

**LARISSA DE OLIVEIRA**

**EFEITO INIBITÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALFAVACÃO (*Ocimum gratissimum* L.) E CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum* L.) E DO SUCO DE LIMÃO (*Citrus latifolia* Tanaka) FRENTE ÀS BACTÉRIAS *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE OVINOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Anna Christina de Almeida

Coorientador: Prof. Ernane Ronie Martins

Montes Claros  
2011

LARISSA DE OLIVEIRA

**EFEITO INIBITÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALFAVACÃO  
(*Ocimum gratissimum* L.) E CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum* L.)  
E DO SUCO DE LIMÃO (*Citrus latifolia* Tanaka) FRENTE ÀS BACTÉRIAS  
*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* ISOLADAS DE CARÇAÇAS  
DE OVINOS**

---

Prof.<sup>a</sup> Eliete Fernandes Flávio  
(UNIMONTES)

---

Prof.<sup>a</sup> Lourdes Silva de Figueiredo  
(ICA/UFMG)

---

Prof.<sup>a</sup> Anna Christina de Almeida  
Orientadora (ICA/UFMG)

Aprovada em 4 de agosto de 2011.

Montes Claros  
2011

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Anna Christina de Almeida, por acreditar.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Rocksane de Carvalho Norton, pela possibilidade do começo.

Aos professores Dr. Ernane Ronie Martins, Dra. Lourdes Silva de Figueiredo, Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques, Dr. Rogério Marcos de Souza e Dr. Cândido Alves da Costa, pelo auxílio e pelas contribuições.

Às professoras Dra. Eliete Fernandes Flávio e Dra. Roberta Torres Careli, pela disponibilidade.

Ao banco do Nordeste – Projeto Centro de Referência em Ovinocaprinocultura no Norte de Minas Gerais, pelo financiamento.

À FAPEMIG e à CAPES, pelas bolsas de estudos concedidas.

Aos colegas Marco Túlio Pinheiro de Melo, Sabrina de Souza Sales, Bernardo Rodrigues Porto e Flávia Oliveira Abrão, por toda a ajuda.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 2 - SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE OVINOS DO MUNICÍPIO DE MONTES CLAROS – MG

- GRÁFICO 1** - Perfil da sensibilidade e resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de dezesseis carcaças de ovinos comercializadas em Montes Claros – MG..... 31
- GRÁFICO 2** - Perfil da sensibilidade e resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* sp. coagulase positiva isoladas de dezesseis carcaças de ovinos comercializadas em Montes Claros – MG..... 32
- ### CAPÍTULO 3 - EFEITO INIBITÓRIO E ATIVIDADE DESINFETANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALFAVACÃO E CRAVO-DA-ÍNDIA CONTRA *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE OVINOS
- FIGURA 1** – Halos de inibição formados pelas concentrações do óleo de alfavacão..... 49
- GRÁFICO 1** - Cromatograma do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. analisado por cromatografia gasosa com detector de massas..... 47
- GRÁFICO 2** - Cromatograma do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* L. analisado por cromatografia gasosa com detector de massas..... 48
- GRÁFICO 3** - Halo de inibição (mm) determinado pelo efeito antimicrobiano do óleo essencial de alfavacão sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em função das concentrações testadas ( $\mu\text{L/mL}$ )..... 54
- GRÁFICO 4** - Halo de inibição (mm) determinado pelo efeito antimicrobiano do óleo essencial de cravo sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em função das concentrações testadas ( $\mu\text{L/mL}$ )..... 55
- GRÁFICO 5** - Reduções médias do número de colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8733 após 5 minutos e 96 horas de contato *in vitro* com desinfetantes à base de alfavacão e cravo-da-índia..... 58

**CAPÍTULO 4 - SUCO DE LIMÃO FRENTE A  
*Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli* ISOLADAS  
DE CARÇAÇAS DE OVINOS**

- GRÁFICO 1** - Halo de inibição (mm) determinado pelo efeito antimicrobiano do suco de limão sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em função das concentrações testadas (%)..... **72**
- GRÁFICO 2** - Redução do número de colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8733 após 5 minutos e 96 horas de contato *in vitro* com desinfetante à base de suco de limão..... **75**

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2 - SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE OVINOS DO MUNICÍPIO DE MONTES CLAROS – MG**

- 1 - Contagem de coliformes termotolerantes de amostras de carcaças de ovinos de um estabelecimento em Montes Claros – MG, coletadas entre mar. – jun. de 2010..... **27**
- 2 - Contagem de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus* sp. coagulase positiva de amostras de carcaças de ovinos de um estabelecimento em Montes Claros – MG, coletadas entre mar. – jun. 2010..... **29**

### **CAPÍTULO 3 - EFEITO INIBITÓRIO E ATIVIDADE DESINFETANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALFAVACÃO E CRAVO-DA-ÍNDIA CONTRA *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE OVINOS**

- 1 - APÊNDICE A - Componentes químicos do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. (%)..... **96**
- 2 - APÊNDICE B – Componentes químicos do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* L. (%)..... **97**
- 3 - Diâmetros dos halos de inibição (mm) dos óleos essenciais de cravo e alfavacão contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*..... **49**
- 4 - Relação entre as concentrações dos óleos essenciais de alfavacão e cravo-da-índia e bactérias Gram-positivas e negativas..... **52**
- 5 - Relação entre as concentrações e os óleos essenciais de alfavacão e cravo-da-índia..... **53**
- 6 - Concentração bactericida mínima ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) dos óleos essenciais de alfavacão e cravo-da-índia contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de carcaças de ovinos..... **55**

### **CAPÍTULO 4 - SUCO DE LIMÃO FRENTE A *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE OVINOS**

- 1 - Diâmetros dos halos de inibição (mm) do suco de limão contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*..... **72**

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>10</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
1.1	A carne de ovino e a segurança alimentar.....	12
1.2	Bactérias patogênicas em alimentos.....	14
1.3	Óleos essenciais e suco de limão como sanitizantes.....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>18</b>
	<b>CAPÍTULO 2 – SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE OVINOS DO MUNICÍPIO DE MONTES CLAROS – MG.....</b>	<b>19</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>19</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>20</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
2.1	Coletas de amostras.....	23
2.2	Pesquisa de coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i> .....	23
2.3	Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> sp.....	24
2.4	Avaliação da sensibilidade antimicrobiana das cepas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus</i> sp.....	24
2.5	Análise estatística.....	25
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>

<b>CAPÍTULO 3 - EFEITO INIBITÓRIO E ATIVIDADE DESINFETANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALFAVACÃO E CRAVO-DA-ÍNDIA CONTRA <i>Escherichia coli</i> E <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE OVINOS.....</b>		<b>36</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>36</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>37</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
2.1	Coletas de amostras.....	40
2.2	Pesquisa de coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i> .....	40
2.3	Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> sp.....	41
2.4	Material vegetal e extração dos óleos essenciais.....	41
2.5	Análise cromatográfica dos óleos essenciais.....	42
2.6	Avaliação da atividade inibitória e bactericida dos óleos.....	43
2.7	Verificação da eficiência dos óleos como desinfetantes.....	44
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
3.1	Rendimento e caracterização química dos óleos essenciais.....	46
3.2	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos óleos essenciais sobre <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .....	48
3.3	Eficiência <i>in vitro</i> dos óleos essenciais como desinfetantes.....	57
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
 <b>CAPÍTULO 4 - SUCO DE LIMÃO FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i> E <i>Escherichia coli</i> ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE OVINOS.....</b>		<b>62</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>62</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>63</b>

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
2.1	Coletas de amostras.....	66
2.2	Pesquisa de coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i> .....	66
2.3	Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> sp.....	67
2.4	Preparo e avaliação da atividade inibitória e bactericida das soluções.....	67
2.5	Verificação da eficiência do suco de limão como desinfetante.....	69
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
3.1	Atividade inibitória do suco de limão.....	71
3.2	Eficiência <i>in vitro</i> do suco limão como desinfetante.....	75
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
	<b>APÊNDICE A - Tabela 1 - Componentes químicos do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> L. (%).....</b>	<b>96</b>
	<b>APÊNDICE B - Tabela 2 - Componentes químicos do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> L. (%).....</b>	<b>97</b>

## CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

### 1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura no Brasil é um setor em potencial (FIRETTI *et al.*, 2010) e encontra-se em difusão proporcionada pelo incremento na renda da população, o conseqüente aumento no consumo da carne (ROTA *et al.*, 2006; VIANA; SILVEIRA, 2009) e pela valorização do produto devido a procura ser maior do que a oferta (PINHEIRO *et al.*, 2008a).

O rebanho ovino no Norte de Minas Gerais cresceu 201,15% entre os anos 2000 e 2009, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2000; 2009). No restante do Brasil, o crescimento registrado foi de 13,70% no mesmo período, de acordo com a referida entidade. Os consumidores são atraídos pelo odor, aroma, pela maciez e suculência da carne ovina e, para satisfazer a população e preservar ou aumentar o nível das vendas, é primordial manter as características sensoriais aceitáveis desse alimento (COSTA *et al.*, 2008; OSÓRIO *et al.*, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2008b).

Atualmente, a segurança dos alimentos disponíveis à venda gera discussão e requer o aprofundamento dos estudos e dos cuidados. A ascensão da comercialização da carne de ovino agrada aos produtores, no entanto a cadeia produtiva carece de normas e diretrizes cujo objetivo seja a produção eficiente com oferta constante do produto seguro. Os ovinos são pequenos ruminantes, reservatório de microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli Shiga-like-toxin*, e são menos estudados em relação a outros mamíferos de sangue quente. Todavia, não se sabe o quanto esses animais contribuem para o surgimento de doenças na população (RIGOBELLO *et al.*, 2008).

O controle da contaminação microbiana é indispensável em todos os processos para garantir um produto com alto nível de qualidade, na expectativa de atender à legislação e contemplar as exigências de comercializações internas e externas. Esse controle traz como principais benefícios, segundo Furtini; Abreu (2006), a diminuição dos custos, devido à

redução de perdas, e a otimização da produção. A qualidade é um dos pontos determinantes na competição pelo mercado e, quando a qualidade da carne de ovino não satisfaz os requisitos básicos de produção, todo o sistema é afetado (PEREZ; CARVALHO, 2004).

Entre janeiro de 1999 e dezembro de 2010, o Brasil registrou 6.971 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), com 133.954 doentes e 88 óbitos (BRASIL, 2010)<sup>1</sup>. Em 2009, as bactérias foram os agentes etiológicos de maior incidência (41,1%) (BRASIL, 2009). Na transmissão dessas patologias, os alimentos ou a água são considerados os veículos dos agentes infecciosos e tóxicos. A contaminação pode acontecer em qualquer etapa da produção, mas a manipulação e a conservação inadequadas merecem atenção especial (BRASIL, 2005).

Dentre os patógenos de alimentos, destacam-se as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*. Vários surtos de DTA estão associados ao consumo de carne vermelha ou aves contaminadas por algum desses microrganismos ou pelas suas toxinas. Algumas dessas cepas apresentam a preocupante resistência aos agentes antimicrobianos convencionalmente utilizados (MOR-MUR; YUSTE, 2010).

Em contrapartida, quanto a resistência aos antibióticos, os pesquisadores têm estudado produtos naturais com potencial de utilização como conservantes de alimentos (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2007). Os cientistas visam desvendar os compostos químicos responsáveis pelos efeitos biológicos e os mecanismos de ação pelos quais conseguem inibir as células (BURT, 2004; PORTE; GODOY, 2001). Os resultados mostram a ação antimicrobiana de especiarias, plantas medicinais e frutas frente a bactérias, fungos, bolores e leveduras (CANSIAN *et al.*, 2010; DAMBOLENA *et al.*, 2010; HOLLEY; PATEL, 2005; MOREIRA *et al.*, 2005; PEREIRA, 2006; SENGUN; KARAPINAR, 2004; SILVA *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2009), frequentemente encontrados em produtos de origem animal, como queijos e carnes.

---

<sup>1</sup> [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31760](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31760)

As plantas medicinais e o suco de limão podem contornar o efeito deletério de desinfetantes químicos ao meio ambiente (BOUAZIZ *et al.*, 2009) e servir como alternativa aos agricultores rurais no uso de insumos bactericidas e/ou bacteriostáticos (TRESOLDI, 2008). Quanto aos ácidos orgânicos, alguns são utilizados como sanitizantes para eliminar os microrganismos de determinadas superfícies, inclusive de alimentos como a carne (SILVA *et al.*, 2001).

Recomenda-se encontrar soluções antimicrobianas de fácil obtenção e favoráveis aos produtores rurais. Soma-se a esse interesse, a predisposição da população em adquirir produtos sem adição de substâncias químicas sintéticas, acrescidos de gêneros naturais para o controle microbiológico dos alimentos, tornando pertinente a realização deste trabalho.

### **1.1 A carne de ovino e a segurança alimentar**

O hábito alimentar dos consumidores de carne no Brasil mudou muito nos últimos anos, permitindo ao brasileiro se render a novos sabores como o da carne de ovino (COSTA *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2008a). Embora o consumo ainda seja menor quando comparado com o de outras espécies (PEREZ; CARVALHO, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2008), nos grandes centros urbanos tem-se observado um aumento impulsionado pela elevação do poder aquisitivo e pelo abate de animais jovens (ROTA *et al.*, 2006).

Os fatores sensoriais, assim como a praticidade de preparo, influenciam na compra de produtos cárneos (BRESSAN *et al.*, 2001; FERRÃO *et al.*, 2009), tanto quanto os costumes e os hábitos de cada consumidor (PINHEIRO *et al.*, 2008b). A carne de ovino é macia, suculenta, com odor e sabor característicos (COSTA *et al.*, 2008; OSÓRIO *et al.*, 2009). No âmbito do comércio, apresenta o maior índice de exportação (ASTIZ, 2008).

A segurança dos alimentos é definida como a “garantia de que os alimentos não causem danos ao consumidor, quando preparados e/ou consumidos de acordo com o uso a que se destinam” (OPAS, 2006, p. 13). A falta de cuidados no preparo ou na produção pode levar às patologias

conhecidas como DTA, doenças transmitidas por alimentos, sendo uma ameaça e um desafio à saúde pública no mundo (SOUSA, 2008).

A frequência das DTA no mundo parece aumentar e os surtos são registrados em países desenvolvidos e industrializados, não se limitando aos países subdesenvolvidos. Além de desagradáveis, podem ser fatais, levar a prejuízos no comércio e conseqüentemente à perda econômica (OPAS, 2006). Prevenir a contaminação requer medidas rigorosas de controle em todas as fases da cadeia alimentar, da produção agrícola à mesa dos consumidores (YOSSA *et al.*, 2010).

Os consumidores cada vez mais exigem a oferta de uma mercadoria com excelência, padronizada e certificada, pois a produção atual de carne tem-se voltado para a qualidade e não só para a quantidade (BONAGURIO *et al.*, 2003; ROTA *et al.*, 2006). A preocupação com a qualidade e a segurança dos gêneros alimentícios cresce de acordo com o aumento das exigências dos consumidores. No Brasil, a implantação de sistemas de gestão da qualidade na cadeia produtiva dos alimentos surgiu devido à imposição do mercado externo, e pela conscientização dos consumidores em adquirir produtos seguros à saúde (FIGUEIREDO; COSTA NETO, 2001; PADULA; ITO, 2006; PERETTI; ARAÚJO, 2010; SPISSO *et al.*, 2009; TORREZAN, 2003).

O termo qualidade pode ser interpretado sob vários aspectos. No caso da qualidade dos alimentos, essa definição torna-se ainda mais difícil em função de diferentes parâmetros avaliados como a capacidade de suprir às necessidades do organismo, o aspecto sensorial, a apresentação, a facilidade de utilização do produto, dentre outros (FLORÉZ, 2000). Segundo Peretti; Araújo (2010), o entendimento de qualidade em alimentos deve ser o somatório de esforços do Estado, do setor produtivo e dos consumidores.

Para Bressan *et al.* (2001), os principais atributos da carne vermelha, associados à qualidade, são a aparência e a maciez. Outra característica é a capacidade de retenção de água, indicativo fundamental de qualidade (BORGES *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2008), pois está diretamente relacionado à suculência da carne. A menor capacidade de retenção de água resulta em um alimento seco e menos tenro, além de sugerir uma carne com

menor valor nutritivo em decorrência da perda de nutrientes no exsudado (OSÓRIO *et al.*, 2009). Segundo Perez; Carvalho (2004), a gordura intramuscular favorece à suculência, uma vez que atua na retenção de água no interior do músculo. Durante o cozimento e a mastigação, essa gordura é liberada, estimula a salivação e a percepção de suculência e maciez ocasionadas pelo efeito lubrificante da gordura (SHIBUYA, 2004).

Freitas *et al.* (2004) consideram os produtos cárneos de qualidade microbiológica aceitável quando esses gêneros atendem critérios determinados pela legislação vigente, definidos na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). A prática dos cuidados necessários com a cadeia produtiva, do manejo de animais até o processamento final, garantirá carne microbiologicamente segura, cabendo ao consumidor apenas as precauções antes do consumo (HUFFMAN, 2002).

## 1.2 Bactérias patogênicas em alimentos

Antes de a agricultura facilitar a produção e a disponibilidade de alimentos, a comida foi provavelmente um dos primeiros itens assegurados pelo ser humano na luta para garantir a sobrevivência (MIR, 2004).

A microbiologia auxilia no processo de investigação dos surtos e identificação dos microrganismos patogênicos. A carne, por ser um alimento rico em nutrientes, permite o crescimento de microrganismos, mesmo sob refrigeração (VASCONCELOS *et al.*, 2002). A segurança e a qualidade desse gênero podem ser estimadas pela contagem de microrganismos indicadores e pela presença de patógenos, como *Escherichia coli*, que é indicativa de falhas na higiene e de contaminação fecal (JAY, 2000; LOPES *et al.*, 2007). O trato intestinal de bovinos, ovinos e outros ruminantes é o principal reservatório dessas cepas (SILVA *et al.*, 2007), embora alguns representantes da flora intestinal dos animais de sangue quente não sejam causadores de doenças (DUARTE *et al.*, 2007).

Na microbiologia de alimentos, *Staphylococcus aureus* se destaca como importante bactéria patogênica. Distingue-se pela incidência no ambiente e nas intoxicações provocadas pela ingestão de alimentos

contendo enterotoxinas termoestáveis (FREITAS *et al.*, 2004). No meio dos alimentos incriminados em surtos de *S. aureus* estão as carnes e os seus derivados, produtos lácteos, ovos, saladas com vários ingredientes e sanduíches recheados. Os manipuladores são a fonte mais frequente de contaminação. Além do mais, os equipamentos e superfícies não podem ser ignorados (SILVA *et al.*, 2007).

A microbiota da carne fresca varia de acordo com a contaminação inicial do produto e está diretamente relacionada às condições higiênico-sanitárias pré-abate do ambiente, das superfícies e dos utensílios utilizados. Além disso, os surtos de origem alimentar podem ocorrer devido à manipulação e ao armazenamento incorretos e à aquisição de carne sem procedência garantida (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Nas duas últimas décadas, as doenças de origem alimentar provocadas por bactérias, parasitas e vírus foram o foco da atenção de políticos e da mídia. Embora a produção de alimentos aumente os cuidados com a segurança, os patógenos tendem a evoluir e gerar novos desafios à saúde pública, como a resistência aos antimicrobianos (NEWELL *et al.*, 2010). A resistência das bactérias aos antibióticos aplicados no tratamento tanto de humanos quanto de animais é preocupante. Assim, torna-se fundamental a descoberta e o estudo de novas substâncias antimicrobianas para a destruição desses microrganismos (PEREIRA *et al.*, 2004).

