001). A Fig. 7 demonstra colônias suspeitas de *Salmonella* spp em Agar xilose lisina desoxicolato. Os resultados do teste sorológico estão demonstrados na Fig. 8.

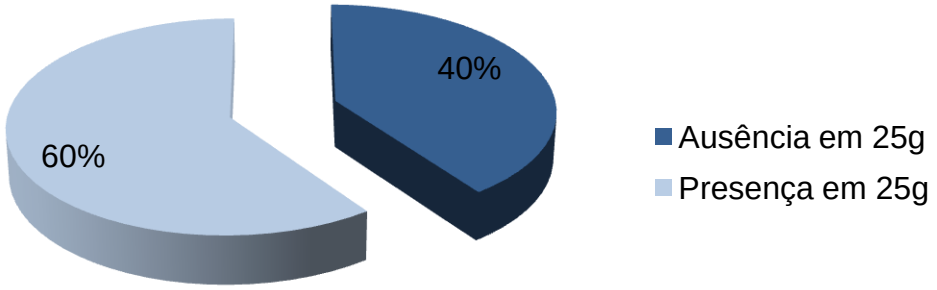


Figura 6 – Presença de *Salmonella* spp. em amostras de carne moída comercializadas na cidade de Pelotas-RS.

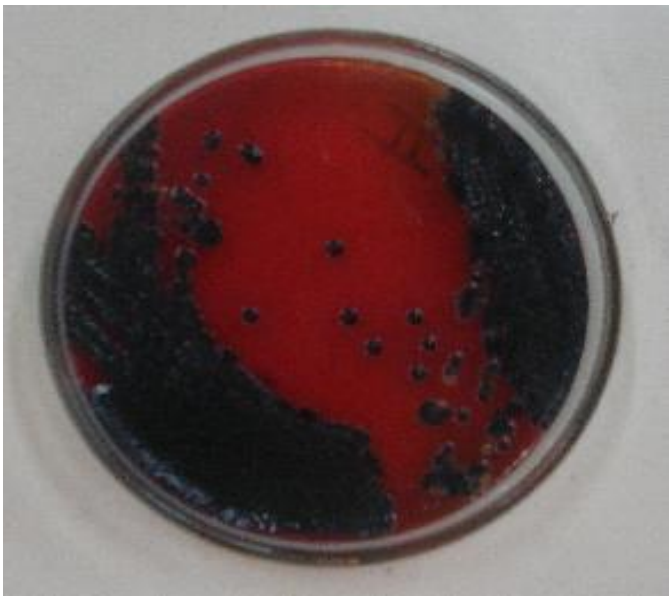


Figura 7 – Placa de Ágar Xilose Lisina Desoxilato, com colônias negras características de *Salmonella* spp.

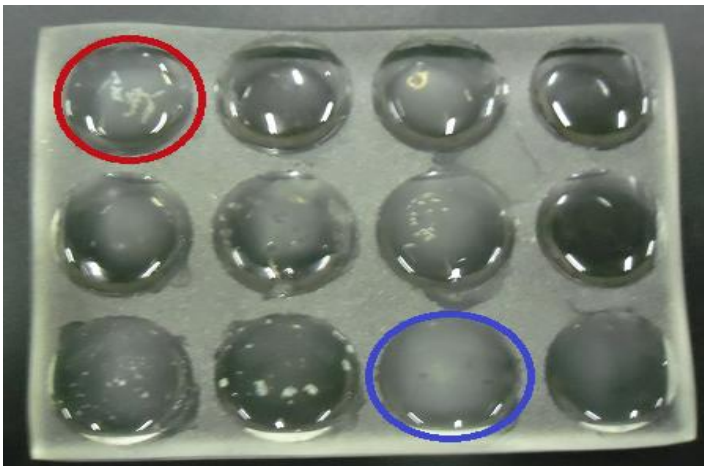


Figura 8 – Teste sorológico para confirmação de *Salmonella* spp. O poço circulado em vermelho indica positividade do teste devido a aglutinação da amostra, já o poço circulado em azul indica teste negativo para *Salmonella* spp.

Este resultado é semelhante ao de Fritzen et al. (2006), onde a contaminação por *Salmonella* spp. foi de 69,5%, em um total de 23 amostras de carne moída investigadas no Estado do Paraná. Contudo, em uma pesquisa realizada no comércio varejista no sul do Estado do Rio Grande do Sul, houve o isolamento deste patógeno em uma amostra de carne moída (4,2%), de um total de vinte e quatro (DIAS, 2008).

Quanto a *Staphylococcus* coagulase positiva (Fig. 9 e 10 demonstram colônias suspeitas para este micro-organismo e o teste da coagulase livre, respectivamente), houve presença desta em 15 amostras (75%) (Fig. 11). Resultados são semelhantes aos obtidos por Grunspan et al. (1996), onde ao analisarem 10 amostras de carne moída de açougues em Santa Maria-RS, encontraram a presença de *Staphylococcus aureus* em 100% das amostras, sendo que em 10 % a contagem foi de 1,5 a 4,0 X 10^5 UFC.g^{-1}.

Figura 9 – Placa de Ágar Baird Parker apresentando colônias negras com halo características de *Staphylococcus* spp.

Figura 10 – Teste de coagulase livre, com formação de coágulo, para confirmação de *Staphylococccus* coagulase positiva

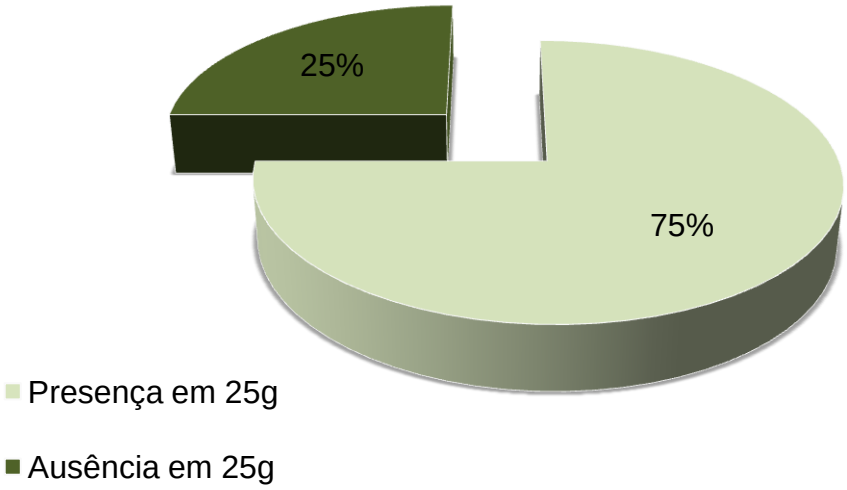


Figura 11 – Presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de carne moída comercializadas na cidade de Pelotas-RS.

Dois principais fatores podem ser responsáveis pelo alto nível de contaminação deste produto: a manipulação inadequada durante o processamento tecnológico, pois cerca de 20% dos indivíduos são colonizados por um tipo de cepa de *S. aureus* (SILVA; GRANDA, 2004), ou até mesmo proveniente do animal, uma vez que, a metodologia usada para a sangria deste pode conduzir micro-organismos da pele do animal para a carcaça (JAY, 2005). Quando feita, a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva no alimento, tem como finalidade relacionar este micro-organismo a saúde pública. Em processos de produção de alimentos, serve como indicador de contaminação pós-processo ou de condições inadequadas de sanitização das superfícies as quais o alimento entra em contato (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2002).

Do total das amostras avaliadas, nove (45%) estavam contaminadas por *Escherichia coli* (Fig. 12). A ANVISA não dispõe de padrões para a presença de *E. coli* em carne moída *in natura* (ANVISA, 2001), contudo sua presença nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e é a melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

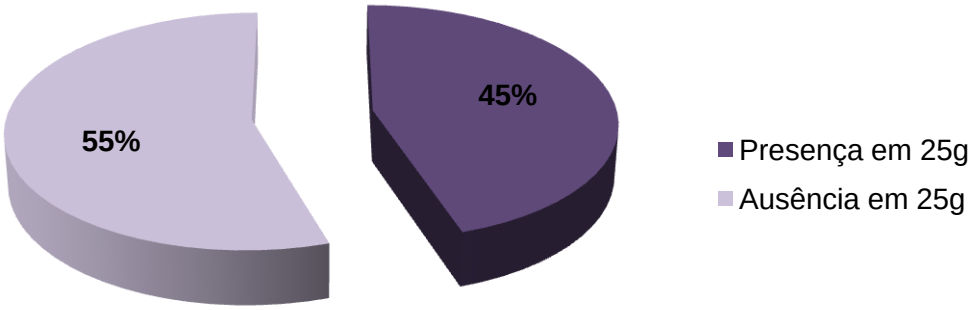


Figura 12 – Presença de *Escherichia coli* em amostras de carne moída na cidade de Pelotas-RS.

A provável origem da contaminação destas amostras por *E. coli* poderia ser reflexo de falhas nas condições higiênico sanitárias durante a manipulação do produto, pois este micro-organismo faz parte da flora natural dos animais de sangue quente (JAY, 2005). Apesar de existir a possibilidade de a *E. coli* ser introduzida no alimento através de fontes não fecais, ela é o melhor indicador de contaminação fecal que se conhece até o momento (MARCHI, 2006). A Fig. 13 mostra colônias suspeitas de *E.coli*.

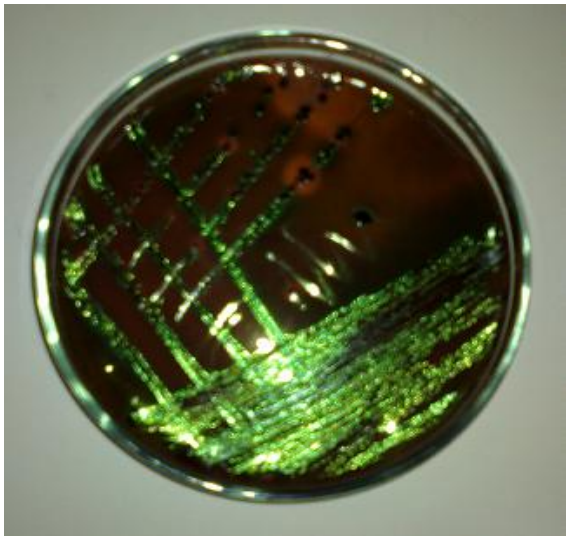


Figura 13 – Placa de Ágar Eosina Metilene Blue apresentando colônias verdes com brilho metálico características de *Escherichia coli*

Costa, Monte e Alves (2000), relataram a contaminação de 90% de um total de 30 amostras de carne por coliformes termotolerantes. Longuine et al. (2009), ao analisarem 30 amostras de carne bovina moída, confirmaram o crescimento de coliformes totais em 90% das amostras, e a confirmação de coliformes termotolerantes em 75% delas.

Para *Enterococcus* spp., a contaminação atingiu 95% (19) das amostras (Fig. 14). A Fig. 15 é referente as reações que ocorrem no meio de cultura específico para *Enterococcus* spp. como mudança na coloração do meio.

