

Renatta Soares Souza

Elaboração de Linguiça Frescal de frango adicionada de óleos essenciais

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Área de Concentração: Produção Animal

Linha de Pesquisa: Qualidade de Alimentos de Origem Animal

Orientador: Ernane Ronie Martins

Coorientadores: Roberta Torres Careli
Rogério Marcos de Souza

MONTES CLAROS

2017

Souza, Renatta Soares
S754e
2017

Elaboração de linguiça frescal de frango adicionada de óleos essenciais / Renatta Soares Souza, Montes Claros, MG: Instituto de Ciências Agrárias/UFMG, 2017.
81 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

Orientador: Prof. Ernane Ronie Martins.

Banca examinadora: Anna Claudia Chesca, Francine Souza Alves da Fonseca, Roberta Torres Careli e Ernane Ronie Martins.

Referências: Por capítulo.

1. Tecnologia de Alimentos. 2. Óleos essenciais. I. Martins, Ernane Ronie. II. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. III. Título.

CDU: 664

Renatta Soares Souza

Elaboração de Linguiça Frescal de frango adicionada de óleos essenciais

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Área de Concentração: Produção Animal

Linha de Pesquisa: Qualidade de Alimentos de Origem Animal

Orientador: Ernane Ronie Martins

Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof^a Dra. Anna Claudia Chesca - UNIUBE

Prof^a Dra. Francine Souza Alves da Fonseca – Faculdades Prisma

Prof^a Dra. Roberta Torres Careli (Co-orientadora) - ICA-UFMG

Prof. Dr. Ernane Ronie Martins- (Orientador) - ICA – UFMG

Montes Claros, 30 de junho de 2017

AGRADECIMENTO

A Deus por permitir a conclusão de mais uma etapa em minha vida e a Santíssima Virgem Maria pela intercessão e cuidado ao longo dessa trajetória.

Aos meus pais, Rena e Mário, pelo incentivo, apoio e por sempre estarem ao meu lado. Ao meu noivo, Dhyego, por todo amparo, amor e companheirismo nos momentos de vitórias e derrotas.

A equipe do Laboratório de Plantas Mediciniais: Júlio, Amanda, Manú, e Messulan, pelo apoio, suporte e por todos os ensinamentos. A Francine por todos os conselhos, apontamentos e contribuições.

A professora Anna Cristina e à técnica do Laboratório de Sanidade animal, Cintya, pelo espaço cedido no laboratório, pelo acompanhamento do projeto e auxílio durante a execução do experimento.

Ao professor Demerson e a equipe do Laboratório de Biotecnologia. Aos técnicos, Adair, Carla e Hugo pelo auxílio no desenvolvimento das pesquisas. À Ane e Érica do Laboratório de Química pela realização das análises complementares necessárias.

Aos co-orientadores Roberta Careli e Rogério Marcos pela disposição, carinho e apoio durante a carreira acadêmica, realização do Mestrado e execução do projeto.

Ao orientador, Ernane Ronie Martins, pela paciência, disponibilidade, entusiasmo e por ter aceito o desafio da realização desse projeto.

As amigas Francielly, Luana, Priscila e Patrícia pelo apoio, auxílio no desenvolvimento das análises, amizade e companheirismo! Todas as dificuldades foram superadas com o apoio de vocês.

RESUMO

A linguiça frescal contém aditivos químicos utilizados em sua formulação com o objetivo de aumentar a vida de prateleira, inibir a ação de microrganismos e a oxidação lipídica. No entanto, além das propriedades antimicrobianas e antioxidantes, o emprego dos sais de cura, nitrato e nitrito, podem provocar danos à saúde do consumidor. Nesse contexto, os aditivos naturais à base de óleos essenciais (OEs) consistem em uma alternativa para atender à demanda por produtos sem adição de conservantes e aditivos químicos. Esse estudo tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante dos OEs de *Origanum vulgare* L. e *Lippia origanoides* Kunth. aplicados em linguiça frescal de frango. A avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos OEs frente a estirpes de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Choleraesuis ATCC 10708 e *Escherichia coli* ATCC 25923 foi realizada pela CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima) pela técnica de macrodiluição. A atividade antioxidante foi determinada pelo ensaio com radical DPPH para determinação da CE_{50} (concentração eficiente 50%) e Índice de Atividade Antioxidante (IAA). A composição química dos OE foi determinada por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). O OE de orégano apresentou CIM e CBM de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as estirpes de *S. coagulase positiva* e *E. coli* e CIM de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CBM de $40 \mu\text{L/mL}$ para *Salmonella*. O óleo essencial (OE) de alecrim-pimenta apresentou valores de CIM de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as estirpes de *S. coagulase positiva* e *E. coli* e de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *Salmonella*, os valores de CBM foram de $40 \mu\text{L mL}^{-1}$ para *S. coagulase positiva* e *Salmonella* e de $10 \mu\text{L mL}^{-1}$ para *E. coli*. O OE de alfavaca não apresentou inibição dos microrganismos testados, no entanto, apresentou a melhor atividade antioxidante com CE_{50} de $3,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e IAA=12,3. Foram identificados como compostos majoritários: o carvacrol para o OE de alecrim-pimenta, 4-terpineol para o OE de orégano e o-cimeno para a alfavaca. A determinação do efeito antimicrobiano dos OE na matriz alimentar foi realizada por meio das análises de coliformes a 45°C , *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella* sp. As análises físico-químicas de determinação do pH, oxidação lipídica pelo método de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a análise dos voláteis via HS-CG/EM foram realizadas com o intuito de verificar a permanência dos OEs e a estabilidade do produto final. As linguiças frescas adicionadas de OE de orégano e alecrim-pimenta apresentaram-se aptas para o consumo e com qualidade microbiológica adequada durante o armazenamento. Não foram detectadas alterações nos valores de pH proveniente da adição de OE. Todas as amostras permaneceram estáveis sem o desenvolvimento de oxidação lipídica e foi possível identificar a presença dos principais marcadores químicos ao final do período de armazenamento. Os resultados observados demonstram alto potencial para a aplicação de OEs como agentes antioxidantes e antimicrobianos em alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, oxidação lipídica, *Origanum vulgare* L., *Lippia origanoides* Kunth.