Nessa busca, aumenta o interesse e as pesquisas para a verificação da eficácia dos compostos naturais com características microbicidas, no intuito de atender ao consumidor cada vez mais exigente e criterioso com a qualidade do que consome, e preocupado em utilizar produtos menos agressivos e, de preferência, de origem natural (PACKER; LUZ, 2007).

### **1.3 Óleos essenciais e suco de limão como sanitizantes**

Os óleos essenciais são compostos complexos, voláteis, naturais, caracterizados por odor forte, extraídos de plantas aromáticas, normalmente por destilação a vapor ou hidrodestilação. Podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta: botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutos,

raízes, madeira ou cascas. Essas plantas normalmente estão localizadas em países de clima temperado para quente, onde representam parte importante da farmacopeia tradicional. São conhecidos pela ação antisséptica, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiespasmódica, dentre outras, sendo utilizados na medicina, na indústria e no comércio (BAKKALI *et al.*, 2008).

A lima ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka), denominada erroneamente como limão 'Tahiti', tem os frutos verdes (FIGUEIREDO *et al.*, 2005), ácidos, perfumados, de casca fina e muito apreciados como suco ou acompanhados de bebidas alcoólicas (DURIGAN *et al.*, 2005). Ácidos orgânicos são compostos orgânicos presentes no trato digestivo dos animais - ácidos orgânicos de cadeia curta, como o ácido acético, o cítrico e o butírico - também encontrados como componentes naturais de alimentos, como os frutos cítricos (OSTERMANN *et al.*, 2005) laranja, tangerina, limão, lima e pomelo (SENNA *et al.*, 2007). Os ácidos, em interação com outras substâncias antimicrobianas, como os óleos essenciais, podem ter a sua capacidade de conservação aumentada, inclusive no tratamento de carnes (SOUZA *et al.*, 2009).

Os egípcios, os chineses e os indianos utilizam os agentes antimicrobianos naturais por séculos na preservação de alimentos. O cravo, a canela e o gengibre, por exemplo, são usados como remédios na Índia até os dias atuais (TAKARIMI *et al.*, 2010). No Brasil, o Ministério da Saúde incluiu como parte das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. O objetivo, segundo o Governo Federal (BRASIL, 2006, p. 2), é "garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional."

A indústria alimentícia visa à produção de alimentos com maior tempo de prateleira, livres de microrganismos patogênicos e suas toxinas (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2007). Os óleos das especiarias e seus derivados, bem como as plantas medicinais e os ácidos orgânicos encontrados no limão, por exemplo, possuem ação inibitória e antisséptica comprovada e revelaram nova perspectiva para seu emprego (BOUAZIZ *et*

*al.*, 2009; METRI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010; TRESOLDI, 2008). São usados como conservantes nesse tipo de indústria, podendo eliminar as células viáveis em superfícies de bancadas, equipamentos, utensílios e alimentos sólidos, como a carne (AVANCINI *et al.*, 2000; GRZEGOZESKI *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2008; PEREIRA, 2006). A utilização de produtos naturais, substitutos de aditivos químicos, tem sido uma opção devido à comprovada resistência dos microrganismos (AMARAL; BARA, 2005), por não influenciar, negativamente, na saúde do consumidor (SCHERER *et al.*, 2009) e nem sempre nas características nutricionais e sensoriais dos alimentos (PEREIRA; MAIA, 2007; PONCE *et al.*, 2011).

Comparados ao uso de aditivos sintéticos, a utilização de plantas, especiarias, frutos e óleos essenciais com ação antimicrobiana é ainda remota, basicamente por três razões: dados escassos sobre os seus efeitos na alimentação humana, odor marcante e alto custo (TAJKARIMI *et al.*, 2010). Combinações de técnicas têm sido aplicadas com sucesso em alimentos e experimentos *in vitro*, mas ainda são necessários estudos para elucidarem os mecanismos de inativação dos microrganismos por esses elementos, bem como as consequências da sua utilização a curto e longo prazo.

## 2 OBJETIVO GERAL

A pesquisa teve como objetivo avaliar a qualidade sanitária das carcaças de ovinos abatidos e comercializados em Montes Claros–MG, verificando a presença de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e analisar a atividade antimicrobiana e antisséptica do suco de limão (*Citrus latifolia* Tanaka) e dos óleos essenciais do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e do alfavacão (*Ocimum gratissimum* L.) sobre as bactérias isoladas das carcaças.

## CAPÍTULO 2 - SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE OVINOS DO MUNICÍPIO DE MONTES CLAROS – MG

### RESUMO

Objetivou-se verificar e quantificar a presença de coliformes termotolerantes e isolar, identificar e avaliar, *in vitro*, o perfil de sensibilidade antimicrobiana das amostras de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp. provenientes de carcaças de ovinos comercializadas em Montes Claros – MG. Foram coletadas 36 amostras, por meio da técnica do esfregaço de superfície, entre os meses de março e junho de 2010. Foi detectada a presença de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. coagulase positiva em dezesseis (44,4%), sete (19,44%) e duas (5,55%) amostras, respectivamente. Todas apresentaram contagem de coliformes termotolerantes ( $<3,0 \times 10^0$  a  $>1,1 \times 10^3$  NMP/cm<sup>2</sup>) dentro dos limites estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Na avaliação do perfil de sensibilidade os antibióticos mais eficazes contra *Escherichia coli* foram Ciprofloxacina (100%) e Cloranfenicol (100%), seguidos da Gentamicina (94%). O antimicrobiano mais eficaz contra *Staphylococcus* sp. foi a Gentamicina (100%), seguido pela Ciprofloxacina (88,8%). A multirresistência foi verificada em 100% e 67%, respectivamente, das amostras de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp.. Concluiu-se que as carcaças de ovinos comercializadas apresentam elevada carga microbiana e as bactérias patogênicas identificadas são multirresistentes aos antibióticos, representando risco potencial para a saúde pública.

Palavras-chave: Antibióticos. Coliformes termotolerantes. Patógenos de alimentos. Resistência bacteriana. Segurança alimentar.

## CHAPTER 2 - ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF BACTERIA ISOLATED FROM SHEEP CARCASSES IN MONTES CLAROS – MG

### ABSTRACT

This study evaluated samples of sheepmeat sold in Montes Claros, MG, to detect and quantify thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* and *Staphylococcus* sp. as well as to isolate them and describe their antimicrobial susceptibility/resistance profile *in vitro*. Surface smears of 36 sheep carcasses (lambs, yearlings and adults) were collected and evaluated from March to June 2010. The occurrence of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and coagulase-positive *Staphylococcus* sp. was detected in 16 (44.4%), 7 (19.44%) and 2 (5.55%) samples, respectively. Thermotolerant coliform count in the samples ranged from  $<3.0 \times 10^0$  to  $>1.1 \times 10^3$  MPN/cm<sup>2</sup>, which is within the limits established by the National Sanitary Surveillance Agency (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária*). The antimicrobial susceptibility test showed that Ciprofloxacin and Chloramphenicol were 100% effective against *Escherichia coli*, followed by Gentamicin with 94% efficiency. With respect to *Staphylococcus* sp. Gentamicin was 100% effective against this pathogen followed by Ciprofloxacin, with 88.8% efficiency. Multiple resistance was detected in 100% and 67% of *Escherichia coli* and *Staphylococcus* sp. samples, respectively. In conclusion, sheep carcasses commercialized in Montes Claros have high microbial load. Additionally, the pathogenic bacteria identified exhibit multiple resistance against antibiotics, posing a potential risk to public health.

Keywords: Antibiotics. Thermotolerant coliforms. Food pathogens. Bacterial resistance. Food safety.

## 1 INTRODUÇÃO

O mercado de carne ovina no Brasil está em expansão (PEREZ; CARVALHO, 2004; VIANA; SILVEIRA, 2009); entretanto, apresenta como grave problema a baixa qualidade do produto (SIQUEIRA *et al.*, 2002).

A comercialização de carne de ovino carece de normas e diretrizes, pois a cadeia produtiva ainda não se encontra totalmente organizada (PEREZ; CARVALHO, 2004). Esse fato é preocupante, visto que o consumidor, cada vez mais, requer do comércio alternativas para ampliar a oferta de produtos com excelência, padronizados e certificados, que exige a adoção de novas estratégias na produção de alimentos seguros, com métodos sustentáveis e pouco nocivos (RAJKOVIC *et al.*, 2010; ROTA *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, os países tentam melhorar a segurança de alimentos por meio do estabelecimento de critérios microbiológicos para as matérias-primas e os produtos processados (ICMSF, 2006). A legislação e os regulamentos são necessários, mas garantir a aplicação dos mesmos é o mais difícil (ADAM; BRÜLISAUER, 2010). Identificar os principais meios de carreamento e as fontes de microrganismos nos ruminantes é fundamental para o desenvolvimento de ações preventivas para evitar a contaminação e a infecção dos animais, além de impedir a chegada dos patógenos ao local de abate (DESMARCHELIER *et al.*, 2007).

As bactérias patogênicas continuarão sendo um risco à qualidade das carnes (ADAM; BRÜLISAUER, 2010; SOFOS, 2008). É bem provável que novas espécies sejam descobertas no século 21. Muitas serão zoonóticas, tendo duas vezes mais probabilidade de causar novas doenças. Além disso, microrganismos já conhecidos podem evoluir, agravando os riscos à saúde pública (NEWELL *et al.*, 2010), por isso a importância da prevenção e a detecção precoce dos mesmos (DOYLE; ERICKSON, 2006; ICMSF, 2006; VELUSAMY *et al.*, 2010).

*Enterobacteriaceae* talvez seja a mais conhecida família bacteriana. Muitos dos patógenos importantes para o homem e os animais, como *Escherichia coli*, pertencem a essa família. As espécies são bacilos Gram-

negativos, anaeróbios facultativos e fermentadores de glicose (JAY, 2000; OSÉS *et al.*, 2010).

*Staphylococcus* sp. são microrganismos presentes em quase todos os produtos de origem animal ou naqueles diretamente manipulados por seres humanos, frequentemente associados aos surtos de doenças transmitidas por alimentos pela capacidade de algumas cepas produzirem e excretarem enterotoxinas termoestáveis. O controle de estafilococos potencialmente patogênicos é essencial para a prevenção de infecções (JAIN; AGARWAL, 2009; SILVA *et al.*, 2007; VIÇOSA *et al.*, 2010).

O combate a essas e outras bactérias infecciosas levou ao desenvolvimento de defesas relativas (resistência) aos agentes antimicrobianos por causa do uso indiscriminado dos mesmos, limitando a ação dos principais compostos descobertos e lançados no mercado, como as penicilinas e os seus análogos, as tetraciclina e as eritromicinas (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Dessa forma, objetivou-se avaliar a qualidade sanitária das carcaças de ovinos comercializadas em Montes Claros – MG, por meio do isolamento e da quantificação de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp., além de analisar a sensibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp. frente a diferentes antibióticos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Procedeu-se conforme as orientações da *American Public Health Association* (APHA), descritas no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES; ITO, 2001).

### 2.1 Coletas de amostras

Foram coletadas amostras de 36 carcaças, recolhidas durante três visitas em açougue de Montes Claros – MG, entre os meses de março e junho de 2010. O abate dos animais era realizado de modo informal e acontecia em local distinto ao da venda do produto, conforme informações do proprietário do estabelecimento.

Empregou-se a técnica do esfregaço de superfície em cinco pontos (pescoço, paleta, costelas, lombo e pernil), sendo os *swabs* transportados em frascos com 50 mL do diluente água peptonada a 0,1% (Himedia®) (MIDURA; BRYANT, 2001). Os volumes dos frascos com os *swabs* (solução  $10^{-1}$ ) foram homogeneizados em água peptonada 0,1% e, em seguida, sofreram diluição para a obtenção das outras duas soluções ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) (SWANSON *et al.*, 2001).

Recolhidas, as amostras seguiram em recipiente resfriado para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, na mesma cidade, sendo cultivadas no mesmo dia.

### 2.2 Pesquisa de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

A determinação do número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes foi calculada com série de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (Oxoid®) por diluição, incubados a 35-37 °C por 24 horas para o teste presuntivo. As amostras positivas (crescimento com produção de gás) foram repassadas para tubos com caldo EC (Acumedia®), incubados a 45,5 °C por 48 horas. Para a confirmação de *Escherichia coli*, usou-se o meio ágar

Levine Eosina Azul de Metileno (Oxoid®) com as placas incubadas a 35 °C por 24 horas, e as colônias positivas repassadas para tubos inclinados contendo o ágar Padrão para Contagem (Acumedia®), incubados a 35 °C por 24 horas. As cepas características foram submetidas às provas bioquímicas de citrato, indol, vermelho de metila e Voges-Proskauer (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

### **2.3 Pesquisa de *Staphylococcus* sp.**

De cada diluição foi retirado 0,1 mL e inoculado na superfície de placas de ágar Baird-Parker (Himedia®), incubadas invertidas em temperatura de 35 °C por 48 horas. As colônias típicas de estafilococos (circulares, pretas ou cinza-escuro, medindo de 2 a 3 mm de diâmetro, lisas, convexas, massa de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente) foram contadas e transferidas para tubos com caldo Infusão Cérebro Coração ou Brain Heart Infusion (Himedia®), incubados por 24 horas a 35 °C. Após esse período, realizou-se o teste de coagulase com a adição de 0,2 mL das culturas obtidas em BHI a 0,5 mL de Coagulase Plasma-EDTA (Fluka®), incubados a 35-37 °C durante 6 horas com a verificação posterior da presença ou ausência de coágulo (LANCETTE; BENNETT, 2001).

### **2.4 Avaliação da sensibilidade antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp.**

Adotou-se a técnica de difusão em disco preconizada por Bauer *et al.* (1966), utilizando os antibióticos: Neomicina 10 µg, Penicilina 10 µg, Tetraciclina 30 µg, Gentamicina 10 µg, Ciprofloxacina 5 µg, Novobiocina 30 µg (apenas para as cepas de *Staphylococcus* sp.), Oxacilina 1 µg e Cloranfenicol 30 µg (apenas para as cepas de *Escherichia coli*). Todos da marca DME®, exceto o Cloranfenicol (Laborclin®).

Diante dos resultados, determinou-se o Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA), descrito por Krumperman (1983).

## **2.5 Análise estatística**

Utilizou-se a técnica de estatística descritiva para a análise microbiológica e para o teste de perfil de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A RDC n. 12 (BRASIL, 2001) recomenda a ausência de *Escherichia coli* em carnes ou produtos cárneos, e não estabelece critérios para a contagem de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* sp. para carnes ou carcaças, *in natura*, de bovinos, suínos e outros mamíferos. Para a interpretação dos resultados deste trabalho, foram utilizados os mesmos padrões microbiológicos usados por Moura (2006) e estabelecidos para carnes embaladas a vácuo, não maturadas, onde a tolerância para coliformes termotolerantes é de  $10^4$  NMP/cm<sup>2</sup> e para *Staphylococcus* sp. coagulase positiva é de  $3 \times 10^3$  unidades formadoras de colônias (UFC)/cm<sup>2</sup>.

A TAB. 1 apresenta o NMP/cm<sup>2</sup> de coliformes termotolerantes agrupados em intervalos. Todas as contagens estão dentro dos limites estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001). Os dados divergem dos encontrados por outros autores com amostras coletadas em estabelecimentos com abate clandestino, como Fernandes *et al.* (2009) e Moura (2006). Os primeiros, em pesquisa com o mesmo tipo de carne no estado de Pernambuco, encontraram 100% das amostras com contagem além do permitido para o mesmo grupo de microrganismos. Para os pesquisadores, essa situação pode ter diversas origens desde o abate, com a contaminação da carne por meio da manipulação inadequada das vísceras intestinais, até o uso de água contaminada, agravado pela falta ou refrigeração inadequada do produto.

TABELA 1  
Contagem de coliformes termotolerantes de amostras de carcaças de ovinos de um estabelecimento em Montes Claros – MG, coletadas entre mar. – jun. de 2010

NMP/cm <sup>2</sup>	Frequência	
	Número de carcaças	%
<3,0 x 10 <sup>0</sup> a 3,6 x 10 <sup>0</sup>	17	47,22
6,1 x 10 <sup>0</sup> a 1,1 x 10 <sup>1</sup>	7	19,44
1,5 x 10 <sup>1</sup> a 4,3 x 10 <sup>1</sup>	7	19,44
2,4 x 10 <sup>2</sup> a 4,6 x 10 <sup>2</sup>	2	5,56
1,1 x 10 <sup>3</sup> a >1,1 x 10 <sup>3</sup>	3	8,34

Fonte: Da autora.

Moura (2006), em trabalho realizado no mesmo Estado, cita o alto índice de clandestinidade, que se estima superior a 90%, no abate de animais, prática considerada problemática para a saúde pública, não apenas nesse local, visto que expõe o consumidor a doenças. Nessa pesquisa, a autora avaliou a qualidade sanitária da carne de caprinos comercializada e encontrou 62,5% de amostras fora dos padrões estabelecidos para coliformes termotolerantes, indicando condições sanitárias insatisfatórias para o consumo humano.

No trabalho em Montes Claros - MG, mesmo as contagens mais elevadas das amostras positivas para coliformes termotolerantes estão abaixo do estipulado na RDC n. 12 (BRASIL, 2001). Isso não garante a inocuidade das carcaças (SILVA *et al.*, 2007), pelo contrário, reforça a necessidade da fiscalização do abate à comercialização. Quando o abate ocorre sob fiscalização, a presença de coliformes e contaminantes em geral tende a ser menor, por causa do maior rigor exigido nos processos, conforme observado por Martineli *et al.* (2009) na amostragem de carcaças de ovinos em frigorífico inspecionado no estado de São Paulo.

Os coliformes são bons indicadores de falhas nos processos de higienização, uma vez que são facilmente inativados por sanitizantes (SILVA *et al.*, 2007), e os termotolerantes estão intimamente ligados à presença de

*E. coli* e outros enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Adam; Brülisauer (2010) e Zweifel *et al.* (2008) afirmam a necessidade de implantar as boas práticas de higiene no abatedouro para corrigir as falhas, reduzir a probabilidade de ocorrência da contaminação e melhorar a qualidade e a segurança da carne.

No presente trabalho foi verificada a presença de *E. coli* em dezesseis (44,4%) das 36 amostras analisadas, índice alto e compatível com o de outros autores. Fernandes *et al.* (2009) e Yilma *et al.* (2007) identificaram o patógeno em 100% e 33% das amostras coletadas em carcaças de ovinos e alimentos de origem animal, respectivamente. Em contrapartida, nas pesquisas de Chapman *et al.* (2001) e Nastasijevic *et al.* (2009) com carcaças de ovinos e bovinos, respectivamente, os resultados obtidos apontaram a presença de *E. coli* em 0,7% e 2,8%, nessa ordem. A variação dessa bactéria nos alimentos oscilou de acordo com as condições de higiene e refrigeração apresentadas no momento da coleta.

Etcheverría *et al.* (2010), na Argentina, investigaram a presença de *E. coli* O157 em carcaças e cortes de carne bovina no decorrer da cadeia produtiva. Perceberam o incremento de aproximadamente 13% na ocorrência desse microrganismo entre os locais de abate formal até os estabelecimentos de venda, caracterizando um transporte ineficiente, em veículo não refrigerado ou com refrigeração inadequada, possivelmente com instalações mal higienizadas. A situação, segundo os autores, representa risco para os consumidores e desafio para o serviço de controle sanitário da carne.