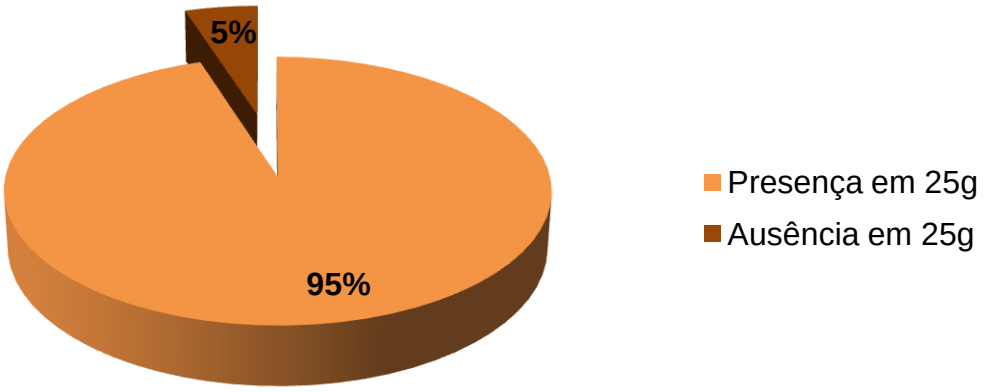


Figura 14 – Presença de *Enterococcus* spp. em amostras de carne moída na cidade de Pelotas-RS.

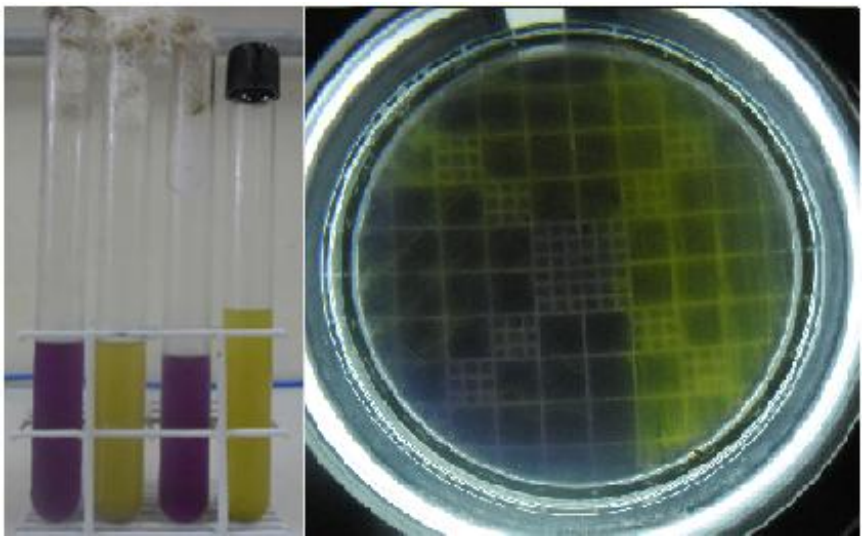


Figura 15 – Mudança na coloração dos meios SF Broth (líquido e sólido), de púrpura para amarelo, indicando cepas suspeitas para *Enterococcus* spp.

Os dados deste trabalho são superiores aos relatados por Pavia et al. (2000), onde 45% de um total de 100 amostras de carne moída provenientes de açougues na cidade de Brasília, foram positivas para *Enterococcus* spp. Gomes (2007) ao analisar 120 amostras de alimentos, sendo 30 amostras provenientes de produtos cárneos, obteve um total de 37% de isolados caracterizados presuntivamente como *Enterococcus* spp.

Procedimentos inadequados durante o abate do animal pode ser a fonte de contaminação por esse gênero bacteriano, visto que é natural a presença de *Enterococcus* spp. no trato gastrointestinal destes (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006). A prevalência de mais que o dobro de cepas de *Enterococcus* spp. em relação ao número de *E. coli* isoladas nas amostras de carne moída, deve-se ao fato de que a primeira quando comparada com *E. coli* é mais tolerante a refrigeração e, parece sobreviver por mais tempo durante a estocagem refrigerada de carcaças de carnes (INGHAM; SCHIMIDT, 2000).

6.2 Atividade antibacteriana

Para os testes de atividade antibacteriana, o uso de cepas bacterianas isoladas de alimentos teve como principal objetivo a disponibilização de isolados múltiplos para cada espécie, o que segundo alguns autores facilitaria a comparação entre os resultados obtidos (HAMMER et al., 2003; CHANG; CHEN; CHANG, 2001; KARAMAN et al., 2001; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

6.2.1 Teste de Difusão em Disco

Na Fig. 16, podem ser visualizados os valores em milímetros dos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *O. basilicum*, *S. officinalis* e *R. officinalis* frente de *E. coli*.

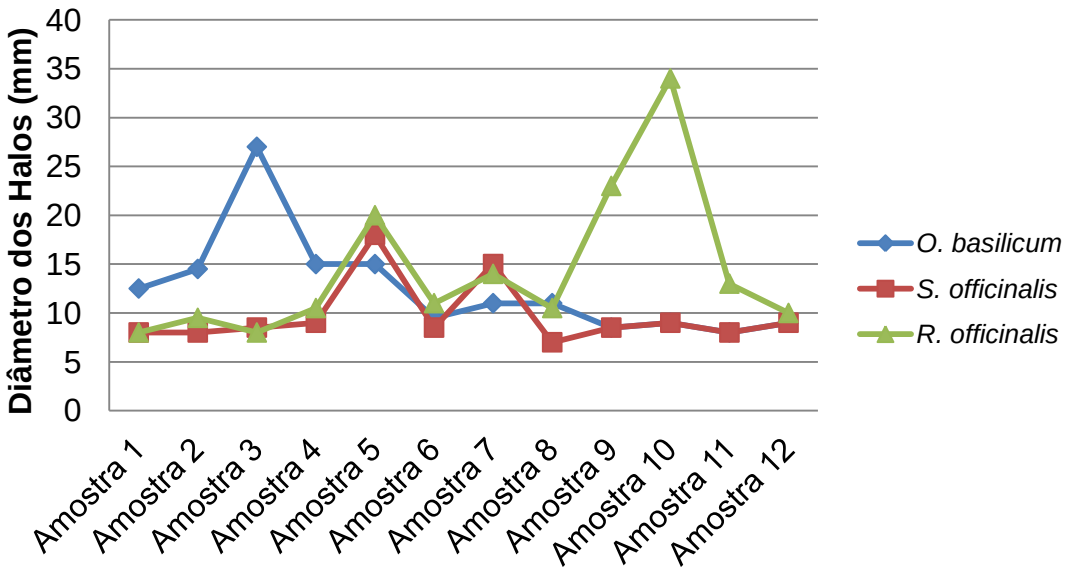


Figura 16 – Valores dos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Escherichia coli.*

Para as cepas de *Salmonella* spp,. os valores dos halos inibitórios apresentados pelos três óleos essenciais testados encontram-se expressos na Fig. 17.

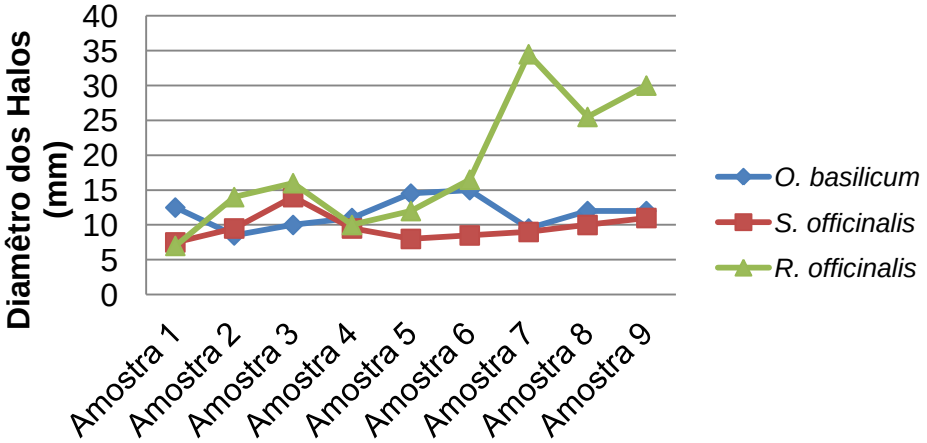


Figura 17 – Valores dos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Salmonella* spp.

A fig. 18 e a fig. 19 são referentes aos valores dos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais testados frente as cepas de *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva, respectivamente.

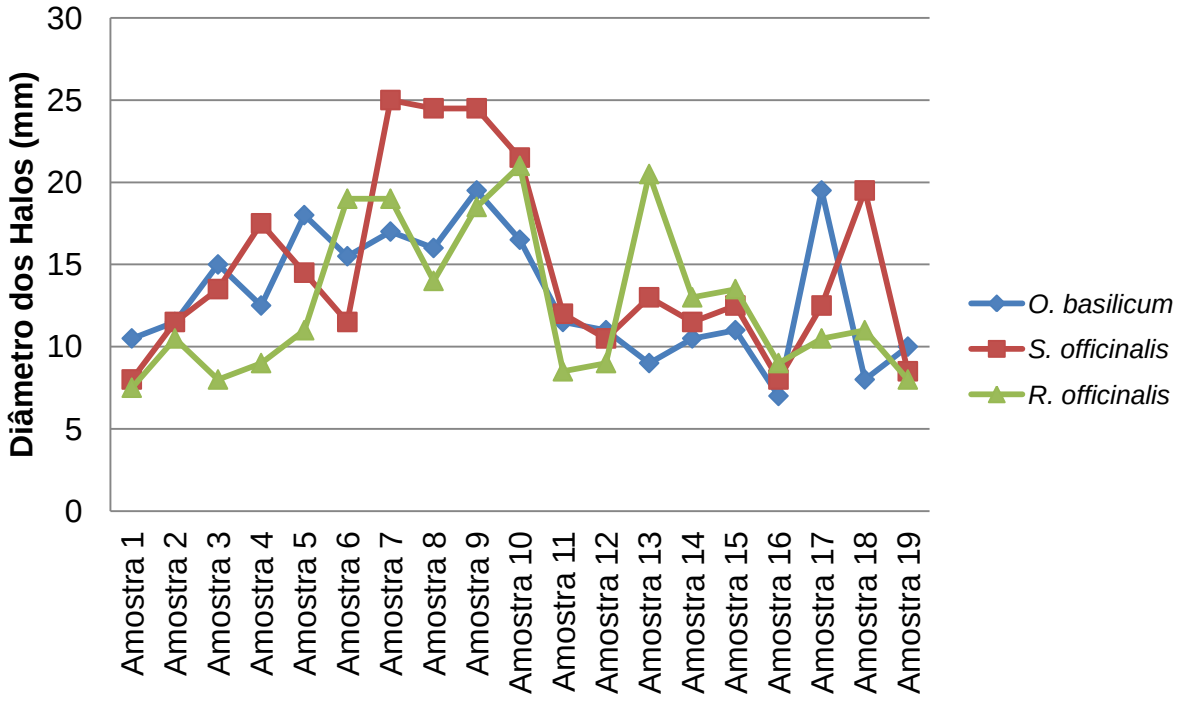


Figura 18 – Valores dos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Enterococcus* spp.