ABSTRACT

The fresh sausage contains chemical additives used in its formulation with the aim of increase the shelf life, inhibit the action of microorganisms and lipid oxidation. However, beyond the antimicrobial and antioxidant properties, the use of curing salts, nitrate and nitrite, may cause harm to the health of the consumer. In this context, natural essential oil additives (EOs) consist of an alternative to attend the demand for products without the addition of preservatives and chemical additives. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of EOs of *Origanum vulgare* L. and *Lippia origanoides* Kunth. applied in fresh chicken sausage. The evaluation of the in vitro antimicrobial activity of EOs against the strains of *S. coagulase* positive ATCC 25923, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708 and *Escherichia coli* ATCC 25923 were performed by MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) by the macrodilution method. The antioxidant activity was determined by the DPPH radical assay for determination of EC₅₀ (50% efficient concentration) and Antioxidant Activity Index (AAI). The chemical composition of EO was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The EO of oregano showed MIC and MBC of 5 µg mL⁻¹ to the strains of *S. coagulase* positive and *E. coli* and MIC of the 20 µg mL⁻¹ and MBC of the 40 µg mL⁻¹ for *Salmonella*. The EO of alecrim-pimenta showed values of MIC of the 10 µg mL⁻¹ for the strains of *S. coagulase* positive and *E. coli* and 40 µg mL⁻¹ for *Salmonella*, the values of MBC were 40 µg mL⁻¹ for *S. coagulase* positive and *Salmonella* and 10 µg mL⁻¹ for *E. coli*. The EO of basil did not showed inhibition of the tested microorganisms, however, it presented the best antioxidant activity with EC₅₀ of 3.25 µg mL⁻¹ and AAI = 12.3. Carvacrol was identified as major compound for EO of alecrim-pimenta, 4-terpineol for EO of oregano and o-cymene for alfavaca. The determination of the antimicrobial effect of EO in the food matrix was realized by Coliforms at 45 °C, *S. coagulase* positive and *Salmonella* sp. Physical-chemical analyses of pH, lipid oxidation by the thiobarbituric acid reaction (TBARS) and the analysis of the volatiles via HS-CG/MS were realized with the purpose of verifying the permanence of the oils and the stability on the final product. The fresh sausages added with EO of oregano and alecrim-pimenta were suitable to be consumed with adequate microbiological quality during storage. Changes were not detected in the pH values from the addition of OE. All samples remained stable without the development of lipid oxidation and it was possible to identify the presence of the main chemical markers at the end of the storage period. The results demonstrate high potential for the application of EOs as antioxidant and antimicrobial agents in food.

Keywords: Antimicrobial activity, antioxidant activity, lipid oxidation, *Origanum vulgare* L., *Lippia origanoides* Kunth.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de literatura.....13