A presença de *E. coli* nas carcaças normalmente é consequência de contaminação cruzada no abate com a manipulação incorreta das vísceras, por isso os pontos críticos de controle como a pele, o conteúdo intestinal, as mãos, as facas, os aventais e os pisos precisam ser monitorados na verificação das operações (GUN *et al.*, 2003). O alto índice de amostras positivas para essa bactéria em Montes Claros e em outros locais evidencia a falta de atenção ou o descuido em pelo menos um dos pontos do processo, compromete a qualidade do produto e dificulta o contínuo crescimento do mercado.

Na pesquisa de *Staphylococcus* sp. em carcaças de ovinos, nove (25,0%) das 36 amostras foram positivas para a produção de coagulase, sendo sete confirmadas como *Staphylococcus aureus*. A contagem de *S. aureus* e de *Staphylococcus* sp. coagulase positiva variou de  $1,2 \times 10^4$  a  $7,2 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>, conforme TAB. 2, valores muito acima do limite máximo estabelecido pela RDC n. 12, de  $3 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>.

TABELA 2  
Contagem de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus* sp. coagulase positiva de amostras de carcaças de ovinos de um estabelecimento em Montes Claros – MG, coletadas entre mar. – jun. 2010

UFC/cm <sup>2</sup>	Frequência	
	Número de carcaças	%
$1,2 \times 10^4$ a $9,9 \times 10^4$	6	66,7
$2,1 \times 10^5$ a $7,2 \times 10^5$	3	33,3

Fonte: Da autora.

Os percentuais de *S. aureus* e *E. coli* encontrados no presente trabalho foram próximos aos obtidos por Bhandare *et al.* (2007) quando compararam o número de bactérias isoladas em carcaças de ovinos e caprinos abatidos e processados em abatedouros regularizados e informais na Índia. A média das porcentagens foi de 19% de *S. aureus* nas amostras colhidas nos estabelecimentos regularizados e 29% nas amostras dos estabelecimentos informais, enquanto *E. coli* foi verificada em 13,4% e 47,9% das amostras, respectivamente.

A explicação, segundo os pesquisadores, da alta incidência desses dois microrganismos nos locais considerados clandestinos pode ser dada pela infraestrutura precária formada por pisos, paredes e bancadas fora das recomendações, que podem dificultar a limpeza do local, o escoamento da água e do esgoto, aliado ao fato da higienização deficiente dos utensílios, da falta de atenção com a saúde do manipulador e da ausência de um profissional responsável pelo acompanhamento do processo.

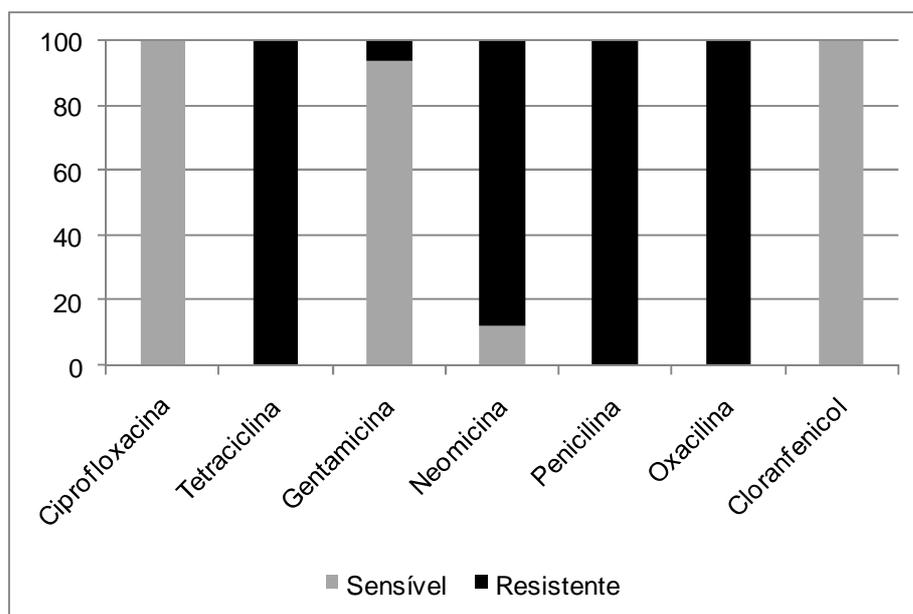
A manipulação inapropriada e o armazenamento de alimentos em temperaturas inadequadas favorecem o crescimento de estafilococos e a produção de toxina (VERAS *et al.*, 2008). Assim, no presente trabalho, a manipulação incorreta ou intensa pode ter influenciado a obtenção de valores elevados. Como os manipuladores são peças-chave na disseminação do *S. aureus* (NORMANO *et al.*, 2005), fortalece-se a necessidade de orientações e treinamentos constantes para cumprirem com o objetivo de reduzir a contaminação cruzada e a possibilidade de intoxicação alimentar estafilocócica.

O gênero *Staphylococcus* sp. é termolábil e pode ser destruído após o processo normal de cocção. Contudo, sua enterotoxina produzida previamente no alimento é termorresistente e pode permanecer ativa por vários dias (FERNANDES *et al.*, 2009). Para produzir quantidade de toxina suficiente para provocar os sintomas de intoxicação, a população de *S. aureus* deve ser superior a  $10^6$  UFC/g de alimento (SILVA *et al.*, 2007); entretanto, Lamaita *et al.* (2005) detectaram pelo menos uma toxina em contagens de *Staphylococcus* sp. a partir de  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL, o que mostra o risco representativo dos isolados da carne de ovino do presente trabalho. Independente do tipo de microrganismo, medidas de higiene devem ser aplicadas para controlar ou reduzir a carga bacteriana dos cortes de ovinos, aumentando a segurança dos alimentos e a vida útil do produto final (OSÉS *et al.*, 2010).

A utilização de fármacos no combate aos microrganismos revolucionou o tratamento médico. Por outro lado, o uso indiscriminado de antibióticos favoreceu o aparecimento de bactérias resistentes. Isso ocorre devido ao processo de adaptação genética dos organismos às mudanças no seu meio ambiente (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Os resultados dos testes de sensibilidade e de resistência aos antibióticos para as dezesseis cepas de *E. coli* encontram-se no GRAF. 1. Esse teste indicou a Ciprofloxacina e o Cloranfenicol como os dois antimicrobianos mais eficazes contra as bactérias identificadas (100% de sensibilidade), seguidos da Gentamicina, com 94%. O índice de resistência

múltipla (IRMA) variou de 0,42 a 0,71, revelando a resistência de 100% das cepas a pelo menos três antibióticos.



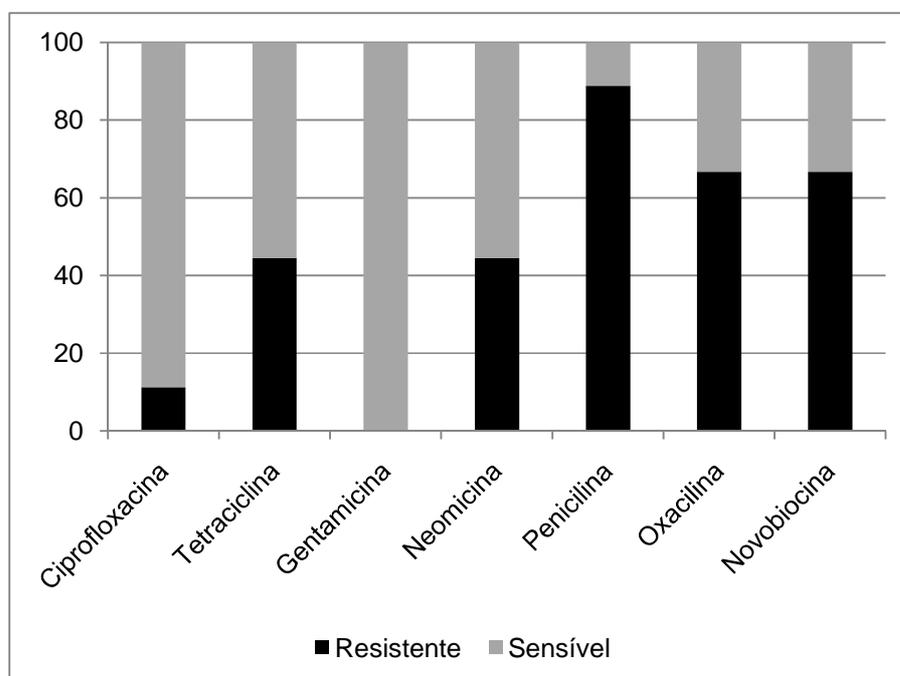
**GRÁFICO 1** - Perfil da sensibilidade e resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de dezesseis carcaças de ovinos comercializadas em Montes Claros – MG

Fonte: Da autora.

Em estudos diversos, pesquisadores observaram o perfil de resistência ou sensibilidade semelhante ao encontrado neste trabalho. Os antibióticos muitas vezes não eram os mesmos, mas pertenciam à mesma classe. Solomakos *et al.* (2009), ao isolarem *E. coli* O157:H7 de alimentos e testarem o perfil de sensibilidade, atribuíram à Tetraciclina o melhor desempenho inibitório, seguida pela Gentamicina. Assim como na pesquisa com a carne de ovinos em Montes Claros, 100% das amostras apresentaram multirresistência. Eles encontraram resistência de quase metade das cepas ao Cloranfenicol, um antibiótico proibido em produção animal, mas específico para o combate às enterobactérias, isso indica possibilidade de mutação da *E. coli*.

Cardoso *et al.* (2006), em análise da resistência antibiótica de *Salmonella enteritidis* de carcaças de frango obtiveram 100% das amostras resistentes à Tetraciclina e sensíveis, em igual percentagem, à Ciprofloxacina, seguida da Gentamicina. Os autores enfatizam a necessidade da busca de informações sobre a concentração inibitória mínima das substâncias para evitar a adaptação dos patógenos às grandes concentrações.

O teste de sensibilidade e resistência aplicado às nove cepas de *Staphylococcus* sp. coagulase positiva é demonstrado no GRAF. 2. Os resultados apontam a Gentamicina como o antibiótico mais eficaz na eliminação dessas bactérias, com 100% de sensibilidade, seguida pela Ciprofloxacina com 88,8%. O IRMA variou de 0,42 a 0,71, e 67% dos isolados mostraram-se resistentes a, no mínimo, três antibióticos.



**GRÁFICO 2** - Perfil da sensibilidade e resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* sp. coagulase positiva isoladas de dezesseis carcaças de ovinos comercializadas em Montes Claros – MG

Fonte: Da autora.

Moura (2006) encontrou 100% de sensibilidade bacteriana à Norfloxacin, substância pertencente à mesma classe da Ciprofloxacina, com 70,37% das amostras multirresistentes. Os antibióticos trabalhados nas pesquisas são utilizados no tratamento de seres humanos e de animais. O uso sem controle dessas substâncias pode ser o responsável pela resistência frequentemente diagnosticada. Silveira *et al.* (2006) relataram a adaptação das cepas e a capacidade em superar até os antibióticos mais potentes e promissores, como a Oxacilina.

Pereira *et al.* (2009) apresentaram dados de resistência aos antimicrobianos testados em cepas de *S. aureus* com 15% dos isolados sensíveis a todos os antibióticos empregados no teste, e 51% das amostras com perfil intermediário ou resistente a pelo menos três substâncias. Os resultados comprovam a adaptação desses patógenos, obriga a indústria a buscar novas alternativas de compostos antimicrobianos ou ainda aumentar as doses ou as concentrações desses princípios utilizados no tratamento das infecções, trazendo prejuízos à saúde dos indivíduos.

Tavares (2000) cita a resistência superior a 70% de *Staphylococcus* sp. à classe das Penicilinas (beta-lactâmicos), como observado no teste apresentado anteriormente, e destaca o índice de resistência às penicilinas antiestafilocócicas, criadas como alternativa de combate a esses patógenos, de até 66%, o mesmo encontrado nesta investigação. Para um novo antibiótico ser proveitoso por longo prazo é importante a adoção de medidas de controle na sua utilização, aplicando-os apenas em diagnósticos nos quais se justifique agente mais potente e não convencional. Essa atitude evitará o surgimento prematuro de cepas resistentes. A resistência bacteriana é um sério problema de saúde pública, merecedor de abordagem sob vários aspectos (SILVEIRA *et al.*, 2006). É importante pesquisar novos princípios com ação bactericida, menos agressivos à população e ao meio ambiente, como os óleos essenciais.

Os resultados dos isolados e as situações apresentadas expõem a má qualidade higiênico-sanitária das amostras, aspecto merecedor de verificação mais intensa e a rigorosa aplicação dos princípios do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para analisar, barrar e corrigir

as falhas existentes no processo produtivo e evitar surtos de doenças transmitidas por alimentos. Desmarchelier *et al.* (2007) recomendam o uso de um sistema integrado para atenuar os riscos. Baseiam-se na associação do APPCC com a pesquisa de patógenos, o monitoramento de resíduos, a aplicação adequada da cadeia de frio, de novas tecnologias, a informação e a educação do consumidor, dentre outras ações. Para os autores, o sistema deve ser empregado para garantir a segurança e a qualidade da carne e de todos os produtos elaborados para o consumo humano.

O treinamento de profissionais manipuladores e a utilização dos conhecimentos existentes, comprovadamente eficazes, são necessários para estender o prazo de validade, aumentar a confiabilidade do produto e ajudar a alavancar as vendas da carne de ovino, sem comprometer o bem-estar dos indivíduos.

Em Montes Claros - MG, a ausência do local adequado para o abate de animais e a falha na fiscalização dos estabelecimentos incentivam a clandestinidade e expõem o consumidor ao risco. A implantação de práticas adequadas, ao longo da cadeia produtiva, no mínimo, reduzirá o número de patógenos, favorecendo a comercialização da carne de ovino na cidade.

#### **4 CONCLUSÃO**

Conclui-se que as carcaças de ovinos comercializadas no estabelecimento em Montes Claros – MG apresentam elevada carga microbiana e a presença de patógenos alimentares. O alto índice de resistência múltipla das cepas aos antibióticos, associado à incidência das bactérias, representa risco à saúde pública.

### **CAPÍTULO 3 - EFEITO INIBITÓRIO E ATIVIDADE DESINFETANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALFAVACÃO E CRAVO-DA-ÍNDIA CONTRA *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE OVINOS**

#### **RESUMO**

Verificou-se a efetividade dos óleos essenciais de cravo e alfavacão em reduzir a contagem de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* inoculadas em carne de ovino. Foram utilizadas quatro cepas e sete concentrações dos óleos nas técnicas de disco-difusão e macrodiluição em caldo empregadas na análise do efeito inibitório. No teste de suspensão, trabalhou-se com duas cepas e duas concentrações na determinação da atividade desinfetante. A inibição foi observada nas concentrações de 400, 200 e 100 µL/mL. O óleo de cravo foi melhor em relação ao alfavacão para inativar as bactérias isoladas das carcaças de ovinos. A concentração bactericida mínima dos óleos contra os inóculos variou de 50 a 200 µL/mL. O teste de suspensão mostrou que após 5 minutos de contato com o desinfetante de cravo na concentração de 400 µL/mL os inóculos foram completamente inativados. Os resultados mostraram significativa atividade bactericida e bacteriostática dos óleos essenciais frente aos patógenos.

Palavras-chave: Antisséptico. Microrganismos. *Ocimum gratissimum* L.. Segurança alimentar. *Syzygium aromaticum* L..

**CHAPTER 3 – INHIBITORY EFFECT AND DISINFECTANT ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OF ALFAVACÃO AND CLOVE AGAINST *Escherichia coli* AND *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM SHEEP CARCASSES**

**ABSTRACT**

*Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum gratissimum* L. essential oils were tested for their effectiveness in reduction the counts of inoculated *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in sheepmeat. The inhibitory effect was analysed by disk diffusion and broth macrodilution method with four strains and seven concentrations. Disinfectant activity of the oils was assessed using the suspension test with two strains and two concentrations. The inhibition was observed at concentrations 400, 200 and 100 µL/mL. *Syzygium aromaticum* L. oil was better than *Ocimum gratissimum* L. against bacteria isolated from sheep carcasses. The minimum bactericidal concentration of the essential oils against inocula ranged from 50 to 200 µL/mL. The suspension test showed that after 5 minutes of contact, *Syzygium aromaticum* L. disinfectant at 400 µL/mL deactivated the inoculants completely. The results demonstrated that essential oils exerted a significant bactericidal and bacteriostatic action against pathogens.

Keywords: Antiseptic. Microorganisms. *Ocimum gratissimum* L.. Food safety. *Syzygium aromaticum* L..

## 1 INTRODUÇÃO

Os alimentos são excelentes veículos de disseminação de patógenos como bactérias, vírus e parasitas (NEWELL *et al.*, 2010). Muitos desses são causadores de doenças, como as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Vários contaminantes microbiológicos pertencem à família *Enterobacteriaceae* (YILMA *et al.*, 2007). Nos últimos vinte anos, diferentes casos de diarreia foram atribuídos ao consumo de comida contendo *E. coli* produtora de toxina (HUSSEIN; BOLLINGER, 2005; NEWELL *et al.*, 2010), *Shigella* ou *Salmonella* (BOROWSKY *et al.*, 2006; BRASIL, 2005). Já os estafilococos são frequentemente relacionados aos surtos de doenças transmitidas por alimentos devido à capacidade de algumas cepas produzirem enterotoxinas (VIÇOSA *et al.*, 2010).

Muitos dos organismos patogênicos apresentam resistência aos antibióticos tradicionalmente utilizados, devido ao uso indiscriminado e inadequado dessas drogas (SARTORATTO *et al.*, 2004). Além disso, existem no mercado produtos com efeito antisséptico moderado ou mesmo insuficiente (PITTEN *et al.*, 2003), tornando-se notória a necessidade da descoberta de novas substâncias com ação antimicrobiana (DUARTE *et al.*, 2007).

Os gêneros alimentícios podem sofrer deterioração microbiana durante sua vida útil. No semiárido brasileiro, os ovinos de corte dos pequenos produtores são abatidos e vendidos, geralmente, sem condições higiênicas apropriadas, afetando a qualidade sensorial e microbiológica da carne (SÁ *et al.*, 2007). A carne de ovino é macia, suculenta, de aroma característico e de importância econômica considerável (COSTA *et al.*, 2008). O mercado consumidor desse produto cresce a passos largos devido ao maior consumo (BARROS *et al.*, 2003).

Ultimamente, observa-se o aumento da demanda dos consumidores por produtos seguros (RAJKOVIC *et al.*, 2010; TODD, 2003), naturais e isentos de conservantes químicos, levando a indústria a investigar elementos

capazes de conservar e melhorar as características sensoriais, mantendo as propriedades nutricionais dos alimentos (GOÑI *et al.*, 2009).

As pesquisas para o controle de contaminantes microbiológicos foram intensificadas e os tratamentos físicos, químicos e biológicos, empregados isoladamente ou em conjunto, têm reduzido de forma significativa a contaminação de superfícies de carnes e carcaças (HUGAS; TSIGARIDA, 2008). Estudos comprovaram a ação bactericida e/ou bacteriostática de especiarias, condimentos e extratos ou óleos essenciais. Os óleos essenciais, metabólitos secundários isolados de plantas, conquistaram o mercado e o gosto dos consumidores pelos benefícios apresentados à saúde e o menor impacto ambiental (PEREIRA *et al.*, 2008). Dentre as plantas e os condimentos já pesquisados e utilizados estão o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e o alfavacão (*Ocimum gratissimum* L.).