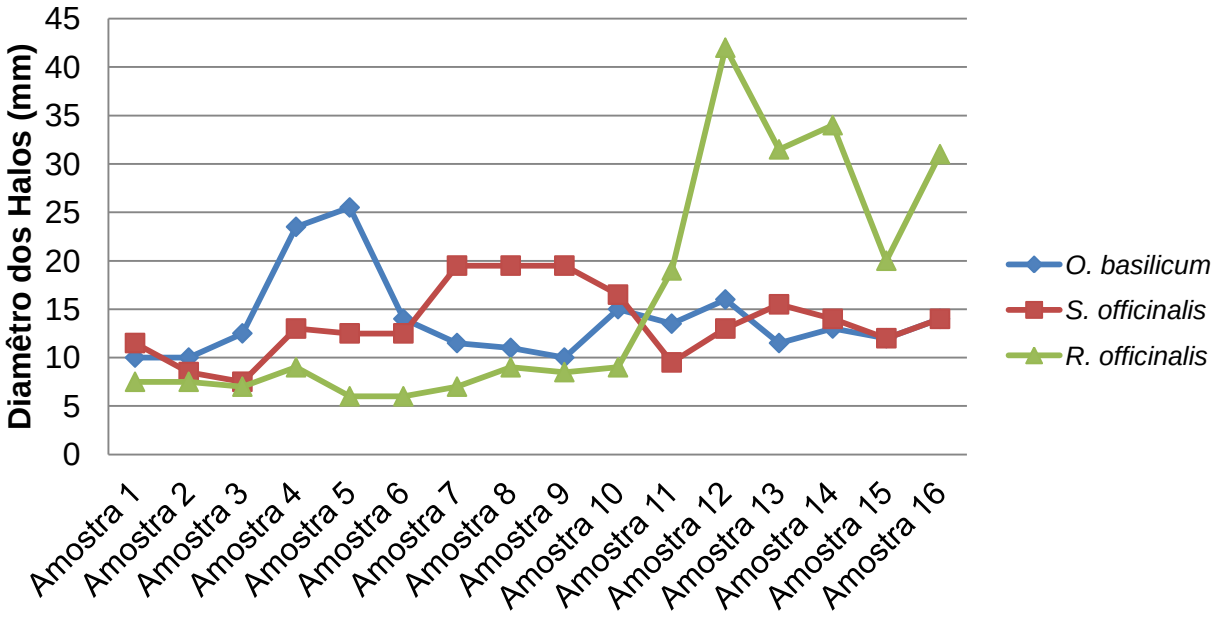


Figura 19 – Valores dos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva.

A partir dos valores dos diâmetros dos halos inibitórios, foram calculadas as médias aritméticas, desvio padrão, número máximo e número mínimo (tab. 1).

Tabela 1 – Valores das médias aritméticas (mm), desvio padrão, diâmetros máximo e mínimo dos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas bacterianas

Micro-organismo	Óleo essencial	Média aritmética	Diâmetro mínimo	Diâmetro máximo	Desvio padrão
Escherichia coli	*O. basilicum*	10,5	8,5	12,5	1,4
	S. officinalis	9,6	7,0	14,0	2,1
	R. officinalis	17,1	7,5	34,5	9,7
Salmonella spp.	*O. basilicum*	12,5	8,0	27,0	5,2
	S. officinalis	9,7	7,0	18,0	3,2
	R. officinalis	14.3	8,0	34,0	7,7
Enterococcus spp	*O. basilicum*	13,1	7,0	19,5	3,8
.	*S. officinalis*	14,7	8,0	8,0	5,5
	R. officinalis	12,7	7,5	7,5	4,6

Tabela 1 – Valores das médias aritméticas (mm), desvio padrão, diâmetros máximo e mínimo dos halos inibitórios apresentados pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas bacterianas

Micro-organismo	Óleo essencial	Média aritmética	Diâmetro mínimo	Diâmetro máximo	Desvio padrão
Staphylococcus coagulase positiva	*O. basilicum*	14,0	10,0	25,5	4,6
	S. officinalis	13,9	8,5	19,5	3,6
	R. officinalis	16,6	6,0	42,0	12,1

Calculando-se a média aritmética de cada cepa bacteriana para os três óleos testados, *Staphylococcus* coagulase positiva apresentou maior índice de suscetibilidade ($\bar{x}$ = 14,8mm). Logo com pouca variação, *Enterococcus* spp. com média aritmética de 13,5mm. *E. coli* ($\bar{x}$ = 12,4mm) e *Salmonella* spp. ($\bar{x}$ = 12,1mm) apresentaram médias semelhantes. Estes dados corroboram com relatos da literatura, que bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos produtos naturais que as Gram- negativas (PORTE; GODOY, 2001; BETONI et al., 2006; SILVA; FERNADES Jr, 2010), possivelmente devido a membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS) presente nas bactérias Gram-negativas, a qual confere maior resistência por evitar a difusão e o acúmulo de óleo essencial na célula bacteriana (IMELOUANE et al., 2009).

Contudo, é importante salientar, que de acordo com Lambert et al. (2001), a técnica de difusão em disco limita-se a geração de dados preliminares fornecendo, somente, dados qualitativos. Isto é devido a natureza hidrofóbica da maioria dos óleos essenciais e extratos de plantas, uma vez que essa característica impede a difusão uniforme destas substâncias através do meio de cultura contendo ágar-ágar (JANSSEN; SCHEFFER, SVENDSEN, 1987; RIOS; RECIO; VILLAR, 1988). Por isso Klačnik et al. (2010) consideram de fundamental importância a obtenção de valores de Concentração Mínima Inibitória (CIM), a qual foi realizada na terceira parte deste trabalho.

6.2.2 Teste de Microdiluição em Caldo

Após os testes de Difusão em Disco, foram realizados os testes de Microdiluição em Caldo, com a finalidade de obter os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Na Fig. 20 encontram-se os valores das CIM dos três óleos essenciais frente a *Salmonella* spp.

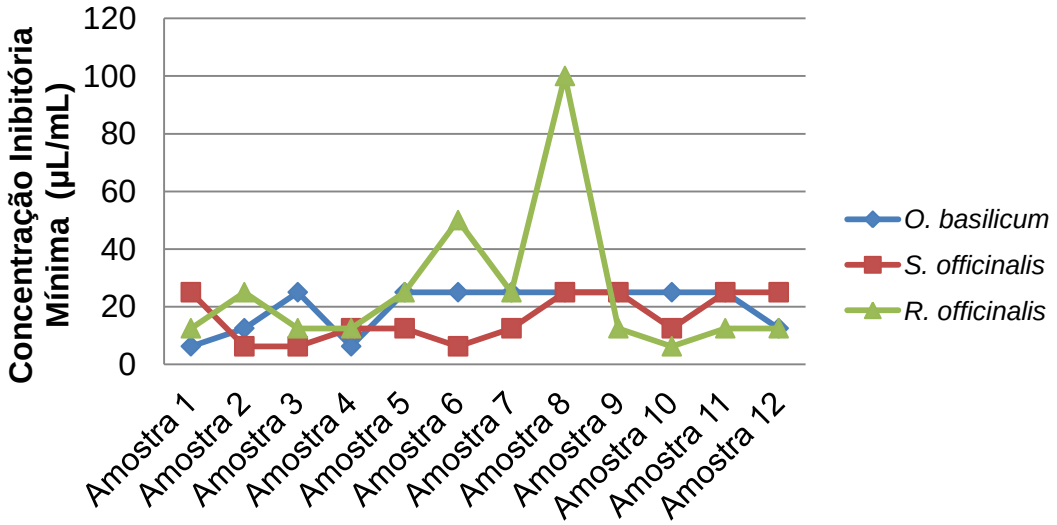


Figura 20 – Valores da Concentração Inibitótoria Mínima dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Salmonella* spp.

Com os valores obtidos, foram calculadas as médias aritméticas, números máximos, números mínimos e os desvios padrões dos óleos essenciais em estudo frente as cepas de *Salmonella* spp. (tab. 2).

Tabela 2 – Valores das médias aritméticas ($\mu L.mL^{-1}$), desvio padrão, número máximo e número mínimo das concentrações inibitórias mínimas apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas *Salmonella* spp.

Óleo essencial	Número máximo	Número mínimo	Média aritmética	Desvio padrão
O. basilicum	25,0	6,25	19,8	7,9
S. officinalis	25,0	6,25	16,1	8,2
R. officinalis	100,0	6,25	25,5	26,2

A fig. 21 é referente aos valores de CIM dos óleos essenciais testados frente as cepas de *E. coli*.

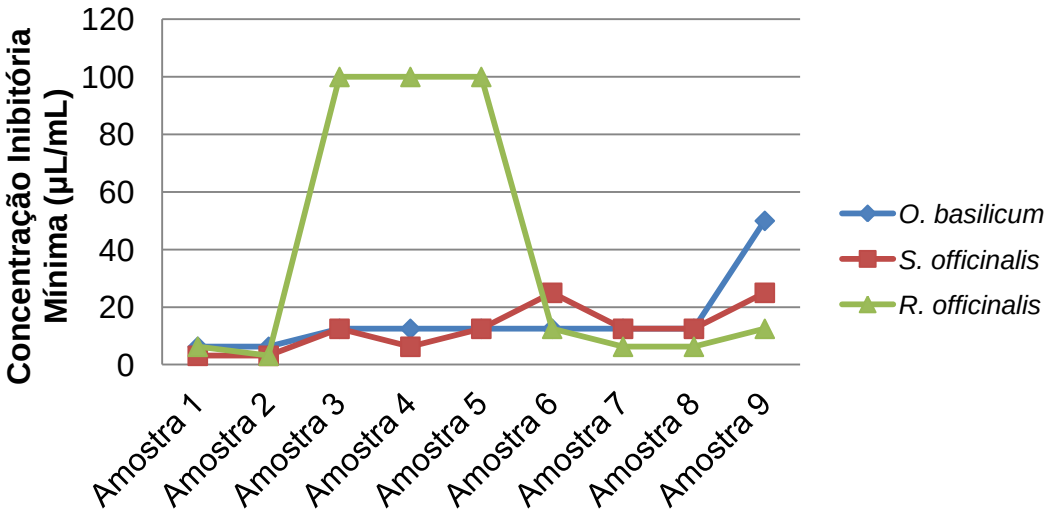


Figura 21 – Valores das Concentrações Inibitórias Mínimas dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Escherichia coli*.

A tab. 3 mostra os valores das médias aritméticas, números máximos, números mínimos e os desvios padrões calculados a partir dos valores de CIM referente aos óleos do estudo frente as cepas de *E. coli*.