Figura 1 – Esquema geral do mecanismo de autoxidação..... 19

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Artigo 1 – Atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>Ocimum gratissimum</i> L., <i>Lippia origanoides</i> Kunth. e <i>Origanum vulgare</i>	43
Tabela 1- Composição química dos óleos essenciais, extraído das folhas de <i>Ocimum gratissimum</i> L. (alfavaca) <i>Origanum vulgare</i> L.(orégano) e <i>Lippia origanoides</i> Kunth.(alecrim-pimenta).....	54
Tabela 2- Atividade antioxidante de óleos essenciais em ensaio do DPPH.	55
Tabela 3 - Índice de atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>Ocimum gratissimum</i> L., <i>Origanum vulgare</i> L. e <i>Lippia origanoides</i> Kunth.	56
4.2 Artigo 2 :Uso de óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> L. e <i>Lippia origanoides</i> Kunth. para controle de atividade antimicrobiana e oxidação lipídica em linguiça frescal de frango.....	66
Tabela 1 - Contagens de coliformes a 45 °C durante o armazenamento de amostras de linguiças frescal de frango adicionadas de óleo essencial de <i>Ocimum vulgare</i> L. e <i>Lippia origanoides</i> Kunth.	77
Tabela 2 - Valores médios do índice de TBARS na linguiça frescal de frango tratadas com óleo essencial durante o período de armazenamento.....	78
Tabela 3 - Compostos extraídos por técnica de <i>headspace</i> (HS) da linguiça frescal de frango acrescida de óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> e <i>Lippia origanoides</i> e analisados por CG-EM.	79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.1 Objetivos Específicos	10
3 REVISÃO LITERATURA	11
3.1 Produção e comercialização de embutidos no Brasil	11
3.2 Emprego de nitrito e nitrato em produtos cárneos embutidos	11
3.3 Contaminação microbiológica em produtos embutidos	12
3.3.1 <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	13
3.3.2 <i>Salmonella</i> sp.	14
3.3.3 Coliformes Totais e Coliformes termotolerantes	14
3.4 Óleos essenciais	15
3.4.1 Alecrim-pimenta (<i>Lippia origanoides</i> Kunth.)	15
3.4.2 Alfavaca (<i>Ocimum gratissimum</i> L.)	16
3.4.3 Orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	17
3.5 Avaliação do efeito antimicrobiano dos óleos essenciais	18
3.6 Atividade antioxidante de óleos essenciais.....	19
3.7 Aplicação de óleo essencial em produtos cárneos	20
REFERÊNCIAS	21
4 ARTIGOS	31
4.1 Artigo 1 – Atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>Ocimum gratissimum</i> L., <i>Lippia origanoides</i> Kunth. e <i>Origanum vulgare</i> L.	31
4.2 Artigo 2 :Uso de óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> L. e <i>Lippia origanoides</i> Kunth. para controle de atividade antimicrobiana e oxidação lipídica em linguiça fresca de frango.....	57
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80

1 INTRODUÇÃO

Os produtos cárneos processados, denominados embutidos, representam um segmento importante das carnes industrializadas. São classificados como embutidos os produtos obtidos através de matérias-primas cárneas submetidas à fragmentação seguida de mistura com diferentes ingredientes e acondicionamento em tripas naturais ou artificiais, com ou sem cozimento (LEMOS *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Neste contexto, inclui-se a linguiça, classificada de acordo com a Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado (BRASIL, 2000). De acordo com a mesma legislação, a linguiça fresca caracteriza-se como produto cru e curado de carne, gordura e outros ingredientes.

As linguiças produzidas artesanalmente sofrem intensa manipulação durante o seu processamento, aumentando a possibilidade de contaminação por microrganismos indesejáveis (MERLINNI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2016). Os conservantes químicos são utilizados como alternativa para controle de microbiota indesejável em alimentos (FERREIRA *et al.*, 2013).

Os sais de cura, nitrito e nitrato, comumente adicionados em produtos embutidos, atuam como conservantes e seu uso previne o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, dentre eles o *Clostridium botulinum*, retarda a oxidação lipídica e garantem características de produto processado, como a coloração rósea e o sabor característico de cura (LEMOS *et al.*, 2008, TERRA *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos demonstram que as N-nitrosaminas e os compostos N-nitrosos formados através da reação de agentes nitrosantes, derivados de sais de nitrito ou óxido nítrico, induzem a formação de tumores levando ao aumento na produção de radicais livres e danos celulares (DEMEYER *et al.*, 2008, STIEVEN e SOUZA, 2012; MARTINS, MIDIO, 2000).

As N-nitrosaminas podem ser formadas durante o processamento de alimentos. Em geral, alimentos como vegetais, carnes, frutas, peixes e leite apresentam baixos teores de N-nitrosaminas. No entanto, o processo de cura realizado na produção de embutidos, etapa na qual são adicionados nitrito e nitrato, favorecem o aumento do nível de nitrosaminas (SINDELAR e MILKOWSKI, 2011).

Devido à toxicidade, o risco de doenças acarretadas pelo intenso consumo de aditivos sintéticos e a preferência dos consumidores por alimentos saudáveis observa-se um crescente interesse no desenvolvimento de produtos com aditivos naturais, e livres de conservantes que sejam capazes de preservar os alimentos das alterações indesejáveis (SINDELAR *et al.*, 2007; EBRAHIMABADI *et al.*, 2010).

Os antioxidantes naturais são substitutos em potencial aos conservantes químicos, no entanto, sua aplicação deve ser estudada a fim de que a quantidade empregada não provoque alterações sensoriais nos alimentos (ROSA *et al.*, 2013).

Nesse contexto, a utilização de óleos essenciais (OEs) é uma alternativa viável, os quais são biossintetizados em diferentes partes das plantas e consistem em uma mistura de baixa massa molar. Além do uso como antimicrobiano os OEs podem ser utilizados para conferir características organolépticas aos alimentos (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012; BURT *et al.*, 2004).