O cravo-da-índia é uma especiaria oriental, utilizada na culinária (BRUNETON, 1995), devido ao *flavor* marcante atribuído ao eugenol, principal constituinte do óleo (MAZZAFERA, 2003) e responsável pelas ações antimicrobiana e antioxidante desse elemento (SCHERER *et al.*, 2009). O alfavacão, ou alfavaca-cravo, é uma planta aromática, conhecida pelos aspectos medicinais (Di STASI *et al.*, 2002) e uso na culinária (PEREIRA; MAIA 2007). O óleo produzido pela espécie é eficaz no combate a diversos patógenos (MARTINS *et al.*, 2009; ORAFIDIYA *et al.*, 2006).

Assim, objetivou-se avaliar o efeito inibitório, a concentração bactericida mínima e a atividade desinfetante dos óleos essenciais de cravo-da-índia e alfavacão frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de carcaças de ovinos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Procedeu-se conforme as orientações da *American Public Health Association* (APHA), descritas no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES; ITO, 2001).

### 2.1 Coletas de amostras

Foram coletadas amostras de 36 carcaças, recolhidas durante três visitas em açougue de Montes Claros – MG, entre os meses de março e junho de 2010. O abate dos animais era realizado de modo informal e acontecia em local distinto ao da venda do produto, conforme informações do proprietário do estabelecimento.

Empregou-se a técnica do esfregaço de superfície em cinco pontos (pescoço, paleta, costelas, lombo e pernil), sendo os *swabs* transportados em frascos com 50 mL do diluente água peptonada a 0,1% (Himedia®) (MIDURA; BRYANT, 2001). Os volumes dos frascos com os *swabs* (solução  $10^{-1}$ ) foram homogeneizados em água peptonada 0,1% e, em seguida, sofreram diluição para a obtenção das outras duas soluções ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) (SWANSON *et al.*, 2001).

Recolhidas, as amostras seguiram em recipiente resfriado para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, na mesma cidade, sendo cultivadas no mesmo dia.

### 2.2 Pesquisa de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

A determinação do número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes foi calculada com série de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (Oxoid®) por diluição, incubados a 35-37 °C por 24 horas para o teste presuntivo. As amostras positivas (crescimento com produção de gás) foram repassadas para tubos com caldo EC (Acumedia®), incubados a 45,5 °C por 48 horas. Para a confirmação de *Escherichia coli*, usou-se o meio ágar

Levine Eosina Azul de Metileno (Oxoid®) com as placas incubadas a 35 °C por 24 horas, e as colônias positivas repassadas para tubos inclinados contendo o ágar Padrão para Contagem (Acumedia®), incubados a 35 °C por 24 horas. As cepas características foram submetidas às provas bioquímicas de citrato, indol, vermelho de metila e Voges-Proskauer (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

### **2.3 Pesquisa de *Staphylococcus* sp.**

De cada diluição foi retirado 0,1 mL e inoculado na superfície de placas de ágar Baird-Parker (Himedia®), incubadas invertidas em temperatura de 35 °C por 48 horas. As colônias típicas de estafilococos (circulares, pretas ou cinza-escuro, medindo de 2 a 3 mm de diâmetro, lisas, convexas, massa de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente) foram contadas e transferidas para tubos com caldo Infusão Cérebro Coração ou Brain Heart Infusion (Himedia®), incubados por 24 horas a 35 °C. Após esse período, realizou-se o teste de coagulase com a adição de 0,2 mL das culturas obtidas em BHI a 0,5 mL de Coagulase Plasma-EDTA (Fluka®), incubados a 35-37 °C durante 6 horas com a verificação posterior da presença ou ausência de coágulo (LANCETTE; BENNETT, 2001).

### **2.4 Material vegetal e extração dos óleos essenciais**

A extração dos óleos essenciais foi realizada por meio da hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado. Foram cinco extrações com 188 g cada de folhas frescas do alfavacão coletadas no Horto de Plantas Medicinais do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, e duas extrações utilizando em cada uma 118 g de inflorescências do cravo-da-índia adquiridas no comércio de Montes Claros. As amostras foram acondicionadas, separadamente, em balões de 1 litro e mantidas em ebulição por 3 horas, em temperatura constante. O teor foi expresso em volume de óleo por massa seca do material utilizado na extração (SOUZA *et al.*, 2010).

O exemplar coletado do alfavacão foi identificado pelo professor Alexandre Salino e a exsicata está depositada no Herbário BHCB da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o número 150123.

## 2.5 Análise cromatográfica dos óleos essenciais

As análises qualitativas para identificação dos constituintes dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais - Centro de P&D Recursos Genéticos Vegetais, do Instituto Agrônomo de Campinas, em Campinas – SP.

A separação e a quantificação (método de normalização de área) das substâncias foram realizadas em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010), sob as seguintes condições de análise: coluna capilar DB-5 (J&W Scientific; 30,0 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m); temperaturas do injetor e do detector mantidas, respectivamente, em 220 °C e 230 °C; gás hélio para arraste, com vazão de 1,0 mL/min); split: 1/20; diluição: 1  $\mu$ L de amostra/1 mL de acetato de etila; volume de injeção: 1  $\mu$ L; programação da coluna com temperatura inicial de 60 °C, sendo acrescidos 3 °C a cada minuto até atingir 240 °C.

A identificação das substâncias foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando por impacto de elétrons (70eV), nas mesmas condições cromatográficas descritas acima, exceto em relação a coluna capilar: OV-5 (Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.; 30,0 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m). A identificação dos compostos foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.) e o índice de retenção de Kovats (ADAMS, 2007). Para a obtenção dos índices de retenção das substâncias (IR), empregou-se uma mistura padrão de hidrocarbonetos ( $C_9$ - $C_{24}$ ), injetados nas mesmas condições operacionais das amostras, aplicando-se a equação de Van den Dool; Kratz (1963).

## 2.6 Avaliação da atividade inibitória e bactericida dos óleos

Para a avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos óleos de *Syzygium aromaticum* L. e *Ocimum gratissimum* L. frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas das carcaças de ovinos e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8733, utilizaram-se as metodologias de macrodiluição em caldo e de difusão em placas do Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2003a, b).

Na difusão em placas, uma alíquota de cada estirpe foi repicada em caldo BHI (Himedia®) e em seguida levada para a estufa a 37 °C por 24 horas, para ativação. As culturas ativadas foram repicadas em ágar TSA (Tryptic Soy Ágar Himedia®) e incubadas sob as mesmas condições anteriores. O inóculo foi preparado colocando-se cinco colônias isoladas das placas em 5 mL de solução salina. Ajustou-se a turbidez ao equivalente à solução padrão de McFarland 0,5 (CLSI, 2003b).

Semeou-se com o auxílio de *swab* estéril 200 µL do inóculo na superfície de placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Himedia®). Discos de papel-filtro Whatman número um, 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL de cada concentração-teste foram distribuídos pela placa de maneira uniforme, com o auxílio de pinça esterilizada.

Para a primeira concentração, utilizaram-se 400 µL de óleo essencial, 27 µL de Tween 80 e o volume completado para 1 mL com água destilada estéril, conforme metodologia proposta por Oliveira *et al.* (2006). Auxiliado pelo vortex, agitou-se o volume final por 5 minutos. As concentrações avaliadas foram de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µL/mL, obtidas pelo método de diluição seriada em razão dois (CLSI, 2003a). Disco de papel impregnado com Tween 80 representou o controle negativo, enquanto discos de antibióticos comerciais serviram como controle positivo, sendo usados Gentamicina 10 µg e Oxacilina 1 µg nas placas com *Staphylococcus* sp. e Ciprofloxacina 5 µg e Oxacilina 1 µg nas placas com *Escherichia coli*, todos da marca DME®. As placas seguiram para a estufa por 24 horas, a 37 °C. Finalizado o período de incubação, mediu-se e registrou-se em milímetros,

com o auxílio de uma régua, o diâmetro da zona de inibição do crescimento microbiano.

O experimento foi realizado segundo um delineamento em blocos casualizados. O esquema fatorial foi de 4 x 2 x 7, sendo quatro bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isolados da carcaça de ovinos e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8733), dois óleos e sete concentrações, totalizando 56 tratamentos com duas repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, pelo programa SAEG 9.1, e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

No teste da concentração bactericida mínima, empregou-se a técnica de macrodiluição em caldo descrita por Chanwitheesuk *et al.* (2007), com modificações. Foram testadas as sete concentrações trabalhadas no teste de difusão, utilizando-se os mesmos princípios de diluição seriada, porém, substituindo-se a água destilada pelo caldo BHI (Himedia®), preservando-se os volumes. No final, acrescentaram-se 2,5 µL de cada inóculo obtido a partir dos isolados da carne de ovinos, ajustados de forma equivalente à solução padrão de McFarland 0,5 e mantiveram-se os tubos por 24 horas incubados a 37 °C. Após a incubação, uma alíquota de cada tubo foi semeada em placas com ágar TSA (Tryptic Soy Ágar Himedia®) e essas encaminhadas à estufa nas mesmas condições. A ausência do crescimento bacteriano foi definida como a CBM. O teste foi desenvolvido em duplicata.

## **2.7 Verificação da eficiência dos óleos como desinfetantes**

Na determinação da atividade desinfetante empregou-se a metodologia trabalhada por Medeiros *et al.* (2009), com técnicas do teste de suspensão descritas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1993). Foram testadas as concentrações de 400 e 200 µL/mL, as mais efetivas no teste de difusão em placas e da concentração bactericida mínima, de cada óleo essencial contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8733. As suspensões bacterianas foram elaboradas em solução salina 0,85%, equivalente à solução padrão de McFarland 0,5, com aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

O volume de 900 µL dos desinfetantes - os mesmos trabalhados no item 2.5, elaborados com os óleos essenciais, Tween 80 e água destilada – foi distribuído assepticamente em tubos e somado a 100 µL de matéria orgânica estéril que se tratava de 10 g de carne de ovino, batida com 100 mL de água destilada e tinalizada uma vez por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 10 µL da suspensão bacteriana e cronometrados os tempos de exposição. Após 5, 15, 30 e 60 minutos, por meio de alça bacteriológica, repicou-se uma alíquota em tubos contendo 5 mL de caldo Brain Heart Infusion (Himedia®), agitados e incubados a 37 °C por 96 horas. Também no tempo de 5 minutos, alíquotas foram semeadas em ágar Baird-Parker (Himedia®) e EMB (Oxoid®) para contagem do número de colônias após esse período de contato entre a solução desinfetante, a matéria orgânica e o inóculo. Após a inoculação, as placas seguiram para a estufa a 37 °C por 24 horas.

Nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas averiguou-se a turvação dos tubos, a formação de película na superfície e/ou de precipitado no fundo da vidraria. A turvação ou não era considerada, respectivamente, bactéria ativa (resultado negativo) ou inativa (positivo). Os tubos classificados como positivos foram repicados em meios sólidos específicos para *S. aureus* (Baird-Parker, Himedia®) e *E. coli* (EMB, Oxoid®), incubados a 37 °C por 24 horas, para confirmação da eficácia do desinfetante por meio da ausência de crescimento bacteriano nas placas.

O teste com cada concentração foi realizado em duplicata e empregou-se a análise estatística descritiva.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

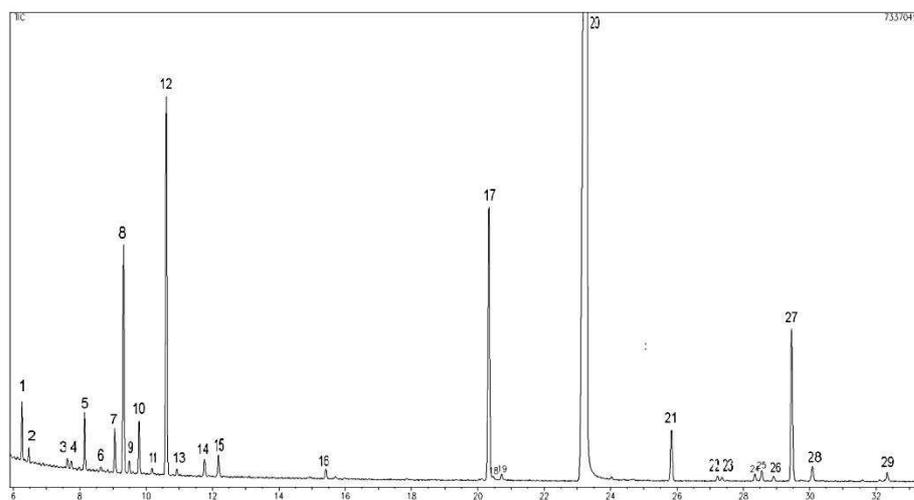
#### 3.1 Rendimento e caracterização química dos óleos essenciais

O rendimento dos óleos essenciais, 2,77% do alfavacão e 5,04% do cravo, foi melhor do que o encontrado na literatura consultada. Pereira (2006) obteve da inflorescência de *Syzygium aromaticum* L. o rendimento de 2,32% enquanto a literatura relata a variação de 0,29% a 1,12% no rendimento do *Ocimum gratissimum* L. (CRAVEIRO *et al.*, 1981; FARIA *et al.*, 2006; NGASSOUM *et al.*, 2003). Essas variações, de acordo com Cimanga *et al.* (2002), podem ser atribuídas a fatores como o clima, a idade da planta, a época da colheita e a forma de extração. Silva *et al.* (1999) demonstraram a influência da luz solar na produção de eugenol. O teor desse composto aromático variou de 98,0% no óleo extraído das folhas de *Ocimum gratissimum* L. colhidas às 12 h, a 11,4% na coleta das 17 h.

O composto majoritário define o quimiotipo do *Ocimum gratissimum* L. (SILVA *et al.*, 2010). De acordo com a análise cromatográfica (GRAF. 1 e TAB. 1, APÊNDICE A), esse composto é o eugenol (61,28%). Silva *et al.* (1999) citam a existência de dois tipos químicos de *Ocimum gratissimum* L., o timol e o eugenol, e Freire *et al.* (2006) acrescentam à lista o geraniol.

O eugenol é o principal agente bacteriano presente no óleo extraído das folhas do alfavacão, mas verificou-se também a presença do timol, reconhecido antimicrobiano (BURT, 2004), como um dos componentes (8,07%). Cimanga *et al.* (2002) especulam o envolvimento dos constituintes menos abundantes, como o timol, o carvacrol, o linalol e o  $\gamma$ -terpineno, na atividade biológica dos óleos. Para Maciel *et al.* (2002), os inúmeros constituintes das plantas, com compostos de classes ou estruturas diferentes, contribuem para a mesma atividade. Essa responsabilidade não cabe apenas às substâncias presentes em maiores proporções sendo sugerido, inclusive, o efeito sinérgico entre os componentes. Bakkali *et al.* (2008) corroboram essa afirmativa. Para eles, é mais significativo estudar os óleos em sua totalidade do que apenas alguns dos seus componentes, por se tratar de misturas complexas cujos efeitos biológicos podem ser resultantes das

principais moléculas presentes ou da sinergia entre todas as moléculas apontadas pela análise cromatográfica.

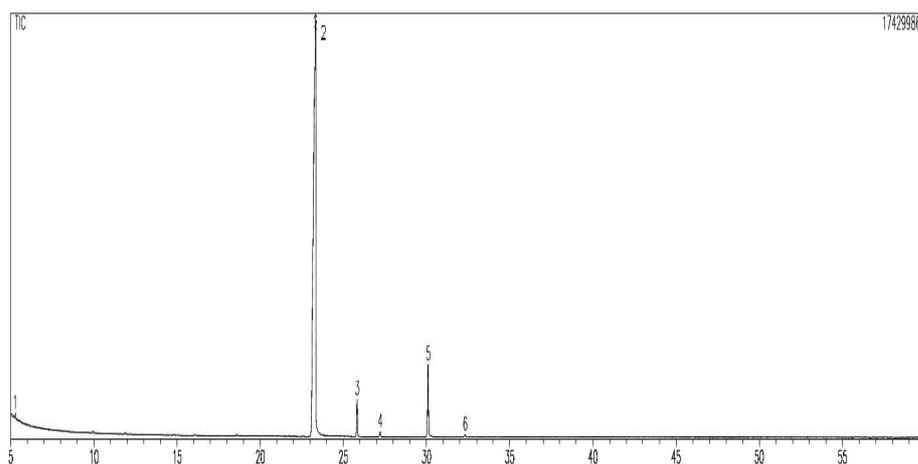


**GRÁFICO 1** -Cromatograma do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. analisado por cromatografia gasosa com detector de massas

Fonte: Instituto Agronômico de Campinas, 2011.

Nota: 1- triciclono, 2- $\alpha$ -pineno, 3-sabineno, 4-  $\beta$ -pineno, 5-mirceno, 6- $\alpha$ -felandreno, 7- $\alpha$ -terpineno, 8-p-cimeno, 9-limoneno, 10-*cis*- $\beta$ -ocimeno, 11-*trans*- $\beta$ -ocimeno, 12- $\gamma$ -terpineno, 13-substância não identificada, 14-m-cimeno, 15-linalol, 16- substância não identificada, 17-timol, 18-o-metoxiacetofenona, 19-carvacrol, 20-eugenol, 21-*trans*-cariofileno, 22- $\alpha$ -humuleno, 23- $\beta$ -farnesene, 24-germacreno D, 25- $\beta$ -selineno, 26- $\alpha$ -selineno, 27- $\beta$ -bisaboleno, 28-acetato de eugenila, 29-substância não identificada.

O composto fenólico eugenol também é o principal componente da essência do cravo-da-índia (GRAF. 2 e TAB. 2, APÊNDICE B). Estudado como conservante de alimentos (PEREIRA, 2006), é encontrado no cravo-da-índia e em outras plantas. São atribuídas a essa substância atividades como a antifúngica (FARIA *et al.*, 2006), antimicotoxigênica (DAMBOLENA *et al.*, 2010), antibacteriana (SANTURIO *et al.*, 2007) e antioxidante (PEREIRA; MAIA, 2007). Wenqiang *et al.* (2007) e Oliveira *et al.* (2009) também encontraram no óleo de *Syzygium aromaticum* L. o eugenol como princípio mais abundante.



**GRÁFICO 2** - Cromatograma do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* L. analisado por cromatografia gasosa com detector de massas

Fonte: Instituto Agrônômico de Campinas, 2011.

Nota: 1- substância não identificada, 2- eugenol, 3- *trans*-cariofileno, 4-  $\alpha$ -humuleno, 5- acetato de eugenila, 6- óxido de cariofileno.