Tabela 3 – Valores das médias aritméticas ($\mu L.mL^{-1}$), desvio padrão, número máximo e número mínimo das concentrações inibitórias mínimas apresentados pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente a *Escherichia coli*

Óleo essencial	Número máximo	Número mínimo	Média aritmética	Desvio padrão
O. basilicum	50,0	6,25	15,3	13,3
S. officinalis	25,0	3,12	12,5	8,1
R. officinalis	100,0	3,12	38,5	46,2

Para as cepas de *E.coli*, o óleo essencial de *S. officinalis* foi o mais efetivo, apresentando uma média aritmética da CMI de 12,5$\mu L.mL^{-1}$. Em trabalho realizado por Carvalho, Cruz e Wiest (2005), o extrato de *S. officinalis* foi um dos únicos a apresentar atividade bactericida sobre cepas dessa espécie. Pereira et al. (2004) também demonstram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *S. officinalis* contra isolados de *E. coli*. A maioria das cepas apresentou inibição do crescimento nas concentrações de 6,25$\mu L.mL^{-1}$ e 12,5$\mu L.mL^{-1}$.

A atividade bactericida (CBM) foi obtida apenas em concentrações acima destas (tab. 4). Dados semelhantes foram encontrados no trabalho de Khalil e Li (2011) onde observaram que cepas de *E. coli* inibidas pelo extrato de sálvia em concentrações de 5$\mu L.mL^{-1}$ e 10$\mu L.mL^{-1}$ voltam a apresentar crescimento após 24h, e a atividade bactericida é somente evidenciada em concentrações mais altas do óleo essencial.

Estes mesmos autores, ao testarem o sorotipo *S.Typhi*, observaram a inibição do crescimento após 1h nas concentrações de 5µL.mL^{-1} e 10µL.mL^{-1}, contudo, a cepa retomou o crescimento na mais alta concentração utilizada (20µL.mL^{-1}), corroborando dados do presente trabalho, onde a média de inibição do crescimento de *Salmonella* spp. frente ao óleo essencial de *S. officinalis* foi de 16,1µL.mL^{-1}, e 50% das cepas utilizadas só foram eliminadas perante a máxima concentração utilizada (100µL.mL^{-1}) (tab. 5). Hammer, Carson e Riley (1999) relatam a inibição de *S. enterica* sorotipo *typhimurium* em uma concentração de 2% (equivalente a 20µL.mL^{-1}), também semelhante a média obtida para *Salmonella* spp. neste trabalho.

Resultados obtidos por Miladinović e Miladinović (2000) corroboram com dados deste trabalho, onde obtiveram eficácia antibacteriana contra *E. coli* e *Salmonella*, com concentrações do óleos essencial de *S. officinalis* de 1% (equivalente a 10µL.mL^{-1}) e 2% (20µL.mL^{-1}). Apesar de a tujona ser um dos componentes majoritários da sálvia, autores associam a ação antimicrobiana do óleo essencial de *S. officinalis* a diterpenos fenólicos, como o carnosol e o ácido carnósico (MEDSEN; BERTELSEN, 1995). Pois sabe-se que os grupos hidroxilas fenólicos são bastante reativos e formam pontes de hidrogênio com sítios ativos de enzimas-alvo dos micro-organismos, inativando-as (FARAG; DAW; ABO-RAYA, 1989 apud PORTE; GODOY, 2001).

Tabela 4 – Valores das concentrações bactericidas mínimas (µL.mL^{-1}), apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente a *Escherichia coli*

Amostra / Óleo essencial	CBM µL.mL^{-1}		
	O. basilicum	*S. officinalis*	*R. officinalis*
1	**100,0**	**>100,0**	**>100,0**
2	**100,0**	**12,5**	**>100,0**
3	**100,0**	**50,0**	**>100,0**
4	**50,0**	**50,0**	**>100,0**
5	**50,0**	**50,0**	**>100,0**
6	**>100,0**	**>100,0**	**>100,0**
7	**100,0**	**>100,0**	**>100,0**
8	**100,0**	**>100,0**	**100,0**
9	**>100,0**	**100,0**	**50,0**

Tabela 5 – Valores das concentrações bactericidas mínimas (µL.mL^{-1}), apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente *Salmonella* spp.

Amostra / Óleo essencial	CBM µL.mL^{-1} *O. basilicum*	*S. officinalis*	*R. officinalis*
1	**100,0**	**>100,0**	**100,0**
2	**50,0**	**>100,0**	**100,0**
3	**100,0**	**>100,0**	**50,0**
4	**25,0**	**100,0**	**50,0**
5	**100,0**	**100,0**	**100,0**
6	**100,0**	**50,0**	**100,0**
7	**50,0**	**50,0**	**100,0**
8	**100,0**	**100,0**	**100,0**
9	**50,0**	**100,0**	**25,0**
10	**50,0**	**100,0**	**50,0**
11	**50,0**	**100,0**	**50,0**
12	**50,0**	**50,0**	**100,0**

Entre os três óleos essenciais testados, o de *Ocimum basilicum* apresentou média intermediária ($\bar{x}$ = 15,3µL.mL^{-1}) para as cepas de *E. coli*, assim como dados de Duarte et al. (2007), que ao estudarem os efeitos de plantas medicinais do Brasil, incluindo o *O. basilicum*, frente a *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), classificaram a atividade antibacteriana deste óleo essencial como sendo moderada.

No presente estudo o óleo essencial de *O. basilicum* também apresentou eficácia intermediária para *Salmonella* spp. Trajano et al. (2009), ao pesquisarem sobre as propriedades antibacterianas de óleos essenciais de especiarias em contaminantes de alimentos, verificaram a ineficácia de *O. basilicum* sobre *S. enterica*. Contudo, Rattanochaikunsopon e Phumkhachorn (2010), ao testarem *S. enterica* sorovar enteritidis, obtiveram uma CIM de 20µg.mL^{-1} para o mesmo óleo essencial, semelhante as concentrações obtidas neste estudo ($\bar{x}$ = 19,8µL.mL^{-1}).

As concentrações bactericidas mínimas (CBM) do óleo essencial de *O. basilicum* para *E. coli* e *Salmonella* spp. estão demonstradas nas tab. 4 e 5, já mencionadas anteriormente, respectivamente. As concentrações, tanto bacteriostáticas como bactericidas, obtidas neste trabalho são superiores as

descritas por Smith-Palmer, Stewart e Fyfe, onde para *E. coli* a CIM foi de 0,25% (2,5µL.mL^{-1}) e a CBM foi de 0,5% (5µL.mL^{-1}), e para *Salmonella enterica* a CIM de 0,1% (1µL.mL^{-1}) e CBM de 0,5% (5µL.mL^{-1}).

A extensão do efeito inibitório do óleo essencial de manjericão pode ser atribuída presença de núcleos aromáticos contendo grupos funcionais polares (FARAG et al., 1989 apud LIMA; PASTORE; LIMA, 2000), como é o caso do timol e do eugenol, constituintes possivelmente majoritários do *O. basilicum* (SILVA et al., 2005; POZZO et al., 2011).

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* foi o que apresentou menor eficácia para *E. coli* e para *Salmonella* spp. Em estudo de Silva et al. (2009), ao testarem o óleo de *R. officinalis* em cepas de *E. coli*, não obtiveram inibição em nenhuma das concentrações utilizadas, sendo a máxima utilizada de 3% (30µL.mL^{-1}). Neste estudo a média aritmética deste óleo para *E. coli* foi de 38,5µL.mL^{-1}. Derwich et al., ao pesquisar a eficácia deste óleo contra *Salmonella* sorotipo *typhi* obteve CIM de 23µg.mL^{-1}, semelhante a média deste trabalho para *Salmonella* spp. ($\bar{x}$ = 25,5µL.mL^{-1}).

Para Farag et al. (1986 apud PORTE; GODOY, 2001) a baixa atividade antibacteriana deste óleo essencial deve-se a presença majoritária do α-pineno, um hidrocarboneto sem núcleos aromáticos e grupos funcionais polares, ao qual é atribuído a atividade antimicrobiana. Entretanto, Porte e Godoy (2001) atribuem a atividade antibacteriana deste, ao efeito conjunto de diversas substâncias, como os compostos hidroxilados, carbonilados e os epóxidos.

Contudo, trabalhos os quais testam o óleo essencial de *R. officinalis* em associação com antibióticos contra bactérias gram-negativas, demonstram alta efetividade desta combinação, provavelmente devido a natureza lipídica dos compostos terpênicos presentes no óleo que permite um melhor transporte do antibiótico para o interior da célula bacteriana, alterando a permeabilidade da membrana citoplasmástica (HARRIS, 2003; ZHAO et al., 2001).

Para as cepas de *Enterococcus* spp. os valores da CIM referente aos três óleos utilizados no estudo encontram-se expressos na Fig. 22. As médias aritméticas, números máximos, números mínimos e os desvios padrões calculados a

partir dos valores da CIM dos óleos essenciais analisados para essa mesma cepa estão dispostos na tab. 6.

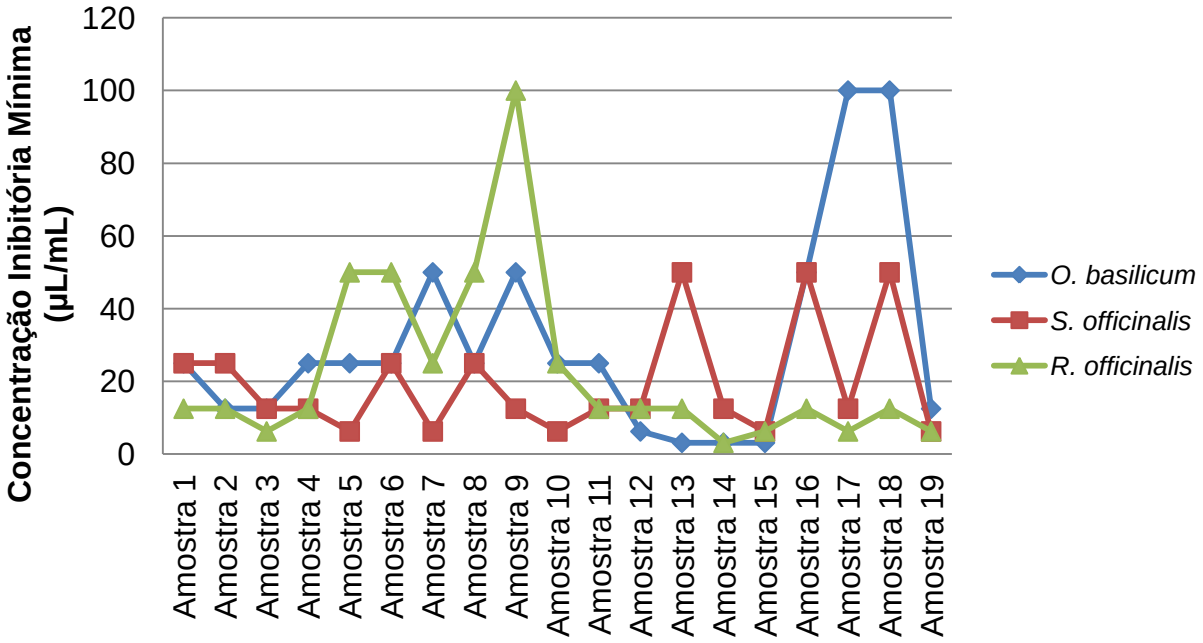


Figura 22 – Valores da Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Enterococcus* spp.