Origanum vulgare L., *orégano*, planta nativa do Mediterrâneo, é um dos condimentos mais utilizados no mundo, suas folhas são comumente utilizadas secas na forma de tempero, conhecido por aroma característico em função do alto teor de carvacrol (LORENZI; MATOS, 2008; MORAIS *et al.*, 2009). Os compostos fenólicos presentes no óleo essencial (OE) extraídos desta planta são responsáveis pela ação antimicrobiana através da lesão da membrana plasmática, comprometendo a divisão celular, promovendo a desidratação das células bacterianas (RODRIGUES, 2004, WALSH *et al.*, 2003).

Lippia origanoides Kunth., popularmente conhecida como alecrim-pimenta, é encontrada em regiões semiáridas. O OE é rico em timol e carvacrol, apresentando atividade frente a bactérias e fungos. A atividade antimicrobiana do OE de alecrim-pimenta possui comprovação em diversos estudos (COSTA *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2011; QUEIROZ *et al.*, 2014).

Ocimum gratissimum, alfavaca, possui OE rico em eugenol e apresenta propriedades antibacterianas, fungicidas, analgésica, anticonvulsiva e como agente aromatizante para alimentos (SARTORATTO *et al.*, 2004; UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais (OEs) de *Origanum vulgare L.*, *Lippia origanoides* Kunth. e *Ocimum gratissimum L.* adicionados em linguiça frescal de frango.

2.1 Objetivos Específicos

- Determinar a composição química dos OEs de *Origanum vulgare L.* (orégano), *Lippia origanoides* Kunth. (alecrim-pimenta) e *Ocimum gratissimum L.* (alfavaca);
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos OEs através do DPPH, concentração efetiva (CE₅₀) e índice de atividade antioxidante (IAA);
- Determinar as Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos OEs frente a estirpes de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708 e *Escherichia coli* ATCC 25923;

- Formular linguiça frescal de frango adicionada dos óleos essenciais de orégano, alecrim-pimenta e alfavaca;
- Detectar a atividade antimicrobiana dos OEs aplicados na matriz alimentar frente à *Salmonella* sp., *Staphylococcus* coagulase positiva, e Coliformes a 45 °C;
- Monitorar o pH, a oxidação lipídica e os compostos remanescentes no OE através da análise cromatográfica na linguiça frescal de frango por 21 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 °C.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção e comercialização de embutidos no Brasil

Tem sido observada a substituição do consumo de carne *in natura*, alimento altamente perecível, por produtos que apresentem maior praticidade e *shelf life*, como os embutidos (OLIVEIRA; ARAÚJO; BORGIO, 2005). Dentre os produtos cárneos comercializados estão as linguiças do tipo frescal, que se destacam no comércio pela sua forte relação cultural e econômica no Brasil (BARBOSA *et al.*, 2010).

De acordo com a Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a linguiça é o produto cárneo industrializado obtido de carnes de animais de açougue, adicionado ou não de tecidos adiposos (toucinho), ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial e submetido ao processo tecnológico adequado (BRASIL, 2000).

A linguiça frescal caracteriza-se como o produto cru e curado, de carne, gordura e outros ingredientes e deve apresentar 70% de umidade máxima, 30% de gordura, e no mínimo, 12% de proteína, sendo proibida a adição de carne mecanicamente separada (CMS). Classificam-se, de acordo com a técnica utilizada para fabricação, como produto fresco, seco, curado e ou maturado, cozido entre outros (BRASIL, 2000).

A linguiça do tipo frescal é um dos produtos cárneos mais consumidos no Brasil e são conhecidas pelo seu sabor peculiar e preço acessível (JESUS JUNIOR; RODRIGUES; MORAES, 2010). A aceitação de linguiça frescal aumentou cerca de 60% entre os anos de 2000 e 2008 e a taxa de consumo por brasileiro é de cerca de 1,7 kg por pessoa/ano (NIELSEN, 2010).

O produto apresenta alta atividade de água (A_w), possui curto prazo comercial e a qualidade microbiológica depende de baixos níveis de contaminação da matéria-prima, dos ingredientes empregados e da manutenção das boas práticas de fabricação durante o processamento (DIAS *et al.*, 2008 ; MERLINNI *et al.*, 2012, BAÚ *et al.*, 2012).

3.2 Emprego de nitrito e nitrato em produtos cárneos embutidos

Os sais de cura, nitrato e nitrito, são aditivos comumente adicionados aos embutidos e atuam como conservantes, evitando a deterioração do produto, sendo que também apresentam função antioxidante e de realçador de sabor. A adição desses sais proporciona a estabilização da cor, melhora na textura e atividade antimicrobiana frente a patógenos (PETENUCCI *et al.*, 2004, JAY, 2005).

A legislação brasileira determina que os valores máximos para adição de nitrito e nitrato de sódio são de 0,015/100g e 0,03/100g, respectivamente (BRASIL, 2001). A Ingestão diária aceitável (IDA) para o nitrito, é de 0-0,06 mg kg⁻¹ de peso corpóreo, e para o nitrato, é de 0-3,7 mg kg⁻¹ de peso corpóreo. Ambos não devem ser consumidos por crianças abaixo de três meses de idade (FAO, 2013).