### **3.2 Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***

No teste de difusão em placas, as cepas reagiram de forma diferente aos óleos, independente de ambos possuírem o eugenol como principal componente. As médias dos diâmetros dos halos encontram-se na TAB. 3. As zonas de inibição foram observadas em apenas três das sete concentrações (400, 200 e 100  $\mu\text{L/mL}$ ) (FIG. 1), o que fez cair a média dos resultados, mas não interferiu na interpretação dos mesmos. O halo de inibição é a área sem crescimento detectável de microrganismo a olho nu (CLSI, 2003b) e está diretamente relacionado à sensibilidade da amostra bacteriana (BRASIL, 2008)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> [www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo5/interpretacao.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/interpretacao.htm)

TABELA 3  
Diâmetros dos halos de inibição (mm) dos óleos essenciais de cravo e  
alfavacão contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Óleo	<i>S. aureus</i> de carcaças de ovinos	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> de carcaças de ovinos	<i>E. coli</i> ATCC 8733
	Diâmetro do halo (mm)			
Alfavacão	2,57 Bb	2,36 Ab	3,71 Ba	4,79 Aa
Cravo-da- índia	4,00 Ab	2,79 Ab	5,14 Aa	3,43 Ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. Letras maiúsculas comparam as médias nas colunas e, as minúsculas, nas linhas.

Fonte: Da autora.



**FIGURA 1** – Halos de inibição formados pelas concentrações do óleo de alfavacão

Fonte: Da autora.

As médias 4,00 mm e 5,14 mm mostram a melhor ação do óleo de cravo, comparado ao de alfavacão (2,79 e 3,43 mm), frente às bactérias isoladas da carne de ovino. O mesmo não foi observado com os microrganismos-padrão ATCC que, estatisticamente, responderam de forma análoga à atividade dos dois óleos. Os resultados relatados por Oussalah *et al.* (2007) e Pereira (2006) ratificam esses dados, pois os primeiros testaram 28 plantas contra *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e sete delas, dentre as quais o cravo, exibiram forte atividade antimicrobiana contra as quatro bactérias, e o segundo, igualmente atribuiu ao cravo-da-índia os melhores resultados de inibição para *E. coli* e *S. aureus*.

O óleo essencial do alfavacão foi mais efetivo contra as bactérias Gram-negativas, com médias de diâmetro iguais a 3,71 e 4,79 mm. No trabalho de Kotzekidou *et al.* (2008), dentre as espécies testadas, a mais sensível aos óleos e aos extratos vegetais era Gram-negativa e a mais resistente, Gram-positiva, corroborando os resultados encontrados. Em geral, as bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., são menos sensíveis à ação dos óleos essenciais. Isso provavelmente ocorre devido à dificuldade dos compostos agirem sobre a complexa estrutura da parede celular desses microrganismos (CIMANGA *et al.*, 2002; HOLLEY; PATEL, 2005). Burt (2004) cita outros estudos que fortalecem essa proposição. A parede celular das bactérias Gram-positivas é permeável e normalmente não restringe a passagem de antimicrobianos. A membrana externa das Gram-negativas favorece a resistência, pois não permite, ou pelo menos dificulta, a introdução das moléculas tóxicas no citoplasma ou outro local de destino (DENYER; MAILLARD 2002; LAMBERT, 2002).

O método de difusão em placas (difusão em disco ou difusão em ágar) é simples, confiável (BRASIL, 2008) e um dos mais utilizados nos testes de verificação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais (TAJKARIMI *et al.*, 2010), visto que averigua, de forma rápida, a suscetibilidade de vários microrganismos a muitas substâncias (PONCE *et al.*, 2003). Além da diversidade estrutural da célula, devem-se considerar as diferenças metabólicas entre os microrganismos (HOLLEY; PATEL, 2005), uma vez que

a ação antimicrobiana dos constituintes varia consideravelmente de acordo com a linhagem da espécie (SILVA *et al.*, 2009).

O efeito biológico dos compostos fenólicos, como o eugenol, e das essências em geral, é fácil ser observado nos experimentos, mas o mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado. Normalmente, considera-se como início do mecanismo a degradação da parede celular, provocando danos à membrana proteica e citoplasmática, a interrupção da força motriz de prótons, o fluxo de elétrons e o transporte ativo, favorecendo a coagulação do citoplasma (KOTZEKIDOU *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

De acordo com os resultados, 400 µL/mL foi a concentração mais efetiva para as cepas dois, três e quatro, com halos de 10,25, 12,25 e 13,75 mm (TAB. 4), respectivamente, sendo mais eficiente no óleo de cravo, com zona de inibição de 13,38 mm (TAB. 5). A cepa um reagiu de forma semelhante a 400 e 200 µL/mL. A pesquisa de Duarte *et al.* (2007) difere deste trabalho, visto que ao testarem a atividade de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais brasileiras contra diferentes sorotipos de *E. coli*, observaram atividade inibitória do alfavacão em concentrações entre 600 a > 1000 µL/mL, ou seja, no mínimo 50% superiores. Já Pereira (2006), com a essência de cravo testada em *S. aureus* e *E. coli*, observou a formação do halo de inibição em praticamente todas as concentrações, mas a mais efetiva para *S. aureus* foi de 50%, superior a este trabalho, e 10% para *E. coli*, resultado mais satisfatório. Em analogia, infere-se que 400 µL/mL representa 40% de óleo na solução.

TABELA 4  
Relação entre as concentrações dos óleos essenciais de  
alfavacão e cravo-da-índia e bactérias Gram-positivas e negativas

Bactéria	Concentração ( $\mu\text{L/mL}$ )						
	400	200	100	50	25	12,5	6,5
	Diâmetro do halo (mm)						
1	11,50 Aa	9,25 Aa	2,25 Bb	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab
2	10,25 Aa	6,00 Bb	1,75 Bc	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac
3	12,25 Aa	10,25 Ab	8,50 Ab	0 Ac	0 Ac	0 Ac	0 Ac
4	13,75 Aa	11,00 Ab	4,00 Bc	0 Ad	0 Ad	0 Ad	0 Ad

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. Letras maiúsculas comparam as médias nas colunas e, as minúsculas, nas linhas.

Fonte: Da autora.

Nota: 1- *Staphylococcus aureus* de carcaças de ovinos; 2- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 3- *Escherichia coli* de carcaças de ovinos; 4- *Escherichia coli* ATCC 8733.

Quanto menor a concentração inibitória, melhor para a aplicação em alimentos, pois esses compostos apresentam sabor e aroma marcantes e podem alterar as características organolépticas dos gêneros alimentícios (NEDOROSTOVA *et al.*, 2009; TAJKARIMI *et al.*, 2010). A utilização de óleos essenciais para favorecer a segurança dos alimentos é uma técnica viável (GOÑI *et al.*, 2009), mas determinada a concentração capaz de impedir o crescimento microbiano, qualquer mudança pode modificar a natureza do efeito inibitório (HOLLEY; PATEL, 2005), comprometendo a qualidade microbiológica do produto.

A concentração empregada é igualmente importante na verificação da atividade inibitória dos óleos essenciais (PONCE *et al.*, 2003), porque juntos podem apresentar efeito citotóxico na célula viva (BAKKALI *et al.*, 2008). Dificilmente um único antimicrobiano natural, por mais potente, poderá ser usado em uma única concentração de modo eficaz em todos os tipos de alimentos e contra todos os microrganismos (HOLLEY; PATEL, 2005; YOSSA *et al.*, 2010).

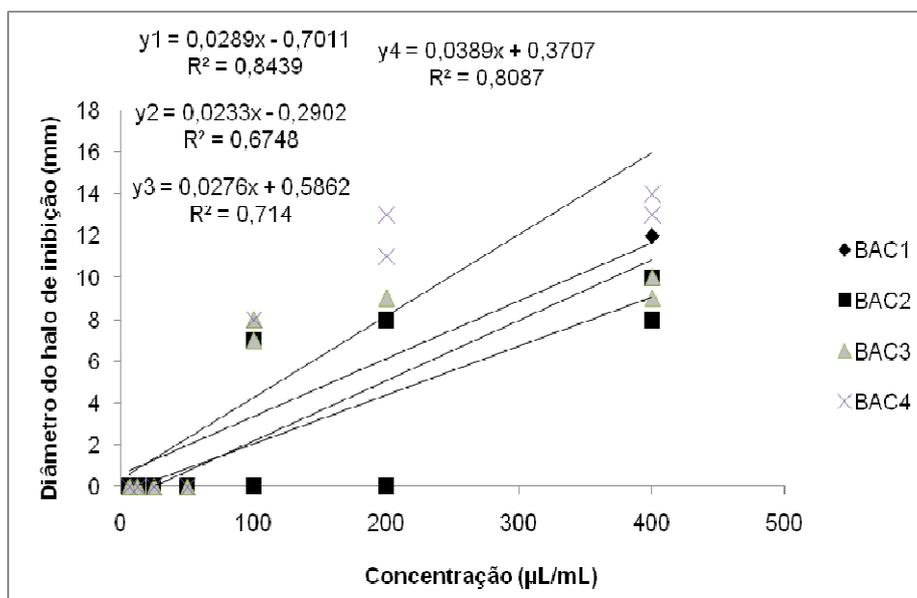
TABELA 5  
Relação entre as concentrações e os óleos essenciais de alfavacão e cravo-da-índia

Óleo	Concentração (µL/mL)						
	400	200	100	50	25	12,5	6,5
	Diâmetro do halo (mm)						
Alfavacão	10,50 Ba	8,25 Ab	4,75 Ac	0 Ad	0 Ad	0 Ad	0 Ad
Cravo-da-índia	13,38 Aa	10,00 Ab	3,50 Ac	0 Ad	0 Ad	0 Ad	0 Ad

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. Letras maiúsculas comparam as médias nas colunas e, as minúsculas, nas linhas.

Fonte: Da autora.

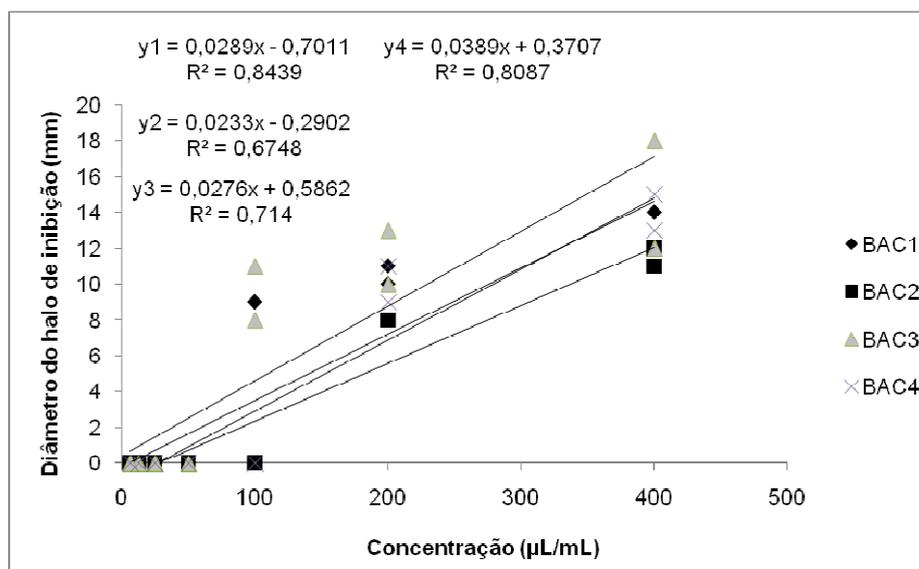
A atividade biológica dos óleos essenciais sobre *E. coli* e *S. aureus* está representada por equações de regressão nos GRAF. 3 e 4. Os resultados representados foram discutidos ao longo do texto e confirmam a ação e a potência dos princípios antimicrobianos. As retas mostram o comportamento do diâmetro do halo em relação à interação das bactérias com os óleos e às concentrações testadas. O efeito inibitório, a sensibilidade bacteriana representada pela zona de inibição, aumentou à medida em que houve o aumento da concentração, mas variou conforme o óleo aplicado e os microrganismos-teste. As concentrações abaixo de 100 µL/mL não demonstraram atividade biológica.



**GRÁFICO 3** - Halo de inibição (mm) determinado pelo efeito antimicrobiano do óleo essencial de alfavacão sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em função das concentrações testadas ( $\mu\text{L/mL}$ )

Fonte: Da autora.

Nota: BAC1- *Staphylococcus aureus* de carcaças de ovinos, BAC2- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, BAC3- *Escherichia coli* de carcaças de ovinos, BAC4- *Escherichia coli* ATCC 8733.



**GRÁFICO 4** - Halo de inibição (mm) determinado pelo efeito antimicrobiano do óleo essencial de cravo sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em função das concentrações testadas ( $\mu\text{L/mL}$ )

Fonte: Da autora.

Nota: BAC1- *Staphylococcus aureus* de carcaças de ovinos, BAC2- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, BAC3- *Escherichia coli* de carcaças de ovinos, BAC4- *Escherichia coli* ATCC 8733.

A concentração bactericida mínima (CBM) é definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de destruir completamente o inóculo (FU *et al.*, 2007; POZZO *et al.*, 2011). A tabela 6 apresenta os valores da CBM para cada estirpe e óleos testados.

**TABELA 6**  
Concentração bactericida mínima ( $\mu\text{L/mL}$ ) dos óleos essenciais de alfavacão e cravo-da-índia contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de carcaças de ovinos

Bactéria	Óleo	
	Alfavacão	Cravo-da-índia
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	50
<i>Escherichia coli</i>	200	100

Fonte: Da autora.

Os resultados demonstram menor concentração bactericida, 50 µL/mL, para o óleo de alfavacão frente a *S. aureus*, enquanto para *E. coli* o mesmo resultado só foi observado com 200 µL/mL, contrariando a resposta obtida no teste de difusão em placas executado anteriormente (TAB. 1). O método de diluição, seja a microdiluição, a macrodiluição ou a diluição em ágar, é aplicado para definir a menor concentração bactericida ou bacteriostática de um agente antimicrobiano (ALVES *et al.*, 2008). Esse é o mais eficaz para estabelecer a potência de uma substância pois, na metodologia da difusão, por exemplo, a possibilidade de falha é aumentada devido a possíveis equívocos na elaboração do meio de cultura, na densidade da suspensão, na medição do halo, na incubação por tempo e/ou temperatura inadequados etc (RÍOS; RECIO 2005).

Os resultados obtidos por Nakamura *et al.* (1999) estão em consonância com os desse estudo, uma vez que a concentração bactericida da essência de alfavacão para *S. aureus* foi menor, 1,5 µg/mL, em relação à obtida para *E. coli*, 12 µg/mL. Em contrapartida, Silva *et al.* (2010) encontraram resultados antagônicos, ou seja, menor CBM para a bactéria Gram-negativa e a maior para a Gram-positiva; todavia, os pesquisadores empregaram o óleo das inflorescências e não das folhas da planta.

Assim como o alfavacão, a essência do cravo apresentou menor concentração bactericida mínima frente a *S. aureus*, com 50 µL/mL. Na pesquisa de Hoffman *et al.* (1999), o óleo de cravo demonstrou ser bom antimicrobiano pois inibiu por completo bactérias como *S. aureus* e *S. enteritidis*, além de leveduras, a 10%. Moreira *et al.* (2005), em seus trabalhos, observaram a efetividade do cravo contra estirpes de *E. coli* O157: H7 somente em concentração 30 vezes superior ao encontrado nessa pesquisa. Outros resultados favoráveis ao cravo, mas contrários aos resultados obtidos, isto é, com menor concentração identificada para bactéria Gram-negativa, foram os de Fu *et al.* (2007) e Silva *et al.* (2009), cujas unidades utilizadas na diluição foram diferentes das praticadas neste trabalho.

Para aumentar as chances de inativação completa das colônias, Berrington; Gould (2001) sugerem a aplicação da maior concentração

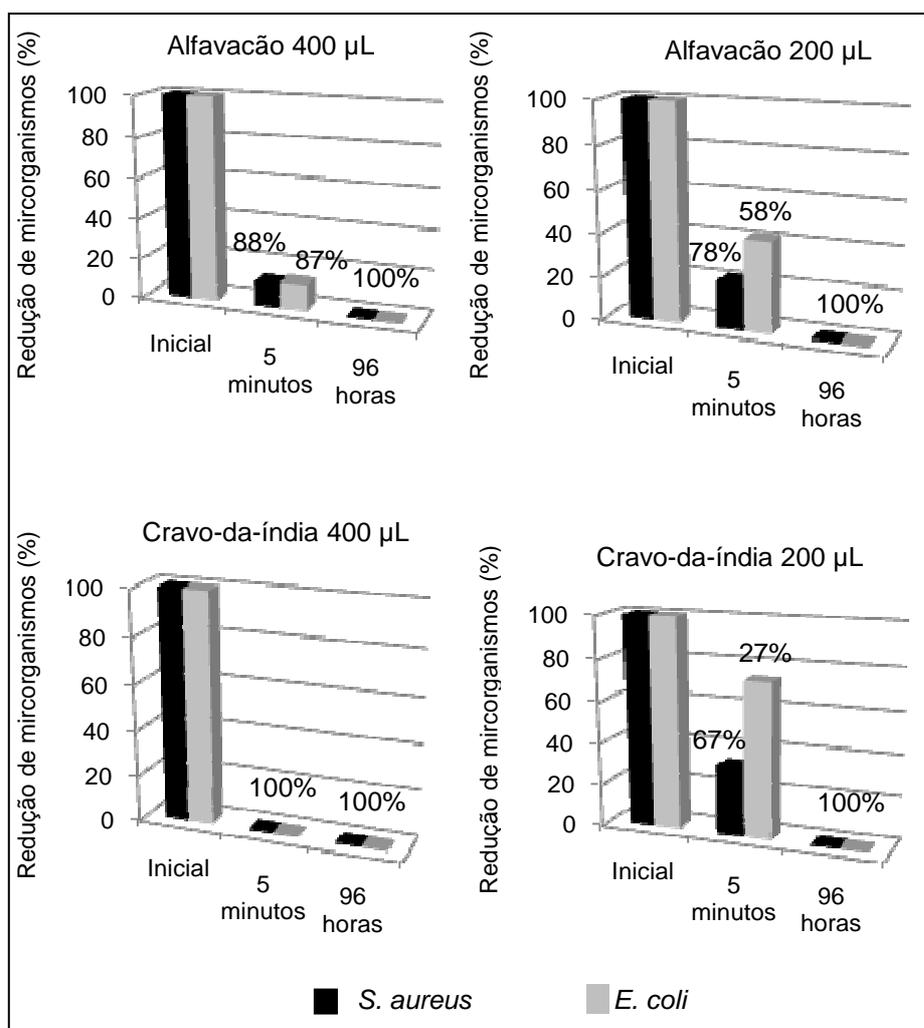
utilizada nos testes. Ponce *et al.* (2003), contudo, propõem pequenas mudanças nas menores concentrações para se conseguir alterações significativas no comportamento das células. Ao alterarem os maiores valores, nem as mudanças mais relevantes promoveram inativação que justificasse o uso.

As desigualdades nos efeitos dos testes de sensibilidade podem ser justificadas pela falta de uniformidade nos critérios estabelecidos pelos pesquisadores (RÍOS; RECIO 2005). As contradições observadas e a dificuldade em se comparar os resultados obtidos nas pesquisas que verificam a atividade antimicrobiana de plantas medicinais podem ser consequência de diferenças nas condições ambientais no momento da coleta, na porção da planta estudada, nas metodologias e nos protocolos seguidos (AURICCHIO; BACCHI, 2003), nas características físico-químicas dos óleos (NAKAMURA *et al.*, 1999), na reciprocidade dos seus constituintes, na forma de extração (MOREIRA *et al.*, 2005; PONCE *et al.*, 2003), dentre outros.

Os dados revelam o potencial sanitizante dos óleos essenciais de alfavacão e cravo. A confirmação do caráter antisséptico foi verificada no teste *in vitro* da eficiência como desinfetante.