Tabela 6 – Valores das médias aritméticas ($\mu L.mL^{-1}$), desvio padrão, número máximo e número mínimo das concentrações inibitórias mínimas apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente *Enterococcus* spp.

Óleo essencial	Número máximo	Número mínimo	Média aritmética	Desvio padrão
O. basilicum	100,0	3,12	32,8	28,2
S. officinalis	50,0	6,25	19,4	15,1
R. officinalis	100,0	3,12	25,5	24,1

Para as cepas de *Enterococcus* spp. o óleo essencial de *S. officinalis* foi o que apresentou melhor eficácia, com média de CIM de 19,4µL.mL^{-1}. Hammer, Carson e Riley (1999) ao testarem este óleo essencial em *E. faecalis* obtiveram valores semelhantes ao deste trabalho (CIM = 2%, equivalente a 20µL.mL^{-1}). Contudo, Horiuchi et al. (2007) ao isolarem o composto ativo de folhas de *S. officinalis* (carnosol) e o testarem em linhagens de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes a vancomicina (VRE), alcançaram valores de CIM muito superiores do que os deste estudo (64µg.mL^{-1} para ambas as espécies). Isto pode ser devido as diferentes formas de extração dos compostos.

As concentrações bactericidas mínimas apresentadas por *Enterococcus* spp. frente aos três óleos essenciais utilizados neste trabalho (tab. 7) corroboram com dados da literatura, onde houve pouca ou nenhuma atividade bacteriostática e bactericida nas máximas concentrações utilizadas (DI PASQUA et al., 2005; CARVALHO et al., 2010). *R. officinalis* e *O. basilicum* demonstraram médias de inibição do crescimento semelhantes, 36,6µL.mL^{-1} e 37,3µL.mL^{-1}, respectivamente. Hammer, Carson e Riley (1999) além de *S. officinalis*, também testaram as concentrações de *R. officinalis* e *O. basilicum* capazes de inibir o crescimento de *E. faecalis*, e para os dois últimos óleos a CIM foi > 2% (> 20µL.mL^{-1}), assim como as médias obtidas neste trabalho.

Tabela 7 – Valores das concentrações bactericidas mínimas (µL.mL^{-1}), apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente *Enterococcus* spp.

Amostra \ Óleo essencial	CBM (µL.mL^{-1})		
	O. basilicum	*S. officinalis*	*R. officinalis*
1	**>100,0**	**>100,0**	**>100,0**
2	**>100,0**	**>100,0**	**>100,0**
3	**>100,0**	**50,0**	**>100,0**
4	**>100,0**	**100,0**	**>100,0**
5	**>100,0**	**>100,0**	**100,0**
6	**100,0**	**>100,0**	**>100,0**
7	**>100,0**	**50,0**	**>100,0**
8	**>100,0**	**100,0**	**>100,0**
9	**>100,0**	**100,0**	**>100,0**

Tabela 7 – Valores das concentrações bactericidas mínimas (µL.mL^{-1}), apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente a *Enterococcus* spp.

Amostra \ Óleo essencial	CBM (µL.mL^{-1})		
	O. basilicum	*S. officinalis*	*R. officinalis*
10	**>100,0**	**50,0**	**100,0**
11	**>100,0**	**100,0**	**50,0**
12	**100,0**	**>100,0**	**100,0**
13	**100,0**	**>100,0**	**100,0**
14	**100,0**	**100,0**	**50,0**
15	**100,0**	**>100,0**	**>100,0**
16	**>100,0**	**50,0**	**100,0**
17	**>100,0**	**100,0**	**100,0**
18	**>100,0**	**>100,0**	**50,0**
19	**100**	**100,0**	**100,0**

Para *Staphylococcus* coagulase positiva, os valores da CIM referente aos três óleos utilizados no estudo encontram-se expressos na Fig. 23.

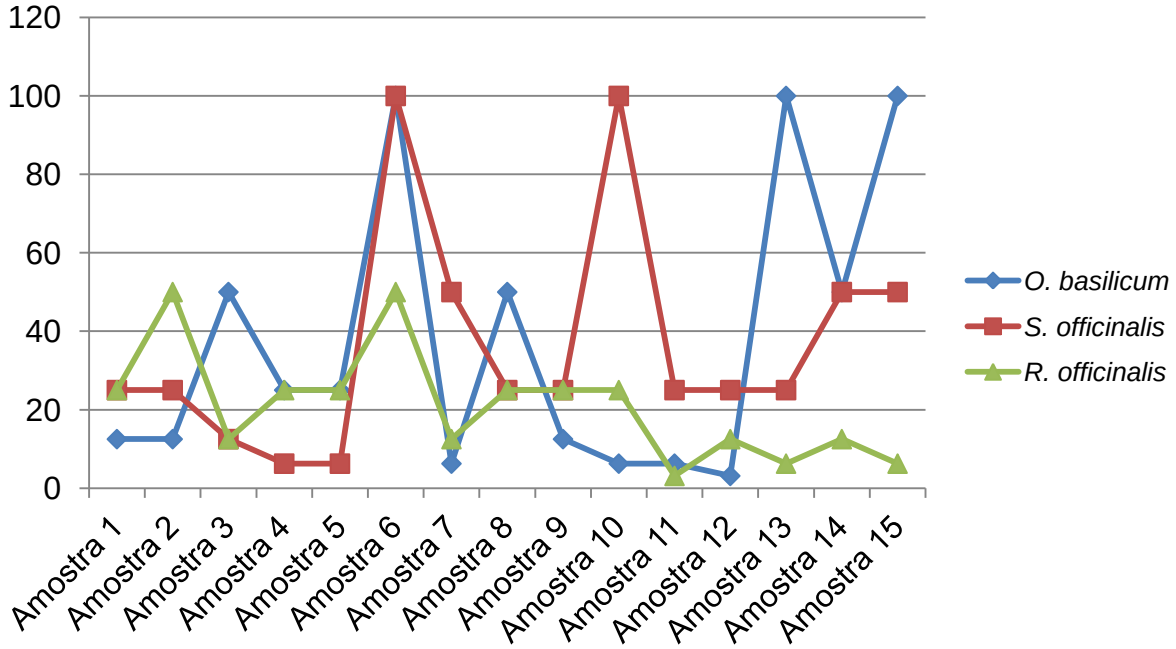


Figura 23 – Valores da Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva.

As médias aritméticas, números máximos, números mínimos e os desvios padrões calculados a partir dos valores de CIM dos óleos essenciais testados para as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva estão dispostos na tab. 8.

Tabela 8 – Valores das médias aritméticas ($\mu L.mL^{-1}$), desvio padrão, número máximo e número mínimo das concentrações inibitórias mínimas apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente a *Staphylococcus* coagulase positiva

Óleo essencial	Número máximo	Número mínimo	Média aritmética	Desvio padrão
O. basilicum	100,0	3,12	37,3	36,3
S. officinalis	100,0	6,25	36,6	29,2
R. officinalis	50,0	3,12	18,5	11,8

O óleo de *R. officinalis* foi o que apresentou média de CIM mais baixa para as cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas ($\bar{x}$ = 18,5$\mu g.mL^{-1}$). Silva et al. (2009) ao testarem *S. aureus* obtiveram uma redução de 90% da população bacteriana em 18h, sob concentração de 0,55% (5,5$\mu L.mL^{-1}$) deste mesmo óleo essencial, e ao final de 24h de incubação a redução em 100% da população. Os dados de CBM encontrados neste trabalho estão dispostos na tab. 9. Hammer et al. (1999) ao testarem essa mesma espécie bacteriana obtiveram CIM de 1% (10$\mu L.mL^{-1}$), também menores que as obtidas neste trabalho. Derwich et al. (2011) pesquisaram duas espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva, *S. aureus* e *S. intermedius*, as quais apresentaram CIM de 31,2$\mu g.mL^{-1}$ e 15$\mu g.mL^{-1}$, respectivamente, demonstrando as variações que podem ocorrer em diferentes espécies bacterianas de um mesmo gênero.

Tabela 9 – Valores das concentrações bactericidas mínimas (µL.mL^{-1}), apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente a *Staphylococcus* coagulase positiva

Amostra / Óleo essencial	CBM µL/mL		
	O. basilicum	*S. officinalis*	*R. officinalis*
1	**100,0**	**100,0**	**>100,0**
2	**50,0**	**>100,0**	**100,0**
3	**100,0**	**100,0**	**>100,0**
4	**100,0**	**25,0**	**100,0**
5	**>100,0**	**50,0**	**>100,0**
6	**>100,0**	**>100,0**	**100,0**
7	**50,0**	**>100,0**	**100,0**
8	**>100,0**	**>100,0**	**100,0**
9	**50,0**	**>100,0**	**>100,0**
10	**50,0**	**>100,0**	**>100,0**
11	**25,0**	**25,0**	**50,0**
12	**50,0**	**50,0**	**100,0**
13	**>100,0**	**>100,0**	**100,0**
14	**>100,0**	**>100,0**	**25,0**
15	**>100,0**	**100,0**	**100,0**

As médias aritméticas encontradas pelos óleos essenciais de *S. officinalis* ($\bar{x}$ = 36,6µg.mL^{-1}) e *O. basilicum* ($\bar{x}$ = 37,3µg.mL^{-1}) foram semelhantes frente as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva. Algumas pesquisas encontradas na literatura, para ambos os óleos essenciais, obtiveram valores muito inferiores aos obtidos neste trabalho, com CIM variando 0,075% (0,75µL.mL^{-1}) a 1% (10µL.mL^{-1}) para *S. officinalis*. Para *O. basilicum* as CIM encontradas variaram de 0,1% (1µL.mL^{-1}) a 2% (20µL.mL^{-1}) (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998; HAMMER, CARSON; RILEY, 1999). Sartoratto et al. (2004) demonstraram atividade de inibição moderada de *Staphylococcus aureus* frente ao óleo essencial de *O. basilicum* (CIM=0,7mg.ml^{-1}), e ainda testando *Staphylococcus* coagulase negativa (*S. epidermidis*) não obteve nenhuma concentração que inibi-se seu crescimento. Ao testar duas diferentes espécies de sálvia cultivadas no Brasil, *S. officinalis* e *S. triloba* frente a *Staphylococcus aureus*, Delamare et al. (2007) obtiveram melhores resultados para a segunda espécie, onde o crescimento da bactéria foi reduzido em concentrações de 0,05mg.mL^{-1}. Frente a

S. officinalis houve redução de 50% da população em concentrações de 0,4mg.mL^{-1} a 1mg.ml^{-1}.

Frente a estes dois óleos essenciais utilizados houve pouca ou nenhuma atividade bactericida, conforme a tab. 9 citada anteriormente. Para *S. officinalis* 73,3% das cepas obtiveram CBM de 100µL.mL^{-1} ou de >100µL.mL^{-1}. Já para *Ocimum basilicum* essa porcentagem aumentou, onde quase todas as cepas (86,6%) obtiveram CBM de 100µL.mL^{-1} ou maiores que as concentrações máximas utilizadas (>100µL.mL^{-1}).