Apesar da importância econômica e dos efeitos benéficos comprovados, o uso dessas substâncias, como aditivos alimentares, pode causar danos à saúde humana (DAGUER *et al.*, 2011). Estudos demonstram que ocorrem reações tóxicas ao organismo decorrentes da ingestão de grande quantidade de nitrito ou nitrato (FERREIRA *et al.*, 2013).

O principal objetivo do uso de sais de cura é conferir a coloração rósea e as características de produto típico curado. Em pH baixo, o nitrito se decompõe em óxido nítrico, que atua como agente fixador de cor que se liga à mioglobina da carne, formando nitrosomioglobina. No entanto, se a cor do produto não for fixada corretamente pela ação do calor (55 °C), o óxido nítrico se dissocia no período de estocagem, podendo formar nitroso-hemocromo, conferindo coloração avermelhada estável ao produto (ADAMI *et al.*, 2015; LEMOS *et al.*, 2008, HONIKEL, 2008).

Os nitratos apresentam baixa toxicidade, no entanto sua capacidade tóxica aumenta através da sua redução a nitrito. Esse composto possui a capacidade de interagir com as aminas e amidas secundárias e terciárias formando nitrosaminas e nitroamidas com grande potencial carcinogênico (DAGUER *et al.*, 2011).

A ingestão excessiva desses íons aumenta os níveis de meta-hemoglobina no sangue, reação que ocorre quando os mecanismos contra estresse oxidativo, dentro das hemácias, são desativados. Esses mecanismos podem ser inibidos através da exposição a agentes metemoglobinizantes como, por exemplo, os nitritos e nitratos (NASCIMENTO, 2008; GUERREIRO *et al.*, 2012).

Devido à importante função exercida pelo nitrito no processo de cura, qualidade e segurança alimentar, a substituição desse aditivo por compostos naturais tem sido amplamente estudada com vistas a proporcionar a produção de alimentos com cura natural e orgânicos (BACUS *et al.*, 2010).

3.3 Contaminação microbiológica em produtos embutidos

O processamento de embutidos frescos apresenta como pontos críticos as condições físicas e de higiene inadequadas durante a formulação e comercialização do produto (FRANCO *et al.*, 2010). O risco de contaminação química e microbiológica da carne ocorre em todas as

etapas do processamento desde o abate até o preparo do alimento, sendo necessário o controle de toda a cadeia produtiva até a obtenção do produto final (DESMARCHELIER *et al.*, 2007).

Os aditivos, condimentos e especiarias adicionados durante o processamento visam preservar a qualidade microbiológica e realçar o sabor da linguiça frescal. No entanto, esses produtos não sofrem processo de cozimento ou secagem anteriores ao emprego nas formulações, devendo assim atender aos padrões microbiológicos a fim de evitar contaminação inicial ou aumento do nível de microrganismos presentes na carne durante o processamento (SALVATORI *et al.*, 2003; SPRICIGO *et al.*, 2008; RALL *et al.*, 2009).

Dentre os microrganismos patogênicos, que podem contaminar a carne, encontram-se *Salmonella* sp., *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (BIRZELE; DJORDJEVIC; KRAMER, 2005). Em estudo realizado por Talon *et al.* (2007), em 54 unidades processadoras de embutidos, constatou-se que todas as unidades apresentavam contaminação por microrganismos deteriorantes, mesmo após a limpeza e desinfecção das superfícies. No estudo, os pontos de maior incidência de contaminação foram os equipamentos para corte e embutimento, paredes das câmaras frias e as mesas e facas.

No Brasil, *Salmonella* sp. é o microrganismo responsável pela maior parte das doenças transmitidas por alimentos sendo esse agente etiológico responsável por 42,2% dos casos registrados. A carne e os seus derivados são os alimentos responsáveis pelo maior número de surtos (BRASIL, 2011).

O monitoramento da temperatura da carne é um fator importante, que deve ser controlado durante todo o processo de obtenção e processamento da matéria-prima, visando diminuir a deterioração e garantir a segurança microbiológica dos produtos (NYCHAS *et al.*, 2008).

A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001) estabelece para linguiças frescas o limite máximo de 5×10^3 UFC/g para coliformes termotolerantes, 5×10^3 UFC/g para *Staphylococcus* coagulase positiva, 3×10^3 UFC/g para *Clostridium* sulfito redutor e ausência de *Salmonella* sp. em 25g de alimento. É importante ressaltar que a linguiça se apresenta como excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos por apresentar características de pH pouco ácido, alta atividade de água (A_w) e grande variedade de ingredientes (BEZERRA, 2012).