### **3.3 Eficiência *in vitro* dos óleos essenciais como desinfetantes**

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1993), desinfetante é a substância, ou o conjunto delas, “capaz de destruir microrganismos patogênicos não esporulados em curto espaço de tempo, quando aplicado a objetos inanimados”. O GRAF. 5 mostra as médias de redução do número de colônias após 5 minutos e 96 horas de aplicação dos desinfetantes.



**GRÁFICO 5** - Reduções médias do número de colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8733 após 5 minutos e 96 horas de contato *in vitro* com desinfetantes à base de alfavacão e cravo-da-índia

Fonte: Da autora.

Os resultados são compatíveis com a definição citada (BRASIL, 1993). Verificou-se a redução do número de células já nos primeiros 5 minutos. O antisséptico composto por alfavacão na maior concentração reduziu *E. coli* e *S. aureus* em 87 e 88%, respectivamente, e na concentração de 200 µL/mL observaram-se 58 e 78% a menos das colônias. O produto à base de cravo-

da-índia a 400 µL/mL eliminou totalmente as duas espécies já no início do processo. Quando o teste foi realizado com a menor concentração, observou-se apenas a diminuição da contagem das células de *S. aureus* e *E. coli* em 67 e 27%, nessa ordem.

Avancini; Wiest (2008) testaram a eficiência de desinfetante composto por planta medicinal, na presença de matéria orgânica, como neste trabalho, enquanto Oliveira *et al.* (2010) e Tresoldi (2008) desenvolveram os testes na ausência dessa matéria. Essas pesquisas fortalecem os resultados obtidos porque todos igualmente verificaram a relação direta entre a inativação da dose infectante e o tempo, ou seja, quanto maior o período de contato do desinfetante, maior a inativação dos microrganismos. Porém, Chorianopoulos *et al.* (2008) constataram que, em geral, as reduções significativas do número de colônias ocorrem nos primeiros 60 minutos de contato com o produto natural. Para os autores, aumentar esse prazo não melhora a eficiência da desinfecção.

O crescente interesse por compostos antibacterianos, como antibióticos e desinfetantes, oriundos de plantas surge da necessidade de criar novas estratégias (OLIVEIRA *et al.*, 2010) para controlar, dentre outras coisas, os patógenos presentes no ar (BOUAZIZ *et al.*, 2009), os zoonóticos (PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010), a formação de biofilmes e também para atender à demanda dos consumidores, cada vez mais avessos aos compostos sintéticos. Dentre as alternativas ao uso dos desinfetantes e substâncias químicas comerciais, alguns pesquisadores propõem o emprego de plantas medicinais (AVANCINI *et al.*, 2000).

O número de pesquisas para verificar a eficácia dos compostos naturais como desinfetantes é menor em relação aos trabalhos com produtos químicos comerciais. A presença de compostos com atividade inibitória comprovada estimula a continuação dos estudos para obtenção de maneiras seguras e mais naturais para a preservação dos alimentos. Os resultados de estudos *in vitro* evidenciam os óleos e os extratos de plantas como fontes potencialmente ricas para a medicina e a indústria alimentícia, devido ao amplo espectro de atividade contra patógenos (FU *et al.*, 2007; KOTZEKIDOU *et al.*, 2008).

Além do menor custo, essas substâncias podem contornar os efeitos negativos provocados pelo uso indiscriminado de antimicrobianos convencionais, favorecendo a medicina veterinária, os produtores rurais, os consumidores e o meio ambiente (AVANCINI; WUEST 2008; BOUAZIZ *et al.*, 2009; TRESOLDI, 2008).

#### 4 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de alfavacão e cravo-da-índia apresentaram, *in vitro*, atividade inibitória bactericida e antisséptica satisfatória frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de carcaças de ovinos, sendo promissora a sua utilização como alternativa aos antibióticos e antissépticos comerciais. Entretanto, é indispensável o aprofundamento dos estudos para a verificação de efeitos adversos.

#### **CAPÍTULO 4 - SUCO DE LIMÃO FRENTE A *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE OVINOS**

##### **RESUMO**

Verificou-se a efetividade do suco de limão em reduzir a contagem de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* inoculadas em carne de ovino. Foram utilizadas quatro cepas e três concentrações do suco nas técnicas de disco-difusão e macrodiluição em caldo empregadas na análise do efeito inibitório. No teste de suspensão, trabalhou-se com duas cepas e uma concentração na determinação da atividade desinfetante. A primeira concentração foi mais efetiva na inativação de três das quatro cepas testadas. Não foi definida a concentração bactericida mínima. O teste de suspensão mostrou que após 5 minutos de contato com o desinfetante todas as bactérias foram inativadas. O suco de limão apresentou característica antisséptica e pode ser uma nova alternativa no combate aos patógenos de alimentos.

Palavras-chave: Ácidos orgânicos. *Citrus latifolia* Tanaka. Desinfetante. Microorganismos. Segurança alimentar.

**CHAPTER 4 - LEMON JUICE AGAINST *Staphylococcus aureus* AND  
*Escherichia coli* ISOLATED FROM SHEEP CARCASSES**

**ABSTRACT**

Lemon juice was tested for its effectiveness in reducing the counts of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* inoculated in sheepmeat. The inhibitory effect was analysed by disk diffusion and broth macrodilution method with four strains and three concentrations. Disinfectant activity of the lemon juice was assessed using the suspension test with two strains and one concentration. The first concentration was more effective to make inactive three of the four tested strains. Minimum bactericidal concentration was not determined. The suspension test showed that all of the bacteria were inactivated after 5 minutes of contact with the disinfectant. Lemon juice showed antiseptic characteristic and may be one new alternative to fight foodborne pathogens.

Keywords: Organic acids. *Citrus latifolia* Tanaka. Disinfectant. Microorganisms. Food safety.

## 1 INTRODUÇÃO

O mercado consumidor busca por alimentos frescos, seguros e nutricionalmente saudáveis (RAJKOVIC *et al.*, 2010). A demanda sucessiva por gêneros alimentícios com padrões superiores de qualidade tem levado a indústria a buscar novos instrumentos capazes de conservar o produto por mais tempo e de forma mais natural (ANDERSEN *et al.*, 2005). Desse modo, é constante a pesquisa por substâncias com eficácia bactericida como os ácidos orgânicos (METRI *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2002), os óleos essenciais (DUARTE *et al.*, 2007; FARIA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008) e as bacteriocinas (MELO *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Os métodos para reduzir ou eliminar as bactérias patogênicas e as deteriorantes são importantes para melhorar a segurança da carne e dos seus derivados, evitar a deterioração (MELO *et al.*, 2005), reduzir as perdas econômicas (SILVA *et al.*, 2001), ampliar a vida de prateleira e minimizar o risco de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (METRI *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2002). Entre os patógenos, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* são alguns dos microrganismos mais preocupantes (HUFFMAN, 2002), visto que estão comumente envolvidos nos surtos de toxinfecção alimentar (BRASIL, 2005; SILVA *et al.*, 2001).

Os tratamentos físicos, químicos e biológicos aplicados, isolados ou em combinação, nas carcaças, são eficazes na redução da contaminação superficial (HUGAS; TSIGARIDA, 2008). Dentre os métodos de descontaminação empregados estão a lavagem e a desinfecção com água gelada ou quente, a aplicação de vapor e de produtos químicos (DESMARCHELIER, 2007; DUBAL *et al.*, 2004). Essas tecnologias conseguem inativar de forma significativa os microrganismos, melhorar o perfil microbiológico da carne (HUFFMAN, 2002) e preservar as características sensoriais (RAJKOVIC *et al.*, 2010).

O uso de ácidos orgânicos como o ascórbico, o cítrico, o láctico e o propiônico, observados naturalmente em frutas e alimentos fermentados, é um dos meios disponíveis para descontaminação de alimentos (SENGUN; KARAPINAR, 2004). Os ácidos orgânicos fracos são de baixo custo e comprovadamente eficazes na diminuição do número de patógenos nos alimentos (RAJKOVIC *et al.*, 2010). Os produtos agem de maneira distinta com diferentes microrganismos (DUBAL *et al.*, 2004) e o resultado varia conforme o tipo e a concentração do ácido utilizado, o tempo de contato, a forma de aplicação e o microrganismo-alvo (METRI *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2010).

Diante do exposto, objetivou-se determinar a atividade antimicrobiana, a concentração bactericida mínima e a atividade desinfetante do suco de limão frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de carcaças de ovinos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Procedeu-se conforme as orientações da *American Public Health Association* (APHA), descritas no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES; ITO, 2001).

### 2.1 Coletas de amostras

Foram coletadas amostras de 36 carcaças, recolhidas durante três visitas em açougue de Montes Claros – MG, entre os meses de março e junho de 2010. O abate dos animais era realizado de modo informal e acontecia em local distinto ao da venda do produto, conforme informações do proprietário do estabelecimento.

Empregou-se a técnica do esfregaço de superfície em cinco pontos (pescoço, paleta, costelas, lombo e pernil), sendo os *swabs* transportados em frascos com 50 mL do diluente água peptonada a 0,1% (Himedia®) (MIDURA; BRYANT, 2001). Os volumes dos frascos com os *swabs* (solução  $10^{-1}$ ) foram homogeneizados em água peptonada 0,1% e, em seguida, sofreram diluição para a obtenção das outras duas soluções ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) (SWANSON *et al.*, 2001).

Recolhidas, as amostras seguiram em recipiente resfriado para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, na mesma cidade, sendo cultivadas no mesmo dia.

### 2.2 Pesquisa de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

A determinação do número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes foi calculada com série de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (Oxoid®) por diluição, incubados a 35-37 °C por 24 horas para o teste presuntivo. As amostras positivas (crescimento com produção de gás) foram repassadas para tubos com caldo EC (Acumedia®), incubados a 45,5 °C por 48 horas. Para a confirmação de *Escherichia coli*, usou-se o meio ágar

Levine Eosina Azul de Metileno (Oxoid®) com as placas incubadas a 35 °C por 24 horas, e as colônias positivas repassadas para tubos inclinados contendo o ágar Padrão para Contagem (Acumedia®), incubados a 35 °C por 24 horas. As cepas características foram submetidas às provas bioquímicas de citrato, indol, vermelho de metila e Voges-Proskauer (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

### **2.3 Pesquisa de *Staphylococcus* sp.**

De cada diluição foi retirado 0,1 mL e inoculado na superfície de placas de ágar Baird-Parker (Himedia®), incubadas invertidas em temperatura de 35 °C por 48 horas. As colônias típicas de estafilococos (circulares, pretas ou cinza-escuro, medindo de 2 a 3 mm de diâmetro, lisas, convexas, massa de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente) foram contadas e transferidas para tubos com caldo Infusão Cérebro Coração ou Brain Heart Infusion (Himedia®), incubados por 24 horas a 35 °C. Após esse período, realizou-se o teste de coagulase com a adição de 0,2 mL das culturas obtidas em BHI a 0,5 mL de Coagulase Plasma-EDTA (Fluka®), incubados a 35-37 °C durante 6 horas com a verificação posterior da presença ou ausência de coágulo (LANCETTE; BENNETT, 2001).

### **2.4 Preparo e avaliação da atividade inibitória e bactericida das soluções**

Os tratamentos foram realizados com suco de limão (*Citrus latifolia* Tanaka) integral e diluído a 50% e 25% em água destilada estéril. Os limões foram lavados, sanitizados em solução clorada 200 ppm por 15 minutos e enxugados em papel toalha branca estéril. A faca, a tábua e o espremedor utilizados no corte do fruto e na extração do sumo também foram esterilizados em autoclave.

Para a avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas das carcaças de ovinos e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8733, utilizou-

se as metodologias de macrodiluição em caldo e de difusão em placas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (2003a, b).

Na difusão em placas, uma alíquota de cada estirpe foi repicada em caldo BHI (Himedia®) e em seguida levada para a estufa a 37 °C por 24 horas, para ativação. As culturas ativadas foram repicadas em ágar TSA (Tryptic Soy Ágar Himedia®) e incubadas sob as mesmas condições acima. O inóculo foi preparado colocando-se cinco colônias isoladas das placas em 5 mL de solução salina. Ajustou-se a turbidez conforme a solução-padrão de McFarland 0,5 (CLSI, 2003b).

Semeou-se com o auxílio de *swab* estéril 200 µL do inóculo na superfície de placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Himedia®). Discos de papel-filtro Whatman número um, 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL de cada solução-teste foram distribuídos pela placa de maneira uniforme, com o auxílio de pinça esterilizada.

Para a primeira solução, utilizaram-se 1000 µL do suco de limão integral, conforme metodologia proposta por Silva *et al.* (2001). Na segunda solução, suco diluído a 50%, utilizou-se 500 µL da primeira, acrescido de 500 µL de água destilada estéril, conforme o método de diluição seriada (CLSI, 2003a). A terceira solução, diluição a 25%, foi elaborada da mesma maneira. Auxiliado pelo vortex, agitou-se o volume final por 5 minutos. Disco de papel impregnado com água destilada representou o controle negativo, enquanto discos de antibióticos comerciais serviram como controle positivo, sendo usados Gentamicina 10 µg e Oxacilina 1 µg nas placas com *Staphylococcus* sp. e Ciprofloxacina 5 µg e Oxacilina 1 µg nas placas com *Escherichia coli*, todos da marca DME®. As placas seguiram para a estufa por 24 horas, a 37 °C. Finalizado o período de incubação, mediu-se e registrou-se em milímetros, com o auxílio de uma régua, o diâmetro da zona de inibição do crescimento microbiano.

O experimento foi realizado segundo um delineamento em blocos casualizados. O esquema fatorial foi de 4 x 3, sendo quatro bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isolados da carcaça de ovinos e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8733) e três soluções, totalizando doze tratamentos com três repetições. Os dados foram

submetidos à análise de variância pelo programa SAEG 9.1 e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

No teste da concentração bactericida mínima empregou-se a técnica de macrodiluição em caldo descrita por Chanwitheesuk *et al.* (2007), com modificações. Foram testadas as três soluções trabalhadas no teste de difusão, utilizando-se os mesmos princípios de diluição seriada porém, substituindo-se a água destilada pelo caldo BHI (Himedia®), preservando-se os volumes. No final, acrescentaram-se 2,5 µL de cada inóculo obtido a partir dos isolados da carne de ovinos, equivalente a solução-padrão de McFarland 0,5 e mantiveram-se os tubos por 24 horas incubados a 37 °C. Após a incubação, uma alíquota de cada tubo foi semeada em placas com ágar TSA (Tryptic Soy Ágar Himedia®) e essas encaminhadas à estufa nas mesmas condições. A ausência do crescimento bacteriano foi definida como a CBM. O teste foi desenvolvido em triplicata.

## **2.5 Verificação da eficiência do suco de limão como desinfetante**

Na determinação da atividade desinfetante empregou-se a metodologia trabalhada por Medeiros *et al.* (2009), com técnicas do teste de suspensão descritas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1993). Foi testado contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8733 o suco de limão diluído a 50% porque o integral possui *flavor* (sabor e aroma) marcante e normalmente altera as características organolépticas do alimento quando utilizado. As suspensões bacterianas foram elaboradas em solução salina 0,85%, equivalente à solução-padrão de McFarland 0,5, com aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

O volume de 900 µL do desinfetante trabalhado no item 2.3, elaborado com o suco de limão diluído 50% em água destilada, foi distribuído assepticamente em tubos, somado a 100 µL de matéria orgânica estéril que se tratava de 10 g de carne de ovino, batida com 100 mL de água destilada e tindalizada uma vez por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 10 µL da suspensão bacteriana e cronometrados os tempos de exposição. Após

5, 15, 30 e 60 minutos, por meio de alça bacteriológica, repicou-se uma alíquota em tubos contendo 5 mL de caldo Brain Heart Infusion (Himedia®), agitados e incubados a 37 °C por 96 horas. Também no tempo de 5 minutos, alíquotas foram semeadas em ágar Baird-Parker (Himedia®) e EMB (Oxoid®) para contagem do número de colônias após esse período de contato entre a solução desinfetante, a matéria orgânica e o inóculo. Após a inoculação, as placas seguiram para a estufa a 37 °C por 24 horas.

Nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas averiguou-se a turvação dos tubos, a formação de película na superfície e/ou de precipitado no fundo da vidraria. A turvação ou não turvação era considerada, respectivamente, bactéria ativa (resultado negativo) ou inativa (positivo). Os tubos classificados como positivos foram repicados em meios sólidos específicos para *S. aureus* (Baird-Parker, Himedia®) e *E. coli* (EMB, Oxoid®), incubados a 37 °C por 24 horas, para confirmação da eficácia do desinfetante por meio da ausência de crescimento bacteriano nas placas.

O teste com cada concentração foi realizado em duplicata e empregou-se a análise estatística descritiva.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Atividade inibitória do suco de limão

A verificação do efeito inibitório do suco de limão pelo teste de difusão em placas, também conhecido como disco-difusão, revelou a primeira concentração, o suco de limão integral, como a mais efetiva na inativação de três das quatro cepas testadas (TAB. 1 e GRAF. 1), com os diâmetros dos halos medindo 7,33; 8,66 e 8,00 mm. Somente para *E. coli* ATCC 8733 a concentração da solução foi indiferente na eliminação da bactéria. Essa última averiguação é importante, pois quanto menor a concentração inibitória da substância ácida, melhor para aplicação, uma vez que evita a mudança na coloração da superfície da carcaça (SILVA *et al.*, 2001).

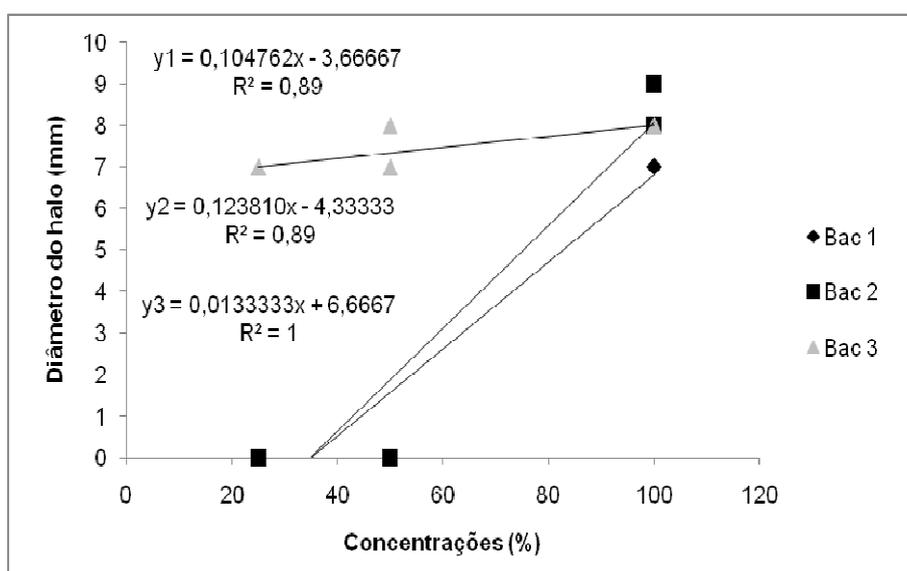
A sensibilidade ou resistência das cepas às concentrações é demonstrada pela formação do halo de inibição, área sem crescimento evidente, revelado a olho nu (CLSI, 2003b). Observa-se nas duas últimas linhas da tabela os halos de inibição iguais a 0 mm para as cepas Gram-positivas, revelando a resistência das bactérias às diluições de 50% e 25%, diferente das Gram-negativas, cujas zonas de inibição foram averiguadas quando aplicadas as três soluções-teste. O resultado é condizente com a literatura, pois, para Ostermann *et al.* (2005), a suscetibilidade das bactérias Gram-negativas aos ácidos com menos de oito carbonos, como o cítrico e o ascórbico presentes no limão (MENDONÇA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2010), é maior do que a das Gram-positivas. Segundo os autores, uma das formas de ação desses ácidos é a difusão por meio da membrana celular até o citoplasma, onde liberam prótons e acidificam o meio, cujo pH estava próximo da neutralidade. A acidificação impede o funcionamento adequado do sistema enzimático, do transporte de nutrientes, o metabolismo de outras substâncias e a síntese de DNA.