Apesar do óleo essencial de *O. basilicum* neste estudo ter mostrado baixa eficácia como inibidor do crescimento bacteriano em Gram-positivas, análises de Leite et al. (2007) demonstraram a alta eficácia do eugenol, um dos compostos majoritários deste óleo essencial, frente as Gram-positivas: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae* (com concentrações de 10µL.mL^{-1}, 5µL.mL^{-1}, 5µL.mL^{-1} e 2,5µL.mL^{-1}, respectivamente).

Quando feita uma média aritmética geral das CIMs exibidas pelos três óleos essenciais utilizados sob as quatro espécies bacterianas estudadas (tab. 10), verificou-se que as duas bactérias Gram-negativas (*Salmonella* spp. e *E. coli*) apresentaram maior sensibilidade aos fitoterápicos do que as bactérias Gram-positivas (*Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva).

Tabela 10 – Valores das médias aritméticas das Concentrações Inibitórias Mínimas (µL.mL^{-1}), apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e *Enterococcus* spp.

Micro-organismo	Óleo essencial	Média aritmética	Média geral
Escherichia coli	*O. basilicum*	15,3	22,1
	S. officinalis	12,5	
	R. officinalis	38,5	
Salmonella spp.	*O. basilicum*	19,8	20,4
	S. officinalis	16,1	
	R. officinalis	25,5	
Enterococcus spp.	*O. basilicum*	32,8	25,9
	S. officinalis	19,4	
	R. officinalis	25,5	

Tabela 10 – Valores das médias aritméticas das Concentrações Inibitórias Mínimas ($\mu L.mL^{-1}$), apresentadas pelos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* frente as cepas *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e *Enterococcus* spp.

Micro-organismo	Óleo essencial	Média aritmética	Média geral
Staphylococcus coagulase positiva	*O. basilicum*	37,3	30,8
	S. officinalis	36,6	
	R. officinalis	18,5	

Apesar de Souza et al. (2006) afirmar que as bactérias Gram-negativas são mais resistentes a ação dos óleos essenciais devido a composição de sua bicamada lipídica, a qual evitaria a acumulação do óleo essencial e de seus componentes, este fato não foi observado no presente estudo. Porém, Oussalah et al. (2007) ao testarem 28 óleos essenciais contra duas bactérias Gram-negativas e duas Gram-positivas, demonstraram maior suscetibilidades das primeiras aos óleos essenciais testados. Nascimento et al. (2007) discorre o fato de que o inóculo bacteriano obtido através da escala de MacFarland (escala nefelométrica) pode muitas vezes representar uma variação significativa no número de micro-organismos suspensos, podendo assim estar associada com a maior resistência apresentadas pelas bactérias Gram-positivas deste trabalho.

No presente estudo não foram feitas correlações entre o tamanho do halo inibitório e a concentração inibitória mínima (CIM), pois segundo Trabulsi e Alterthum (1996) esse método não é indicado para a determinação deste fator devido a grande variância que pode obter-se nos resultados. Outro aspecto a ser considerado é que os óleos essenciais apresentam características hidrofóbicas que não possibilitam a mistura homogênea com o meio de cultura, podendo resultar em diferenças no crescimento bacteriano devido a exposição diferencial da bactéria ao agente inibidor (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

É importante salientar que a composição do óleo volátil de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento, mas as condições ambientais são capazes de causar variações significativas (JANSSEN; SCHEFFER; SVENDSEN, 1987; TEUSCHER, 1990 apud SIMÕES; SPITZER, 2003), incluindo

fatores ecológicos e condições edafoclimáticas (YIN, 1991), e conseqüente alteração na atividade antibacteriana. Somado a isto, há outros fatores que podem ser responsáveis pelas grandes diferenças entre CIM obtidas por microdiluição em caldo e métodos utilizando difusão em ágar, como diferenças no crescimento bacteriano, na exposição de micro-organismos para o óleo vegetal, a solubilidade do óleo essencial ou dos componentes do mesmo e da quantidade do agente emulsificante utilizada (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

Segundo Koyama et al. 1997, os componentes dos óleos essenciais possuem habilidades específicas para romper ou penetrar na estrutura bacteriana. Ou seja, para se conhecer o modo de ação destes óleos essenciais é necessário examinar separadamente cada componente do mesmo, e a combinação destes para averiguar se eles têm ação bactericida sozinhos ou sincronizados.

7 Conclusão

Todas as amostras de carne moída analisadas apresentaram algum tipo de contaminação. 19 amostras (95%) estavam contaminadas por *Enterococcus* spp., em 15 amostras (75%) houve a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, em 12 amostras (60%) verificou-se a presença de *Salmonella* spp., e de 9 amostras (45%) foi feito o isolamento de *Escherichia coli*.

No teste de disco difusão, as duas bactérias Gram-positivas testadas (*Sthaphylococcus* coagulase positiva e *Enterococcus* spp.) foram mais sensíveis aos três óleos essenciais utilizados do que as Gram-negativas (*Salmonella* spp. e *E. coli*).

Contudo, considerando os valores obtidos com a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), as bactérias Gram-negativas demonstraram maior sensibilidade aos óleos testados do que as cepas Gram-positivas.

Para *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Enterococcus* spp. o óleo essencial de *Salvia officinalis* foi mais eficiente. Para *Staphylococcus* coagulase positiva o óleo essencial que apresentou melhor desempenho foi o de *Rosmarinus officinalis*.

Conclui-se, portanto, que os óleos essenciais apresentam potencial antibacteriano contra patógenos isolados de alimentos.

8 Referências

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Exportações por ano – 2009. Disponível em <//www.abiec.com.br> Acesso em: 27 nov 2012.

ALMEIDA, A. S.; GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M. *Salmonella* em corte de carne bovina inteiro e moído. **Higiene Alimentar**, n.96, p.77-81, 2002.

MARTINS, A. G. L. A.; NASCIMENTO, A. R.; MOUCHREK FILHO, J. E.: MENDES FILHO, N. E.; SOUZA, A. G.; ARAGÃO, N. E.; SILVA, S. V. Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjericão frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica isolados de alface. Ciência Rural, v.40, n.8, p.1791-1796, 2010.

BARA, M. T. F.; VANETTI, M. C. D. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.7, p.21-23, 1999.

BETONI, J.E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; FERNANDES Jr, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. Memorial Instituto Oswaldo Cruz. v.101, n.4, p.387-390, 2006.

BOULOS, M. E. M. S. Segurança alimentar: uma preocupação – questão de atualizar e viabilizar a informação. **Nutrição em pauta**, n.11, p. 21-23, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC. n. 12, 2 de janeiro de 2001. **Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. In: Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Disponível em: <http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php.word>. Acessado em: 10 out de 2011.

CÂMARA, S. A. V.; AMARAL, G. B.; MULLER, M. T. Avaliação microbiológica de queijos tipo minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Higiene Alimentar**, n.16, p.32-36, 2002.

CARVALHO, H. 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.

CARVALHO, T. M.; TOSTA, T. F.; SARMENTO, R. R.; BEGNINI, M. L.; OKURA, M. H. Verificação da atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* e *Rosmarinus officinalis* em bactérias causadoras de infecção urinária. **Role-Based Acess Control**, v.42, n.3, p.213-215, 2010.

CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; PELCZER Jr, M. J. **Microbiologia: conceitos e aplicações,** 2. ed. São Paulo: Makron books, 1996. 552p.

CHANG, S. T.; CHEN, P. F.; CHANG, S. C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal Ethnopharmacology** n.77, p.123-127. 2001.

COSTA, F. N.; ALVES, L. M. C.; MONTE, S. S. Avaliação das condições higiênico sanitárias de carne bovina moída, comercializada na cidade de São Luís, MA. **Higiene Alimentar.** v.14, n.77, p.49-52, 2000.

DAVIDSON, P.M.; NAIDU, A. S. Phyto-phenol. In: **Natural Food Antimicrobial Systems**. Boca Raton: Editora A.S. Naidu, 1° ed., 2000. 818p.

DELAMARE, A. P. L.; MOSCHEN-PISTORELLO, I. T.; ARTICO, L.; ATTI-SERAFINI, L.; ECCHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v.100, n.2, p. 603-608, 2007.

DERWICH, E.; BENZIANE, Z.; CHABIR, R.; TAQUIL, R. In vitro antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus officinalis* grown in Morocco. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v.3, n.3, 2011.

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

DIAS, P. A.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; COELHO, F. J. O.; TEJADA, T. S.; SEGATTO, M.; TIMM, C. D. Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescais comercializados no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo Instituto Biológico**. v.75, n.3, p.359-363, 2008.

DOMING, K. J.; MAYER, H. K.; KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp**.**: 1 Media for isolation and enumeration, **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.1-2, p.147-164, 2003.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELAMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.2, p.197-201, 2007.

DUFFY, G.; CUMMINS, E.; NALLY, P.; O'BRIEN, S.; BUTLER, F. A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. **Meat Science**, v.74, p.76-88, 2006.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE INITED NATIONS. **Situacionde losmercados de produtos básicos 2000-2001**. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acessado em 25 nov 2012.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press, 1979. 302p.

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

FARAG, R. S.; SALEM, H.; BADEI, A. Z. M. A.; HASSANEIN, D. E. Biochemical studies on the essential oils of some medicinal plants. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.2, n.2, p.69-72, 1986.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 1° ed., 2000. 424p.

FOUQUIÉ-MORENO, M. R.; SARATINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. International **Journal of Food Microbiology**, v.106, n.1, p.1-24, 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**, São Paulo: Ed. Atheneu, 2008. 182p.

FRANÇA FILHO, A. T.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, J. P.; BUENO, C. P.; LOPES, J. H.; COUTO, M. V.; BORGES, N. M. F. Qualidade bacteriológica de meias-carcaças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do estado de Goiás habilitados para exportação. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.3, p.315-325, 2006.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology.** v.88, n.2-3, p.105-122, 2003.

FRITZEN, A. L.; SCWERZ, D. L.; GABIATTI, E. C.; PADILHA, V.; MACARI, S. M. Análise microbiológica de carne moída de açougues pertencentes a 9º Regional de Saúde do Paraná. **Higiene Alimentar**, v. 20, n.144, 2006.

GERMANO, P. M. L.; GERNANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 665p.

GOMES, B. C. **Enterococos em amostras de alimentos e águas: avaliação da virulência e do desempenho como indicadores de higiene**. 2007. 151f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

GRUNSPAN, E. D.; ULON, S. N.; SANTOS, A. F.; HERRMENN, G. P.; SHIRMER, V. R. Contaminação microbiana em carne moída de açougues da cidade de Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.26, n.2, p.263-267, 1996.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils

and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, n.86, p.985-990, 1999.