3.3.1 *Staphylococcus* coagulase positiva

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* spp. são cocos Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e em sua maioria não-encapsulados. Podem apresentar-se isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados em cachos, devido à sua divisão celular, que ocorre em três planos perpendiculares (CASSETTARI; STRABELLI e MEDEIROS, 2005; KONEMAM; ALLEN e JANDA 2001; TRABULSI e ALTHERTHUM, 2005). São anaeróbios facultativos, apresentando crescimento

em meios hipertônicos, em variado espectro de pH, com crescimento em temperaturas entre 7 °C e 48,5 °C (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

Todas as espécies de *Staphylococcus* produzem a enzima catalase, responsável pela degradação de H₂O₂ em H₂O. A produção de catalase é considerada fator de virulência, visto que o H₂O₂ durante o processo de degradação limita a habilidade de eliminação dos patógenos dos neutrófilos. Alguns *Staphylococcus* produzem coagulase, enzima capaz de coagular o plasma sanguíneo através da ativação da protrombina (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Algumas espécies são capazes de produzir enterotoxinas no alimento e causar infecções no consumidor (ARGUDÍN, 2010).

3.3.2 *Salmonella* sp.

Os microrganismos do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes Gram-negativos, não fermentadores de lactose, sendo algumas produtoras de H₂S. Apresentam motilidade, não possuem esporos, são anaeróbios facultativos. O gênero inclui várias espécies e sorotipos patogênicos. Os sorotipos mais importantes são *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Newport (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

São termosensíveis, sendo eliminadas pelo binômio tempo x temperatura de 60 °C por 15 min, sua temperatura ótima de crescimento varia entre 35 e 43°C, com pH ótimo de 7 a 7,5 e atividade de água (aw) mínima de 0,93 (RITTER *et al.*, 2003). Os alimentos mais susceptíveis à contaminação são o leite, queijo, chocolate e carnes frescas (FDA, 2008).

Souza *et al.* (2014) constataram *Salmonella* sp. em 30,0% das amostras analisadas de linguiça artesanal. Em estudo realizado por Alberti e Nava (2014) aproximadamente 67,0% das amostras de linguiça industrializadas apresentaram contaminação por *Salmonella* sp.

Estudos demonstram que o OE de orégano possui propriedades antimicrobianas frente a microrganismos patogênicos e deterioradores (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2009). Dentre eles, a *Salmonella*, no entanto, a susceptibilidade microbiana e a eficiência do OE é dependente da sorovar utilizada (SANTURIO *et al.*, 2007).

3.3.3 Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C

Os coliformes a 35°C classificam-se como bastonetes, Gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose e produtores de gás no período de 24 a 48 h na temperatura de 35°C. Os coliformes a 45°C possuem a capacidade de fermentar a lactose e produzir gás a 45°C em 24 h. Os principais gêneros que representam os coliformes a 35°C são *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, sendo *E. coli* o melhor indicador de contaminação fecal. Os coliformes a 45°C englobam as culturas de *E. coli*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (JAY, 2005).

A presença de coliformes em alimentos é considerada um indicador de más condições higiênico-sanitárias nos ambientes onde ocorrem a preparação e armazenamento e costumam ser frequentes em amostras de alimentos em que ocorre frequente processo de manipulação (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Cortez *et al.* (2004) identificaram a presença de coliformes em 73,6% das amostras de linguiça frescal de frango coletadas no estado de São Paulo. Alberti e Nava (2014) constataram a presença de coliformes totais em todas as amostras de linguiça frescal analisadas, independentemente do tipo de carne utilizada como matéria-prima. Dias *et al.* (2008) analisaram 43 amostras de embutidos frescos e identificaram coliformes termotolerantes em uma amostra e *Salmonella* sp. em três amostras de linguiça de frango.

3.4 Óleos essenciais

O Brasil apresenta a maior diversidade vegetal do planeta, no país encontram-se aproximadamente 55 mil espécies de plantas superiores, distribuídas nos diversos biomas (ALBERNAZ *et al.*, 2010). Parte dessa flora apresenta em sua composição metabólitos secundários como os OEs, os quais são utilizados em diversas aplicações na medicina popular, motivando as pesquisas científicas com vistas a comprovar a atividade antimicrobiana e antioxidante de compostos naturais (ANDRADE *et al.*, 2012; LANG; BUCHBAUER, 2012)

De acordo com a ISO (International Standard Organization), os OE são produtos obtidos de partes de plantas por meio da destilação por arraste com vapor d'água ou por produtos obtidos da expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Classificados como *Generally Recognized As Safe*, ou GRAS, são seguros para a saúde e possuem propriedades antibacterianas e antioxidantes comprovadas (SIMÕES *et al.*, 2007).

Os OEs são metabólitos secundários extraídos de diversas partes da planta, sendo que podem conter de 20 a 60 componentes em concentrações variáveis, apresentando alguns componentes majoritários (20-70%) (BAKKALI *et al.*, 2008, OUSSALAH *et al.*, 2007).

O uso de produtos naturais, na forma de extratos e OE, que apresentam ação inibitória sobre diversos microrganismos consiste em uma alternativa para diminuir a resistência bacteriana adquirida devido ao uso frequente de antibióticos (SILVA *et al.*, 2010).