TABELA 1  
Diâmetros dos halos de inibição (mm) do suco de limão contra  
*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Solução (%)	<i>S. aureus</i> de carcaças de ovinos	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> de carcaças de ovinos	<i>E. coli</i> ATCC 8733
	Diâmetro do halo (mm)			
100	7,33 Ab	8,66 Aa	8,00 Ab	7,66 Ab
50	0,00 Bc	0,00 Bc	7,33 Bb	8,00 Aa
25	0,00 Bb	0,00 Bb	7,00 Ba	7,33 Aa

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. Letras maiúsculas comparam as médias nas colunas e, as minúsculas, nas linhas.

Fonte: Da autora.



**GRÁFICO 1** - Halo de inibição (mm) determinado pelo efeito antimicrobiano do suco de limão sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em função das concentrações testadas (%)

Fonte: Da autora.

Nota: BAC1- *Staphylococcus aureus* de carcaças de ovinos, BAC2- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, BAC3- *Escherichia coli* de carcaças de ovinos.

Buscaram-se na literatura pesquisas nas quais a sensibilidade de microrganismos frente ao suco de limão fosse analisada por meio dos testes de disco-difusão e macrodiluição, mas nada foi obtido nas fontes examinadas. Os trabalhos verificados aplicaram a técnica de aspersão da carcaça com o sumo ou os ácidos orgânicos ou imersão da amostra de determinado alimento nessas mesmas substâncias.

Silva *et al.* (2001) aspergiram soluções à base de suco de limão integral e diluído a 50% e de ácidos orgânicos em carcaças de frango. Após 1 hora de contato, investigou-se a redução do número de microrganismos na superfície, obtendo-se resultados comprobatórios da ação sanitizante do limão, o que corrobora este trabalho. Os autores atribuíram ao tratamento com o suco integral o melhor índice de redução na contagem de bactérias aeróbias mesófilas, assim como ocorreu com as cepas de *S. aureus* dessa investigação, seguido pelo suco diluído. Para o controle de coliformes totais e termotolerantes nas carcaças, eles sugeriram a utilização de soluções menos concentradas visto que a incidência diminuiu de forma análoga com as duas concentrações. Na atual pesquisa, verificou-se a inativação da bactéria *E. coli*, pertencente ao grupo dos coliformes termotolerantes, em solução contendo 25% de suco, caracterizando maior sensibilidade do microrganismo, com possibilidade de novos testes.

Santos *et al.* (2010) testaram quatro soluções naturais de uso doméstico, sendo suco de limão, vinagre de álcool, mistura de suco com vinagre (1:1) e mistura de suco com vinagre e água (1:1:1), na redução de *E. coli* inoculada em alface. Como no presente estudo, os resultados foram satisfatórios para a inibição das cepas e os pesquisadores recomendaram o uso do suco de limão e do vinagre, sozinhos ou combinados na proporção 1:1, para a descontaminação de vegetais folhosos. Esses dois itens são fontes regulares de ácidos acético e cítrico, nessa ordem, comumente utilizados como temperos para saladas e alguns tipos de carnes e podem ser considerados bons antissépticos alternativos.

A pesquisa de Sengun; Karapinar (2004) assemelha-se à última citada e também reforça a comprovação da atividade antimicrobiana *in vitro* do limão. Ao testarem o suco e o vinagre, obtiveram resultados parecidos contra

*S. typhimurium* em cenouras. Os pesquisadores averiguaram a redução de 2,68 e 3,95 log ufc/g na contagem do microrganismo após 15 e 60 minutos, respectivamente, de imersão do vegetal no suco. O emprego da mistura do sumo com o vinagre na proporção 1:1 demonstrou atividade antimicrobiana máxima com a redução das células viáveis a níveis indetectáveis após 30 minutos de exposição. Para os autores, a mistura foi a melhor alternativa para a eliminação de *S. typhimurium* em cenouras, seguida pelo suco integral.

A aplicação do suco de limão como sanitizante natural da carne faz parte da prática doméstica, assim como a utilização de ervas, temperos e condimentos como o orégano, o cravo, o manjericão e o alecrim com características bactericidas ou bacteriostáticas comprovadas (FU *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2008).

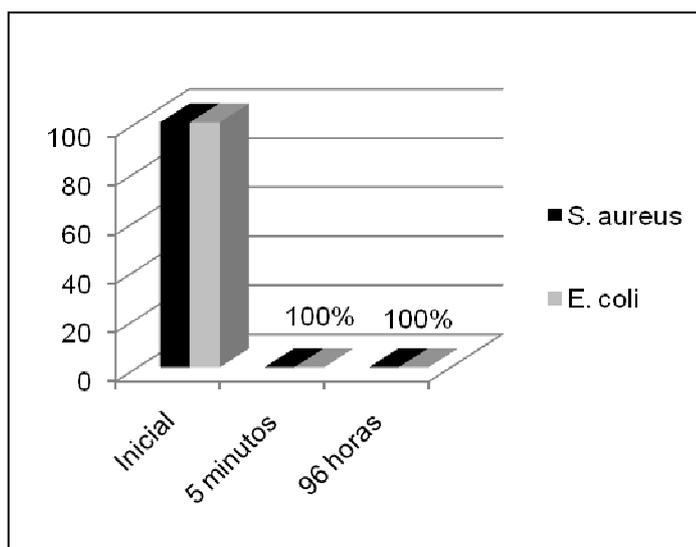
O Brasil é o segundo maior produtor mundial de frutos cítricos e o principal exportador desses sucos (LUZIA; JORGE, 2009; MENDONÇA *et al.*, 2006). Apesar disso, as pesquisas comprobatórias da eficácia bactericida ou bacteriostática *in vitro* do suco de limão são escassas, ao contrário do ocorrido com os ácidos orgânicos cujas investigações dos efeitos são abundantes (JAENISCH *et al.*, 2010; METRI *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2002).

Define-se a concentração bactericida mínima (CBM) como a menor concentração da substância capaz de destruir completamente os microrganismos (FU *et al.*, 2007). No teste para determinação da CBM do suco de limão não foi revelada, pelo método da macrodiluição, a atividade bactericida frente às cepas-alvo. Como foi comprovada a eficiência desinfetante do suco, isto é, o efeito microbicida em curto espaço de tempo (FIG. 1 e GRAF. 2), no teste cujos resultados são analisados a seguir, pode-se supor que o crescimento das colônias nas placas seja resultante do método utilizado, que talvez não seja o mais apropriado para a análise desse produto, ou ainda por mudanças na composição química do fruto em consequência do clima, do tipo de solo, das partes utilizadas etc (MENDONÇA *et al.*, 2006), pois os limões empregados nos dois testes foram

adquiridos em épocas e locais diferentes. Também pode-se inferir falhas no desenvolvimento da metodologia.

### 3.2 Eficiência *in vitro* do suco de limão como desinfetante

O suco de limão diluído a 50% demonstrou efeito bactericida significativo, em curto espaço de tempo, frente às cepas testadas, característico de solução desinfetante (BRASIL, 1993). Nos cinco primeiros minutos de contato ocorreu a inativação completa das bactérias (GRAF. 2).



**GRÁFICO 2** - Redução do número de colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8733 após 5 minutos e 96 horas de contato *in vitro* com desinfetante à base de suco de limão

Fonte: Da autora.

Não foi encontrada na literatura consultada nenhuma referência do teste da eficácia desinfetante do suco de limão utilizando a mesma metodologia. Assim, a interpretação dos dados foi realizada comparando-se com trabalhos semelhantes desenvolvidos com ácidos orgânicos, visto que esses estão presentes no suco cítrico.

Jaenisch *et al.* (2010) utilizaram cinco desinfetantes, dentre eles um composto de ácidos orgânicos (cítrico, láctico e ascórbico), frente a amostras-padrão de *S. aureus*, *E. coli* e *S. Enteritidis* na presença e ausência de matéria orgânica. O verificado foi a redução de 4 log na contagem dos microrganismos, porém, no caso do composto de ácidos orgânicos a ação bactericida foi prejudicada pela presença de matéria orgânica, diferente do ocorrido nesta pesquisa, em que, mesmo na presença da carne, a inativação das bactérias foi total, transcorridos 5 minutos de contato com a solução desinfetante.

Nas pesquisas desenvolvidas com carnes e carcaças, a inativação dos microrganismos também foi positiva em presença dos compostos ácidos orgânicos. Vasconcelos *et al.* (2002) imergiram amostras de carne ovina em solução de ácido acético 1% por 1 minuto e encontraram diferença, para menos, na contagem de coliformes termotolerantes, independente do período de maturação. Coliformes totais reduziram 1 ciclo logarítmico após três dias de armazenamento, e a contagem de bactérias mesófilas e psicrotróficas caiu em 2 e 3,5 ciclos logarítmicos, nessa ordem, após treze dias. Silva (1995) aspergiu em carcaças bovinas solução de ácidos orgânicos logo depois do abate e averiguou a diminuição de 90% do número de células viáveis da superfície, mantendo baixas as contagens por até quinze dias sob refrigeração. Após a desossa, a carne obtida teve vida de prateleira 30% maior em relação às demais. Já Metri *et al.* (2006) trataram carne caprina com 2% de ácido acético, 1% de ácido láctico, 0,25% de ácido cítrico e 0,1% de ácido ascórbico e, após sete dias sob refrigeração, as análises bacteriológicas acusaram a ocorrência de coliformes termotolerantes na contagem de  $7,0 \times 10$  NMP/g, ao contrário dos  $5,4 \times 10^5$  NMP/g iniciais. A sanitização desses produtos com ácidos orgânicos é uma alternativa viável para garantir a salubridade do gênero alimentício do campo à mesa.

As carcaças são susceptíveis à contaminação devido à manipulação intensa, à presença de pelo ou penas na parte externa e das vísceras na parte interna (SILVA *et al.*, 2001), sendo necessária a aplicação de boas práticas higiênico-sanitárias antes, durante e após o abate para não aumentar a contagem microbiana do produto (METRI *et al.*, 2006). A

elaboração de um desinfetante natural para reduzir ou eliminar a microbiota deteriorante e patogênica na superfície é interessante por favorecer o prazo de validade e restringir os riscos à saúde do consumidor.

As substâncias à base de ácidos orgânicos são caracterizadas como biodegradáveis (JAENISCH *et al.*, 2010). O uso de antissépticos menos agressivos ao meio ambiente e capazes de atuar sobre os patógenos de alimentos é de interesse para prevenir os episódios de surtos de DTA, favorecendo a segurança alimentar (SANTOS *et al.*, 2010; BOUAZIZ *et al.*, 2009, BOROWSKY *et al.*, 2006), e auxiliar no combate à resistência antimicrobiana às drogas convencionais (SILVA *et al.*, 2009). Entretanto, os desinfetantes não devem ser usados para combater os microrganismos decorrentes de situações precárias de higiene. As boas práticas de fabricação têm de ser aplicadas em toda a cadeia produtiva no intuito de minimizar os riscos de contaminação. Apenas a aplicação de antissépticos na porção final do processo não garantirá a salubridade do alimento.

#### 4 CONCLUSÃO

Nos testes *in vitro*, o suco de limão apresentou atividade inibitória e antisséptica satisfatória frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de carcaça de ovino. Sugere-se, porém, o aprofundamento dos estudos para a verificação de efeitos adversos e a confirmação do seu emprego como desinfetante natural alternativo, passível de uso em alimentos.

**REFERÊNCIAS**

ADAM, K.; BRÜLISAUER, F. The application of food safety interventions in primary production of beef and lamb: a review. **International Journal of Food Microbiology**, p. 1-10, 2010.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4<sup>th</sup> ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. 803 p.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A. E.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 5- 8, 2005. Suplemento.

ANDERSEN, H. J.; OKSBJERG, N.; YOUNG, J. F.; THERKILDSEN, M. Feeding and meat quality – a future approach. **Meat Science**, v. 70, p. 543-554, 2005.

ASTIZ, C. S. Calidad de la canal y de la carne ovina y caprina y los gustos de los consumidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 143-160, 2008. Suplemento Especial.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 1, p. 55-61, 2003.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Schlecht. – Guttiferae (“escadinha/sinapismo”), frente diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p. 64-69, 2008.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 3, p. 230-234 2000.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BARROS, N. N.; ALVES, J. U.; VASCONCELOS, V. R. Produzindo Cordeiros de Qualidade para o Abate. **Circular Técnica**, Sobral, n. 28. p. 1-8, 2003.

BAUER, A.W.; KIRK, M.M.; SHERRIN, J.D. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BERRINGTON, A.; GOULD, F. K. Use of antibiotic locks to treat colonized central venous catheters. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 597-603, 2001.

BHANDARE, S. G.; SHERIKAR, A. T.; PATURKAR, A. M.; WASKAR, V. S.; ZENDE, R. J. A comparison of microbial contamination on sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops. **Food Control**, v. 18, p. 854-858, 2007.

BONAGURIO, S.; PÉREZ, J. R. O.; GARCIA, I. F. F.; BRESSAN, M. C.; LEMOS, A. L. S. C. Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês puros e mestiços com Texel abatidos com diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1981-1991, 2003.

BORGES, A. da S.; ZAPATA, J. F. F.; GARRUTI, D. dos S.; RODRIGUES, M. do C. P.; FREITAS, E. R.; PEREIRA, A. L. F. Medições instrumentais e sensoriais de dureza e suculência na carne caprina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 891-896, 2006.

BOROWSKY, L. M.; BESSA, M. C.; CARDOSO, M. DE I.; AVANCINI, C. A. M. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella Typhimurium* isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodofor. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1474-1479, 2006.

BOUAZIZ, M.; YANGUI, T.; SAYADI, S.; DHOUIB, A. Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2755–2760, 2009.

BRASIL. Atos do Poder Executivo. Decreto n. 5.813, de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 jun. 2006. Seção I, p. 2.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n. 101, de 11 de agosto de 1993. Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos microbiológicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 ago. 1993. Seção 1. p. 11937.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1. p. 45.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999 - 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, DF, n. 6, p. 1-7, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos**. Módulo 5. 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo5/interpretacao.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/interpretacao.htm)>. Acesso em: 11 jun. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2009**, Brasília, DF, p. 1-16, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Desenvolvido pela Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010. **Apresenta os aspectos epidemiológicos das doenças transmitidas por alimentos de 1999 a 2010**. Brasília, DF. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31760](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31760)>. Acesso em: 11 jun. 2011.

BRESSAN, M. C.; PRADO, O. V.; PÉREZ, J. R. O.; LEMOS, A. L. S. C., BONAGURIO, S. Efeito do peso ao abate de cordeiros Santa Inês e Bergamácia sobre as características físico-químicas da carne. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 293-303, 2001.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Paris: Lavoisier, 1995. 915 p.

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

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; OLIVEIRA, D. de; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; PAROUL, N.; ASTOLFI, V.; SERAFINI, L. A. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 378-384, 2010.

CARDOSO, M. O.; RIBEIRO, A. R.; SANTOS, L. R. dos; PILOTTO, F.; MORAES, H. L. S. de; SALLE, C. T. P.; ROCHA, S. L. da S.; NASCIMENTO, V. P. do. Antibiotic resistance in *Salmonella enteritidis* isolated from broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 368-371, 2006.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J. D.; RAKARIYATHAM, N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1044–1048, 2007.

CHAPMAN, P. A.; MALO, A. T. C.; ELLIN, M.; ASHTON, R.; HARKIN, M. A. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 139-150, 2001.

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. N.; HAROUTOUNIAN, S. A.; NYCHAS, G. -J. E. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1586-1596, 2008.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; De BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 213-220, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Document M7-A6: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6<sup>th</sup> ed. Wayne: CLSI, 2003a. 81 p.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Document M2-A8: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**: approved standard. 8<sup>th</sup> ed. Wayne: CLSI, 2003b. 58 p.

COSTA, R. G.; CARTAXO, F. Q.; SANTOS, N. M.; QUEIROGA, R. C. R. E. Carne caprina e ovina: composição lipídica e características sensoriais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 3, p. 497-506, 2008.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. de A.; ALENCAR, J. W. de; MACHADO, I. L. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 1981. 210 p.

DAMBOLENA, J. S.; ZUNINO, M. P.; LÓPEZ, A. G.; RUBINSTEIN, H. R.; ZYGADLO, J. A.; MWANGI, J. W.; THOITHI, G. N.; KIBWAGE, I. O.; MWALUKUMBI, J. M.; KARIUKI, S. T. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 410-414, 2010.

DENYER, S. P.; MAILLARD, J. -Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 92, p. 35S-45S, 2002.

DESMARCHELIER, P.; FEGAN, N.; SMALE, N.; SMALL, A. Managing safety and quality through the red meat chain. **Meat Science**, v. 77, p. 28-35, 2007.

Di STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69-91, 2002.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676 p.

DOYLE, M. P.; ERICKSON, M. C. Emerging microbiological food safety issues related to meat. **Meat Science**, v. 74, p. 98–112, 2006.

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

DUBAL, Z. B.; PATURKAR, A. M.; WASKAR, V. S.; ZENDE, R. J.; LATHA, C.; RAWOOL, D. B.; KADAM, M. M. Effect of food grade organic acids on inoculated *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. **Meat Science**, v. 66, p. 817-821, 2004.

DURIGAN, M. F. B.; MATTIUZ, B.-H; DURIGAN, J. F. Injúrias mecânicas na qualidade pós-colheita de lima ácida 'Tahiti' armazenada sob condição ambiente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 3, p. 369-372, 2005.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. **Boletim CEPPA**, v. 25, n. 2, p. 193-206, 2007.

ETCHEVERRÍA, A. I.; PADOLA, N. L.; SANZ, M. E.; POLIFRONI, R.; KRÜGER, A.; PASSUCCI, J.; RODRÍGUEZ, E. M.; TARABORELLI, A. L.; BALLERIO, M.; PARMA, A. E. Occurrence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. **Meat Science**, p. 1-4, 2010.

FARIA, T. de J.; FERREIRA, R. S.; YASSUMOTO, L.; SOUZA, J. R. P. de; ISHIKAWA, N. K.; BARBOSA, A. de M. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against Phytopathogenic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 6, p. 867-871, 2006.

FERNANDES, E. F. T. S.; PAULINO, A. A.; FERNANDES, M. F. T. S.; MOURA, A. P. B. L.; MOTA, R. A. Qualidade microbiológica da carne de ovinos (*Ovis aries*) comercializada nos mercados públicos do Recife-PE. **Medicina Veterinária**, v. 3, n. 4, p. 7-12, 2009.

FERRÃO, S. P. B.; BRESSAN, M. C.; OLIVEIRA, R. P.; PÉREZ, J. R. O.; RODRIGUES, E. C. R.; NOGUEIRA, D. A. Características sensoriais da carne de cordeiros da raça Santa Inês submetidos a diferentes dietas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 185-190, 2009.