HAMMER, K. A,; DRY, L.; JOHNSON, M.; MICHALAK, E. M.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Susceptilibity of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro***. Oral Microbioogy anl Immunology**, n.18, p.389-392. 2003**.**

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, n.1s, p.1s-11s, 1997.

HARRIS, R. Sinergism in the essential oil world. **The International Journal of Aromatherapy**, v.12, n.4, p.179-186, 2003.

HEUVELINK, A. E.; ROESSINK, G. L.; BOSBOOM, K.; BOER, E. Zero tolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O157 VTEC infections. **International Journal Food Microbiology.** n.66, p13-20, 2001.

HILI, P.; EVANS, C. S.; VENESS, R. G. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. **Letters in Applied Microbiology**. v.24, n.4, p.269-275, 1997.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos**, São Paulo. 1° ed: Livraria Varela, 1993. 629p.

HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; KURODA, T.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; TSUCHIYA, T. Potential of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from Salvia officinalis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.30, n.2, p.287-290, 2007.

IMELOUANE, B. AMHAMDI, H.; WATHELET, J. P.; ANKIT, M.; KHEDID, K.; EL BACHIRI, A. **International Journal Agriculture Biology**, n.11, p.205, 2009.

INGHAM, S. C.; SCHIMIDT, D. Alternative indicator bacteria analyses for evaluating the sanitary condition of beef carcasses. **Journal Food Protection**, v.63, n.1, p.51-55, 2000.

JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; SVENDSEN, A. B. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–86 literature review. Aspects of the test methods. **Planta Medica,** n.53, p.395–398, 1987.

JAY, J. M.; **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre. Ed. Artmed, 6ª ed., 2005. 620p.

KAYSER, F. H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.2-3, p.255-262, 2003.

KARAMAN, S.; DIGRAK, M.; RAVID, U.; LLCIM, A. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. **Journal of Ethnopharmacology**, n.76, p.183-186, 2001.

KLAČNIK, A.; PISKEMIK, S.; JERSEK, B.; MOZINA, S. S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal Microbiology Methods**, n.81, p.121-126, 2010.

LAMBERT, R. J.; SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. A study of the minimum inhibitory concentrations and mode of action of oregano essential, thymol and carvacrol. **Journal Applied microbiology**, v.91, n.3, p.453-462, 2001.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo, Editora Rima Artes e Textos, 2005. 550p.

LEITE, A. M.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; DINIZ, M. F. F. M.; TRAJANO, V. N.; MEDEIROS, I. A. Inhibitory effect of α-pineno and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.1, 2007.

LIMA, C. A. A.; PASTORE, G. M.; LIMA, E. D. P.A Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da csatanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e DDP-09 em cinco estágios de maturação sobre microrganismos da cavidade bucal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.3, 2000.

LONGUINE, R.; MCNABB, M. A.; PEREIRA, L. F.; POIATTI, M. L. Contaminação microbiana em carne moída comercializada no município de Dracena-SP. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 19, 2009, Águas de Lindóia. Águas de Lindóia: ZOOTEC, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarium de Estudos da Flora, 2002. 512p.

KHALIL, R.; LI, Z. G. Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.42, p.8397-8402, 2011.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, n.3, p.206-220, 2005.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; JUNIOR, W. C. W. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. São Paulo, Editora Medsi, 2001. 1466p.

KOYAMA, S.; YAMAGUSHI, 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**, n. 28, p.797-804, 1997.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Editora Varela, 2005. 258p.

MARCHI, P. G. F. **Estudo comparativo do estado de conservação da carne moída através de métodos biológicos e físico químicos**. Editora da Universidade UNESP. São Paulo. 2006. 72p.
MILADINOVIĆ, D.; MILADINOVIĆ, L. J. Antimicrobial activity of essential oil of sage from Serbia. **Chemistry and Technology**, v.2, n.2, p.97-100, 2000.

MISSOURIPLANTS.COM. Disponível em: http: <//www.missouriplants.com> Acesso em: 15 de dez. 2013.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; JUNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial de métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

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

NOTERMANS, S.; VERDEGAAL, A. H. Existing and emergin foodborn diseases. **International Journal Food Microbiology**, n.15, p.197-205, 1992.

ORDONEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**, São Paulo: Ed. Artmed, 2005. v.2. 280p.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-328, 2004.

PINTO, T. J. A.; KANEKO T. M.; OHARA M. T. 2003. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**, São Paulo: Editora Atheneu. 2° ed. 325p.

PIRAGINE, K. O. **Aspectos higiênicos e sanitários do preparo da merenda escolar na rede estadual de ensino de Curitiba**. 2005. 122f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba

PLANT DATABASE. Disponível em: http: <//www.plantdatabase.co.uk> Acesso em: 15 de dez. 2013.

PLANTA SONYA. Disponível em: http: <//www.plantasonya.com.br> Acesso em: 15 de dez. 2013.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.19, n.2, p.193- 210, 2001.

POZZO, M. D.; SANTURIO, J. V. D. F.; ROSSATTO, L.; SOARES, I. H.; ALVES, S. H., COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos

frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. **Ciência rural**, v.41, n.4, p.667-672, 2011.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Antimicrobial activity of basil (*Ocimum basilicum*) oil against Salmonella enteretidis in vitro and in food. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.74, n.6, p.1200-1204, 2010.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology,** n.23, p.127–149, 1988.

ROCHA, M. A. **Fitoterapia**. 1998. Disponível em <HTTP://www.geocities.com/Athens/Parthenon/5140/substveg.html> Acesso em: 15 maio 2012.

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

SANDERS, T. A. B. **Food production and food safety**. BMJ Group. n.318, p.1689-1693, 1999.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.35, p.275-280, 2004.

SATCHER, D. Food safety: a growing global health problem. **Journal of the American Medical Association**. n.283, p.1817, 2000.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. J**ournal of Food Protection**, v.68, n.4, p 790-795, 2005.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, v.6, n.1, p.29-44, 1983.

SILVA, C. A.; SOUZA, E. L.; SOUZA, C. P. Estudo da qualidade sanitária de carne moída comercializada na cidade de João Pessoa, PB. **Revista Higiene Alimentar**, v.18, n.126, p.90-95, 2004.

SILVA, F.; SANTOS, R. H. S.; ANDRADE, N. J.; BARBOSA, L. C. A.; CASALI, V. W. D.; LIMA, R. R.; PASSARINHO, R. V. M. Basil conservation affected by cropping season, harvest time and storage period. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.40, p.323-328, 2005.

SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**, 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2000. 227p.

SILVA, M. T. N.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; CUNHA, M. L. R. S.; FERNANDES Jr., A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.11, n.3, p. 257-262, 2009.

SILVA, N. C. C.; FERNADES Jr, A. Biological properties of mecidicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal Venomous Animals Toxins Including Tropical Diseases**, v.16, n.3, p.402-413, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos**, São Paulo: Ed. Varela, 1997. 315p.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.122, 2004.

SIMÕES, CLÁUDIA MARIA OLIVEIRA; SPITZER, VOLKER. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora da UFSC, 5ª ed., 2003. 1102p.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Foods Safety**, n.6, p.29-44, 1983.

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

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

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação de famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em AGP** II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiacea) essential oil **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.37, n.4, p.525-532, 2006.

PAVIA, M.; NOBILE, C. G.; SALPIETRO, L.; ANGELILLO, I. F. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. Journal of Food Protection, v.63, n.7, p.912-915, 2000.

PIGARRO, M. A. P.; SANTOS, M. **Avaliação microbiológica da carne moída de duas redes de supermercados da cidade de Londrina - PR**. 2008. 55f.

Monografia (Pós-graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Castelo Branco, Londrina.

PIGATTO, C. P.; BARROS, A. R. **Qualidade da carne moída bovina resfriada, comercializada em açougues da região de Curitiba**. Revista Higiene Alimentar, v.12, n.108, p.53, 2003.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2ª ed., 2003. 325p.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Antibacterial property of spice essential oils on food contaminating bacteria. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v.29, n.3, p.542-545, 2009.

TEUSCHER, E. **Pharmazeutische Biologie**. Braunschweig: Editora Vieweg, 3ª ed., 1990. 549p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. São Paulo: Ed. Artmed, 10ª ed., 2012. 934p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: Ed. Atheneu, 4° ed., 2004. 718p.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, p.542-545, 2009.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Drug-resistant *Salmonella***. Fact Sheet n.139. Disponível em: http://www.who.int/ mediacentre/factsheets/fs139/en/. Acesso em: 10 dez 2012.

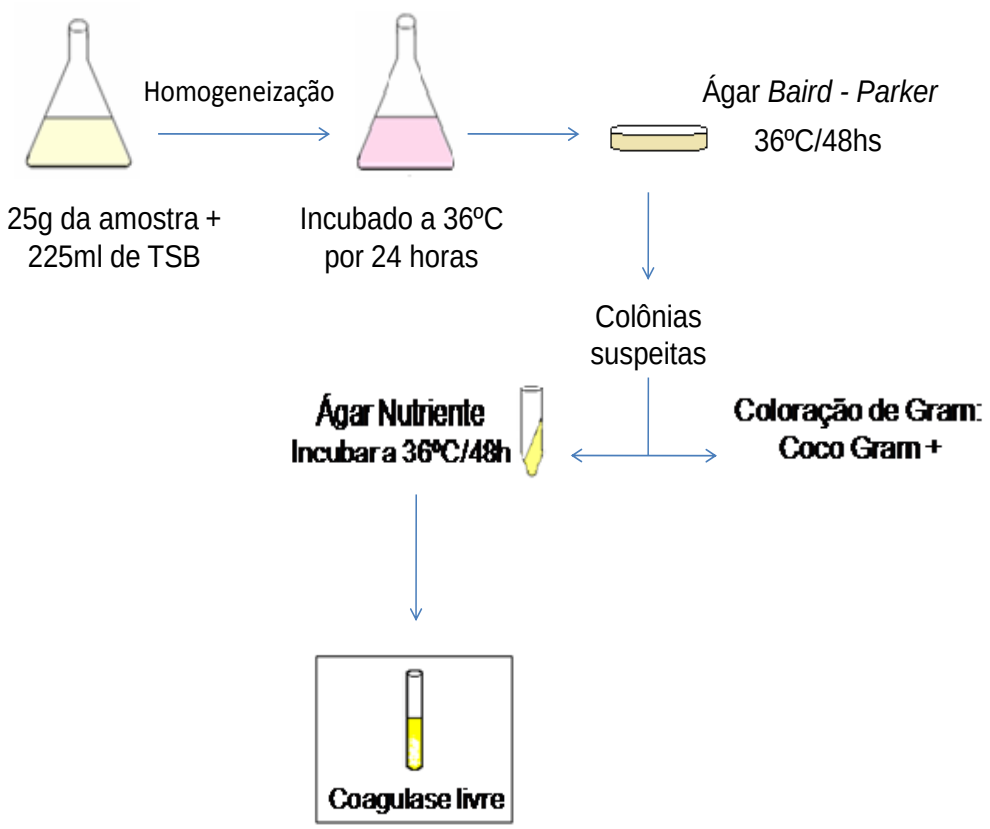
YIN, H. W. Yield and composition variation of essential oil from leaves of different *Cinnamonmum osmophloeum* Kanehira clones in Taiwan. **Quarterly Journal of Chinese Forestry**, n.24, p.83-104, 1991.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V., Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova***,* v. 24, n.1, p.147-152, 2001.