O antimicrobiano ideal deve apresentar grande espectro de ação, baixa toxicidade, custo e índice de resistência bacteriana (ALVARENGA *et al.*, 2007). Segundo Rahman e Kang (2009), os OEs contêm mistura de substâncias antimicrobianas que atuam através de diversos mecanismos distintos, o que diminui o risco que microrganismos patogênicos possam desenvolver resistência.

3.4.1 Alecrim-pimenta (*Lippia origanoides* Kunth.)

O gênero *Lippia* abrange cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e árvores de pequeno porte (TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996), o alecrim-pimenta (*Lippia origanoides* Kunth.) é uma espécie aromática e medicinal nativa da Região Nordeste do Brasil, encontrada principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte (COSTA *et al.*, 2002), também com ocorrência no Norte de Minas Gerais (MORAIS *et al.*, 2012). É um arbusto caducifólio, ereto, com altura entre 2-3 m. Suas folhas apresentam forte cheiro picante e as flores são pequenas e esbranquiçadas (MATOS, 2000; MATOS, 2002).

Segundo Souza *et al.* (2007) o alecrim-pimenta pode apresentar teor de até 4 % de OE, com terpenoides fenólicos com forte atividade antimicrobiana. O OE possui cerca de 60 % de timol ou uma mistura de timol e carvacrol, o teor pode variar de acordo com a localização, temperatura e fatores ambientais.

O OE de alecrim-pimenta é composto majoritariamente, por timol e carvacrol, apresentando atividade antimicrobiana, fungicida, anti-helmítica, antisséptica, anti-inflamatória, antioxidante, com efeito larvívica e gastroprotetor (ALVARENGA, 2009; MENDES *et al.*, 2010; CAVALCANTI *et al.*, 2010; DAMASCENO *et al.*, 2011, MARCO *et al.*, 2012). Os extratos e OEs obtidos a partir de *Lippia* sp. tem sido amplamente estudados, devido ao potencial dos princípios bioativos (SOARES; TAVARES *et al.*, 2013).

Em estudo realizado por Souza *et al.* (2015) o OE de alecrim pimenta apresentou efeito frente a enterobactérias isoladas de aves na concentração de 40 µL/mL, indicando o potencial de uso do OE como produto alternativo aos antimicrobianos em rações para aves. Andrade *et al.* (2014) avaliaram o efeito do OE de *L. origanoides* frente à *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e observaram que, na concentração de 120 µl/mL, o OE apresentou efeito inibitório sobre todos os microrganismos.

3.4.2 Alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.)

As espécies do gênero *Ocimum* são conhecidas como manjericões e alfavacas (BRITO; PEREIRA; AMARAL, 2006). As plantas são encontradas como ervas e arbustos anuais e perenes, nativas de regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América do Sul (PATON, 1992). A espécie *Ocimum gratissimum* L. pertence ao gênero *Ocimum* e a família *Lamiaceae* (Labiatae), que compreende cerca de trinta espécies (LORENZI; MATOS, 2008). Apresenta-se como subarbusto ramificado com inflorescências terminais (BLANK *et al.*, 2004).

Ocimum gratissimum L. popularmente conhecido como alfavacão, alfavaca ou alfavaca-cravo, possui aroma forte e agradável (LORENZI; MATOS, 2002) e é utilizada na culinária de diversos países em saladas, sopas, pastas e como condimento (NWEZE; EZE, 2009). Essa espécie apresenta propriedades medicinais importantes e é amplamente utilizada na medicina popular brasileira como diurético, para tratamento de doenças gastrointestinais, reumatismo e paralisia (EPHRAIM; JACKS; SODIPO, 2001).

Suas folhas são usadas na medicina popular contra infecção bacteriana de organismos de alta patogenicidade. (UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006, MATASYO *et al.* 2007, MARTINS *et al.* 2008). Algumas propriedades biológicas são comprovadas cientificamente, dentre elas destacam-se a antinociceptiva, antibacteriana e antifúngica (RABELO *et al.*, 2003; LEMOS *et al.*, 2005).

O grande interesse em *O. gratissimum* se deve aos constituintes de seu OE, presente em tricomas glandulares superficiais (GANG *et al.*, 2001), os principais componentes podem ser eugenol, metil-eugenol, linalol, 1,8- cineol e α -terpineol, entre outros, que variam em função das condições de crescimento, desenvolvimento e quimiotipo da planta (SILVA *et al.*, 2005).

Testes em extratos metanólico e aquoso das folhas de *O. gratissimum* indicam presença de alcaloides, taninos, esteroides, terpenoides, flavonoides, glicosídeos cardiotônicos e saponinas (AKAH, JOHN-AFRICA, NWORU, 2007; AKINMOLADUN *et al.*, 2007, BRAGA *et al.*, 2007).

O estudo do OE obtido das folhas ou partes aéreas de *O. gratissimum* por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas (CG-EM) indica a presença de dois grandes grupos, um rico em timol e outro rico em eugenol (TCHOUMBOUGNANG *et al.*, 2006). No entanto, reconhece-se a presença de outros quimiotipos como o cinamato de etila e o geraniol (VIEIRA *et al.*, 2001; DUBEY *et al.*, 2000).