FIGUEIREDO, V. F.; COSTA NETO, P. L. O. Implantação do HACCP na indústria de alimentos. **Gestão & Produção**, v. 8, n. 1, p. 100-111, 2001.

FIGUEIREDO, J. O. de; NEGRI, J. D. de; MATTOS JUNIOR, D. de; PIO, R. M.; LARANJEIRA, F. F.; GARCIA, V. X. P. Comportamento de catorze porta-enxertos para o limão Eureka km 47 na região de Araraquara-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 73-76, 2005.

FIRETTI, R.; CARRER, C. da C.; SILVA, V. L.; TRINDADE, M. A.; SOUZA, S. C. de; SAVASTANO JUNIOR, H.; RIBEIRO, M. M. de L. de O. Percepção de consumidores paulistas em relação à carne ovina: análise fatorial por componentes principais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2010.

FLÓREZ, E. A. de. Políticas de calidad en el sistema agroalimentario español. **Agroalimentaria**, n. 10, p. 63-72, 2000.

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

FREIRE, C. M. M.; MARQUES, M. O. M.; COSTA, M. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 161–166, 2006.

FREITAS, M. F. L.; LEÃO, A. E. D. S.; STAMFORD, T. L. M.; MOTA, R. A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango. **Boletim CEPPA**, v. 22, n. 2, p. 271-282, 2004.

FU, Y.; ZU, Y.; CHEN, L.; SHI, X.; WANG, Z.; SUN, S.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 989–994, 2007.

FURTINI, L. L. R.; ABREU, L. R. Utilização de APPCC na indústria de alimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 358-363, 2006.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, p. 982–989, 2009.

GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V.; SILVESTRI, J. D. F.; CZYEWski, E. CANSIAN, R. L. C.; EMMERICH, D.; PAROUL, N. Composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial do Cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb). In: **XVII ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL**, 2009, Rio Grande. 18 a 20 de nov. 2009. p. 1-2.

GUN, H.; YILMAZ, A.; TURKER, S.; TANLASI, A.; YILMAZ, H. Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by *Escherichia coli* O157:H7 in Istanbul. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 339–344, 2003.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, p. 273–292, 2005.

HUFFMAN, R. D. Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. **Meat Science**, v. 62, p. 285–294, 2002.

HUGAS, M.; TSIGARIDA, E. Pros and cons of carcass decontamination: the role of the European Food Safety Authority. **Meat Science**, v. 78, p. 43–52, 2008.

HUSSEIN, H. S.; BOLLINGER, L. M. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. **Meat Science**, v. 71, p. 676–689, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Pecuária Municipal. Desenvolvido pelo Sistema IBGE de Recuperação Automática, 2000. Apresenta o efetivo dos rebanhos. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=22&i=P>>. Acesso em: 25 jun. 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Pecuária Municipal. Desenvolvido pelo Sistema IBGE de Recuperação Automática, 2009. Apresenta o efetivo dos rebanhos. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=22&i=P>>. Acesso em: 25 jun. 2011.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. **A simplified guide to understanding and using food safety objectives and performance objectives**, p. 25-35, 2006.

JAENISCH, F. R. F.; KUCHIISHI, S. S.; COLDEBELLA, A. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 384-388, 2010.

JAIN, A.; AGARWAL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, p. 88–92, 2009.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6<sup>th</sup> ed. Las Vegas: Aspen Publishers, 2000. 635 p.

KORNACKI J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap. 8, p. 69-80.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **LWT**, v. 41, p. 119–127, 2008.

KRUMPERMAN P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 165-170, 1983.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005.

LAMBERT, P. A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 92, p. 46S–54S, 2002.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F. P; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap. 39, p. 387-400.

LOPES, M.; GALHARDO, J. A.; OLIVEIRA, J. T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S. F.; MULLER, E. E.. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. **Ciências Agrárias**, v. 28, n. 3, p. 465-476, 2007.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Ação antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja sob processo de termoxidação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 58-63, 2009.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTINELLI, T. M.; ROSSI JUNIO, O. D.; CERESER, N. D.; CARDOZO, M. V.; FONTOURA, C. L.; PERRI, S. H. V. Microbiological counting in lamb carcasses from an abattoir in São Paulo, Brazil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p.1836-1841, 2009.

MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M.; ALBUQUERQUE, L. M. B.; FONTELES, T. V.; REGO, S. L. do; FAHEINA JUNIOR, G. da S. Perfil de resistência de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de manipuladores de alimentos. **Boletim CEPPA**, v. 27, n. 1, p. 43-52, 2009.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 231-238, 2003.

MEDEIROS, E. S. de; SANTOS, M. V. dos; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; FARIA, E. B. de; WANDERLEY, G. G.; TELES, J. A. A.; MOTA, R. A. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 71-75, 2009.

MELO, N. R.; SOARES, N. de F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52, n. 303, p. 921-938, 2005.

MENDONÇA, L. M. V. L.; CONCEIÇÃO, A. da; PIEDADE, J.; CARVALHO, V. D. de; THEODORO, V. C. de A. Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 870-874, 2006.

METRI, J. C.; ANDRADE, S. A. C.; MACHADO, E. C. L.; SHINOHARA, N. K. S.; BISCONTINI, T. M. B. Controle bacteriológico de carne caprina para elaboração de hambúrguer caprino defumado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 427-431, 2006.

MIDURA, T. F.; BRYANT, R. G. Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis. In: DOWNES, F. P; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap. 2, p. 13-23.

MIR, J. Industrial microbiology. A new challenge. **International Microbiology**, v. 7, p. 81-82, 2004.

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

MOR-MUR, M.; YUSTE, J. Emerging bacterial pathogens in meat and poultry: an overview. **Food Bioprocess Technol**, v. 3, p. 24-35, 2010.

MOURA, A. P. B. L. **Qualidade microbiológica da carne caprina (*Capra hircus*, Linneaus, 1778) comercializada na cidade do Recife**. 2006. 117 f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; BANDO, E.; MELO, A. F. N.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 675-678, 1999.

NASCIMENTO, M. da S. do; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

NASTASIJEVIC, I.; MITROVIC, R.; BUNCIC, S. The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. **Meat Science**, v. 82, p. 101–105, 2009.

NEDOROSTOVA, L.; KLOUCEK, P.; KOKOSKA, L.; STOLCOVA, M.; PULKRABEK, J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. **Food Control**, v. 20, p. 157–160, 2009.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; GIESSEN, J. V. D.; KRUSE, H. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S3–S15, 2010.

NGASSOUM, M. B.; ESSIA-NGANG, J. J.; TATSADJIEU, L. N.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; ADJOUJJI, O. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, p. 284–287, 2003.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 73–79, 2005.

OLIVEIRA, M. M. M. de; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. das G.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, p. 549–553, 2010.

OLIVEIRA, F. P. de; LIMA, E. de O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. de; SOUZA, E. L. de; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 510-516, 2006.

OLIVEIRA, R. A. de; REIS, T. V.; SACRAMENTO, C. K. do; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F. de. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

OLIVEIRA, S. de; SILVA, J. A. da; MACIEL, J. F.; AQUINO, J. de S. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de carne bovina comercializada em supermercados de João Pessoa. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 61-66, 2008.

ORAFIDIYA, L. O.; ADESINA Jr, S. K.; IGBENEGHU, O. A.; AKINKUNMI, E. O.; ADETOGUN, G. E.; SALAU, A. O. The effect of honey and surfactant type on the antibacterial properties of the leaf essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. against common wound-infecting organisms. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 16, p. 57-62, 2006.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Higiene dos Alimentos – Textos Básicos**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2006. 64p.

OSÉS, S. M.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Prevalence and quantification of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* along the lamb food-chain by quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, p. 1-31, 2010.

OSÓRIO, J. C. S.; OSÓRIO, M. T. M.; SAÑUDO, C. Características sensoriais da carne ovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 292-300, 2009. Suplemento especial.

OSTERMANN, D.; SANFELICE, A. M.; VIEIRA, S. L.; VIOLA, E. S. Metabolismo e bases conceituais para a ação benéfica de ácidos orgânicos para frangos de corte. **AveWorld**, n. 15, p. 28-32, 2005.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 414-420, 2007.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PADULA, M; ITO, D. Embalagem e segurança dos alimentos. **Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens**, v. 18, n. 2, p. 1-6, 2006.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 164–168, 2010.

PEREIRA, A. A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. 2006. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

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

PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 624-632, 2007.

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 de Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 326-328, 2004.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, p. 278–282, 2009.

PERETTI, A. P. de R.; ARAÚJO, W. M. C. Abrangência do requisito segurança em certificados de qualidade da cadeia produtiva de alimentos no Brasil. **Gestão & Produção**, v. 17, n. 1, p. 35-49, 2010.

PÉREZ, J. R. O.; CARVALHO, P. A. Considerações sobre carcaças ovinas. **Boletim Técnico**, n. 61, p. 5-33, 2004.

PINHEIRO, R. S. B.; JORGE, A. M.; FRANCISCO, C. L.; ANDRADE, E. N. Composição química e rendimento da carne ovina in natura e assada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 154-157, 2008a. Suplemento.

PINHEIRO, R. S. B.; SILVA SOBRINHO, A. G.; SOUZA, H. B. A.; YAMAMOTO, S. M. Características sensoriais da carne de cordeiros não castrados, ovelhas e capões. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 787-794, 2008b.

PITTEN, F. -A.; WERNER, H. -P.; KRAMER, A. A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. **Journal of Hospital Infection**, v. 55, p. 108–115, 2003.

PONCE, A. G.; FRITZ, R.; del VALLE, C.; ROURA, S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol**, v. 36, p. 679–684, 2003.

PONCE, A.; ROURA, S. I.; MOREIRA, M. del R. Essential oils as biopreservatives: different methods for the technological application in lettuce leaves. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. M34-M40, 2011.

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

POZZO, M. D.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D. F.; ROSSATTO, L.; SOARES, I. H.; ALVES, S. H.; COSTA, M. M. da. 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.

RAJKOVIC, A.; SMIGIC, N.; DEVLIEGHERE, F. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. **International Journal of Food Microbiology**, p. 1-14, 2010.

RIGOBELLO, E. C.; TAKAHASHIB, L. S.; NICODEMOC, D.; ÁVILA, B. A.; MALUTA, R. P.; RUIZ, U. S., STELLA, A. E.. Virulência de cepas de *Escherichia coli* isoladas de carcaças de ovinos. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 4, p. 475-482, 2008.

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

RODRIGUES, A. C. A.; PINTO, P. S. A.; VANETTI, M. C. D.; BEVILACQUA, P. D.; PINTO, M. S.; NERO, L. A. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1869-1875, 2008.

ROTA, E. L.; OSÓRIO, M. T. M.; OSÓRIO, J. C. S.; OLIVEIRA, M. M.; WIEGAND, M. M.; MENDONÇA, G.; ESTEVES, R. M.; GONÇALVES, M. Influência da castração e da idade de abate sobre as características subjetivas e instrumentais da carne de cordeiros Corriedale. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2397-2405, 2006.

SÁ, J. L. de; Sá, C. O. de; SOBRAL, P. H. M.; COSTA, C. X.; SILVA, A. V. C. da; MUNIZ, E. N.; CIPRIANO, L. W.; CORREIA NETO, J. Análise sensorial e microbiológica da carne ovina submetida a diferentes formas de conservação no pós-abate. In: **Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte**, 3, 2007, João Pessoa. Anais do III Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte. João Pessoa: 05 a 10 de nov. 2007. p. 1-4.

SANTOS, Y. O.; ALMEIDA, R. C. de C.; Gil GUIMARÃES, A.; ALMEIDA, P. F. Hygienic-sanitary quality of vegetables and evaluation of treatments for the elimination of indigenous *E. coli* and *E. coli* O157:H7 from the surface of leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1083-1089, 2010.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, 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**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SENGUN, I. Y.; KARAPINAR, M. Effectiveness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of *Salmonella typhimurium* on carrots (*Daucus carota* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 301– 305, 2004.

SENNA, A. J. T.; PEDROZO, E. Á.; KOLLER, O. C. Identificação e análise da cadeia de distribuição das frutas cítricas de mesa sem sementes: um estudo de caso na cidade de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 508-512, 2007.

SHIBUYA, C. M. **Análise sensorial da carne (m. L. dorsi) de novilhos terminados com dietas de milho seco vs. úmido, com ou sem gordura protegida (lactoplus), e de lactoplus vs. caroço de algodão**. 2004. 99 f. dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SILVA, J. A. **Extensão da vida-de-prateleira da carne bovina pela utilização de sanitizantes físicos e químicos**. 1995. 141 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

SILVA, J. A.; SOARES, L. F.; COSTA, E. L. Sanitização de carcaças de frango com soluções de ácidos orgânicos comerciais e suco de limão. **Revista Tec Carnes**, v. 3, n. 1, p.19-26, 2001.

SILVA, L. L.; HELDWEIN, C. G.; REETZ, L. G. B.; HÖRNER, R.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 700-705, 2010.

SILVA, M. G. de V.; CRAVEIRO, A. A.; ABREU MATOS, F. J.; MACHADO, M. I. L.; ALENCAR, J. W. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, p. 32-34, 1999.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 536 p.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SIQUEIRA, E. R.; ROÇA, R. O.; FERNANDES, S.; UEMI, A. Características sensoriais da carne de cordeiros das raças Hampshire Down, Santa Inês e mestiços Bergamácia x Corriedale abatidos com quatro distintos pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 2397-2405, 2002.

SOFOS, J. N. Challenges to meat safety in the 21st century. **Meat Science**, v. 78, p. 3–13, 2008.

SOLOMAKOS, N.; GOVARIS, A.; ANGELIDIS, A.S.; POURNARAS, S.; BURRIEL, A.R.; KRITAS, S.K.; PAPAGEORGIOU, D.K. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. **Food Microbiology**, v. 26, p. 865–871, 2009.

SOUSA, C. P. de. The impact of food manufacturing practices on food borne diseases. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, p. 815-823, 2008.

SOUZA, E. L. de; BARROS, J. C. de; CONCEIÇÃO, M. L. da; GOMES NETO, N. J.; COSTA, A. C. V. da. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 387-393, 2009.

SOUZA, M. F.; SOUZA JUNIOR, I. T.; GOMES, P. A.; FERNANDES, L. A.; MARTINS, E. R.; COSTA, C. A.; SAMPAIO, R.A. Calagem e adubação orgânica na produção de biomassa e óleo essencial em *Lippia citriodora* Kunth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 401-405, 2010.

SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W. de; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, p. 2091-2106, 2009.

SWANSON, K. M. J.; PETRAN, R. L.; HANLIN, J. H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap. 6, p. 53-67.

TAJKARIMI; M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p. 1199–1218, 2010.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TODD, E. C. D. Microbiological safety standards and public health goals to reduce foodborne disease. **Meat Science**, v. 66, p. 33–43, 2003.

TORREZAN, R. Uso da tecnologia de alta pressão para a inativação de microrganismos em produtos cárneos. **Boletim CEPPA**, v. 21, n. 2, p. 249-266, 2003.

TRESOLDI, G. **Atividade antimicrobiana desinfetante “in vitro” de extrações vegetais (decoctos) frente bactérias padronizadas de interesse em medicina veterinária – sub projeto *Casearia sylvestris* e *Polygonum hydropiperoides***. 2008. 52 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VASCONCELOS, E. C.; ZAPATA, J. F. F.; FIGUEIREDO, E. A.; CASTELO BRANCO, M. A. A.; BORGES, A. S. A microbiota da carcaça e da carne ovina tratada com ácido acético, embalada a vácuo e maturada por 48 dias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 272-277, 2002.

VELUSAMY, V.; ARSHAK, K.; KOROSTYNSKA, O.; OLIWA, K.; ADLEY, C. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 232–254, 2010.

VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 410-415, 2008.

VIANA, J. G. A.; SILVEIRA, V. C. P. Análise econômica da ovinocultura: estudo de caso na Metade Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1187-1192, 2009.

VIÇOSA, G. N.; MORAES, P. M.; YAMAZI, A. K.; NERO, L. A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. **Food Microbiology**, v. 27, p. 447-452, 2010.

WENQIANG, G.; SHUFEN, L.; RUIXIANG, Y.; SHAOKUN, T.; CAN, Q. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1558–1564, 2007.

YILMA, Z.; FAYE, B.; LOISEAU, G.. Occurrence and distribution of species of *Enterobacteriaceae* in selected Ethiopian traditional dairy products: A contribution to epidemiology. **Food Control**, v. 18, p. 1397–1404, 2007.

YOSSA, N.; PATEL, J.; MILLER, P.; LO, Y. M. Antimicrobial activity of essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 in organic soil. **Food Control**, v. 21, p. 1458–1465, 2010.

ZWEIFEL, C.; FISCHER, R.; STEPHAN, R. Microbiological contamination of pig and cattle carcasses in different small-scale Swiss abattoirs. **Meat Science**, v. 78, p. 225–231, 2008.

## APÊNDICE A

TABELA 1  
Componentes químicos do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. (%)

P	Substâncias	% relativa	IR.	IR lit.*	P	Substâncias	% relativa	IR.	IR lit.*
1	triciclano	1,07	923	926	16	ni	0,30	1172	..
2	$\alpha$ -pineno	0,30	930	939	17	timol	8,07	1287	1290
3	Sabineno	0,21	969	975	18	<i>o</i> -metoxiacetofenona	0,22	1289	1291
4	$\beta$ -pineno	0,17	973	979	19	carvacrol	0,27	1295	1299
5	mirreno	1,21	987	990	20	eugenol	61,28	1355	1359
6	$\alpha$ -felandreno	0,18	1002	1002	21	<i>trans</i> -cariofileno	1,60	1415	1419
7	$\alpha$ -terpineno	1,02	1013	1017	22	$\alpha$ -humuleno	0,20	1454	1449
8	<i>p</i> -cimeno	5,23	1020	1024	23	$\beta$ -farneseno	0,15	1453	1458
9	limoneno	0,33	1025	1029	24	germacreno D	0,25	1477	1477
10	<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno	1,14	1033	1037	25	$\beta$ -selineno	0,38	1482	..
11	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	0,17	1043	1050	26	$\alpha$ -selineno	0,19	1491	1498
12	$\gamma$ -terpineno	8,88	1054	1059	27	$\beta$ -bisaboleno	4,98	1504	1505
13	ni	0,19	1062	..	28	acetato de eugenila	0,60	1520	1522
14	<i>m</i> -cimeno	0,45	1084	1085	29	ni	0,40	..	..
15	linalol	0,58	1095	1096	<b>Total identificado</b>		<b>99,11</b>	..	..

P: Pico

IR: Índice de retenção

IR lit. \*: Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007)

ni= substância não identificada.

Fonte: Instituto Agronômico de Campinas, 2011.

Nota: Dados trabalhados pela autora.

## APÊNDICE B

TABELA 2  
Componentes químicos do óleo essencial de  
*Syzygium aromaticum* L. (%)

Pico	Substâncias	% relativa	IR	IR lit.*
1	ni	0,29	..	..
2	eugenol	88,93	1357	1359
3	<i>trans</i> -cariofileno	3,23	1415	1419
4	$\alpha$ -humuleno	0,49	1449	1454
5	acetato de eugenila	6,80	1521	1525
6	óxido de cariofileno	0,26	1578	1583
<b>Total identificado</b>		<b>99,71</b>	..	..

IR: Índice de retenção

IR lit.\*: Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007)

ni= substância não identificada

Fonte: Instituto Agronômico de Campinas, 2011.