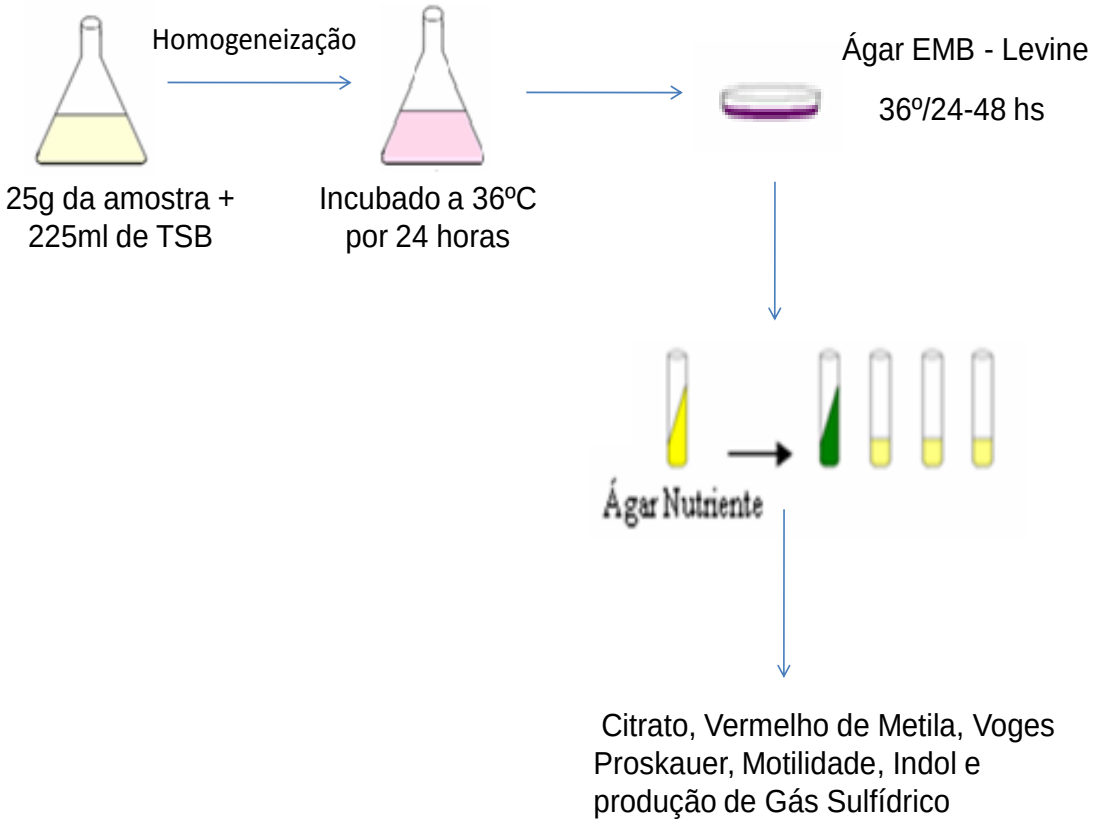
ZHAO, W. H.; HU, Z. Q.; OKUBO, S.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemothe**, v.45, n.6, p.1737-1742, 2001.

ANEXOS

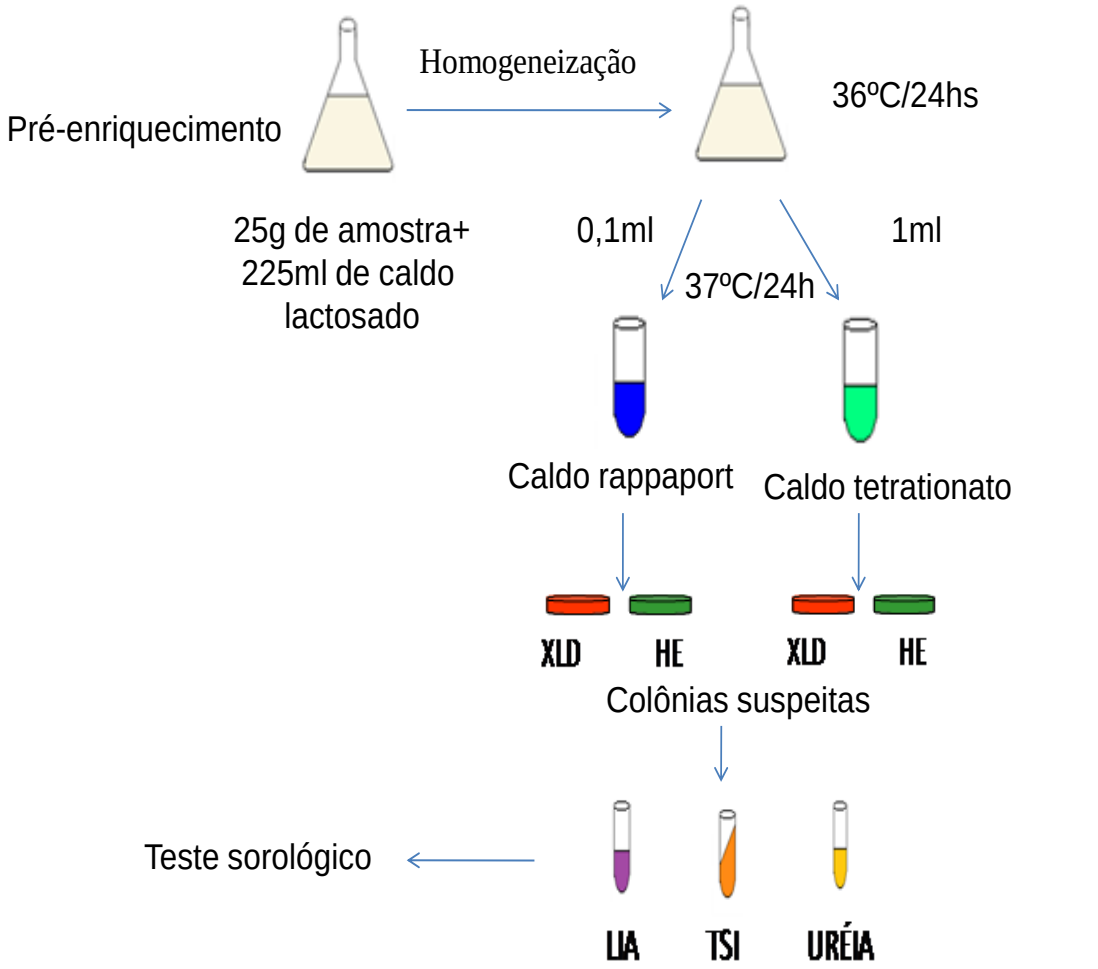
1. Isolamento e identificação de Staphylococcus coagulase positiva



2. Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

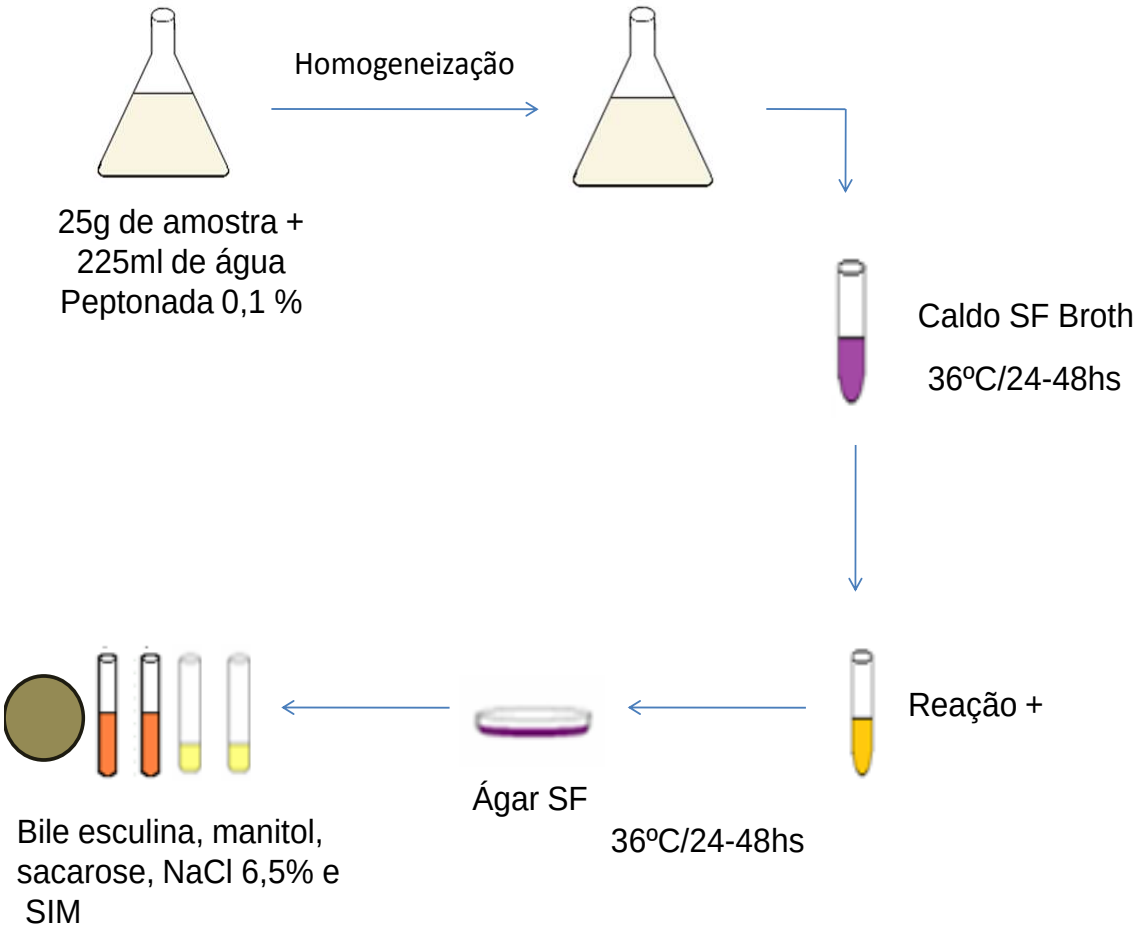


3. Isolamento e identificação de *Salmonella* spp.



Ágar Lisina Ferro (LIA), ágar Tríplice de Ferro (TSI) e Uréia

4. Isolamento e identificação de Enterococcus spp.



5. Laudo técnico para o óleo essencial de *Ocimum basilicum* L.

6. Laudo técnico para o óleo essencial de *Salvia officinalis* L.

7. Laudo técnico para o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.