Estudos comprovam ação do OE de *Ocimum gratissimum* L, presente em inflorescências, flores e sementes (FRANCO *et al.*, 2007, SOUZA *et al.*, 2006). O OE apresenta ação inibitória frente a microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp e *Pseudomonas aeruginosa* (UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006, MATASYOH *et al.*, 2007).

3.4.3 Orégano (*Origanum vulgare* L.)

Origanum vulgare L., popularmente, conhecido como orégano, é uma planta herbácea da família Lamiaceae com origem na região do Mediterrâneo, distribuído no norte da África (CRISHTI; KALOO; SULTAN, 2013) e cultivado nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (LORENZI; MATOS, 2008). Apresenta-se como subarbusto ou erva perene e possui em geral 2-3 cm de altura, no entanto, podem ser encontradas plantas com até 39 cm (MEYERS, 2005).

Os componentes químicos presentes no OE de orégano são o timol, sabineno, terpineol, cariofileno, carvacrol dentre outros (CORRÊA *et al.*, 2010). De acordo com Burt (2007) o princípio ativo do OE de orégano é o carvacrol, no entanto, também são encontrados timol, borneol, cineol, terpineol e terpineno (LORENZI; MATOS, 2008). O orégano é amplamente aplicado na indústria de alimentos e farmacêutica em razão de suas propriedades organolépticas e terapêuticas (SOUZA e STANDFORD, 2005).

Apresenta atividade antimicrobiana e antioxidante relatada em grande número de estudos (YANISHLIEVA, 2006; KALEMBA & KUNICKA, 2003; ADER *et al.*, 200) devido a presença de carvacrol, flavonoides e terpenos (ARCILA-LOZANO *et al.*, 2004). O OE de

orégano tem sido aplicado como composto antimicrobiano na conservação de alimentos (CHUN *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2007) com resultados significativos na inibição do crescimento de fungos e bactérias (BAYDAR *et al.*, 2004; NOSTRO *et al.*, 2004).

Serio *et al.* (2010) avaliaram a susceptibilidade de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ao OE de orégano e verificaram que, após 30 min de contato, com concentrações de 0 a 1,25%, o OE na concentração de 0,25% reduziu a viabilidade celular em 1,70 log UFC/mL, os autores obtiveram aumento gradual do efeito até a concentração de 1,25% que apresentou redução de 5 log UFC/mL.

Em estudo realizado por Du *et al.* (2009), os OE de pimenta-da-jamaica, alho e orégano foram incorporados em filmes comestíveis frente à *E. coli* O157:H7, *S. enterica* e *L. monocytogenes*, os resultados encontrados demonstraram que o OE de orégano foi o mais efetivo dentre os óleos estudados.

3.5 Avaliação do efeito antimicrobiano dos óleos essenciais

O interesse na utilização de produtos de origem natural requer uma maior obtenção de dados acerca dos OEs a fim de proporcionar o uso seguro dos produtos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Estudos têm apontado diversas propriedades terapêuticas dos óleos, dentre elas destacam-se: antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relaxante, antisséptica e anti-inflamatória (LIMA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2005).

Reconhece-se a atividade antimicrobiana dos OEs, no entanto, o mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido. Dentre os grupos químicos com ação antibacteriana reconhecida estão os compostos fenólicos, quinonas, taninos, cumarinas, alcaloides e flavonas e seus compostos (HOLLEY e PATEL, 2005).

As características específicas dos OEs devem ser observadas previamente. A maior parte dos OEs são de natureza hidrófila, voláteis, insolúveis em água e viscosos. Observa-se também a formação de suspensão turva, o que dificulta a determinação visual do efeito antimicrobiano (HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003).

No estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* são encontradas diversas metodologias para avaliação do efeito dos OEs, o que dificulta a comparação entre os resultados encontrados (HAMMER *et al.*, 1999). Comumente, para a determinação da atividade antimicrobiana, são utilizados os métodos de difusão em disco, difusão em cavidade feita em ágar, diluição em ágar e em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM (NOSTRO *et al.*, 2004; CIMANGA *et al.*, 2002). A diferença encontrada no resultado obtido a partir da utilização de métodos distintos pode ser justificada por diferentes condições de crescimento microbiano, tempo de exposição do microrganismo ao óleo, solubilidade do óleo e a quantidade empregada de emulsificador (OPALCHENOVA; OBRESHKOVA, 2003; HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003).

Para a utilização da técnica de difusão em ágar deve-se considerar a distribuição irregular dos componentes lipófilos dos óleos, o que resulta em concentrações desiguais na

região do ágar provocando a formação de regiões com atividade antimicrobiana diferente (SETZER *et al.*, 2004; SOKMEN *et al.*, 2004).

Os testes para avaliação do efeito antimicrobiano de antibióticos são padronizados pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – NCCLS, para a determinação da atividade antimicrobiana dos OEs são necessárias adaptações na metodologia proposta (DUARTE *et al.*, 2005; NOSTRO *et al.*, 2004).

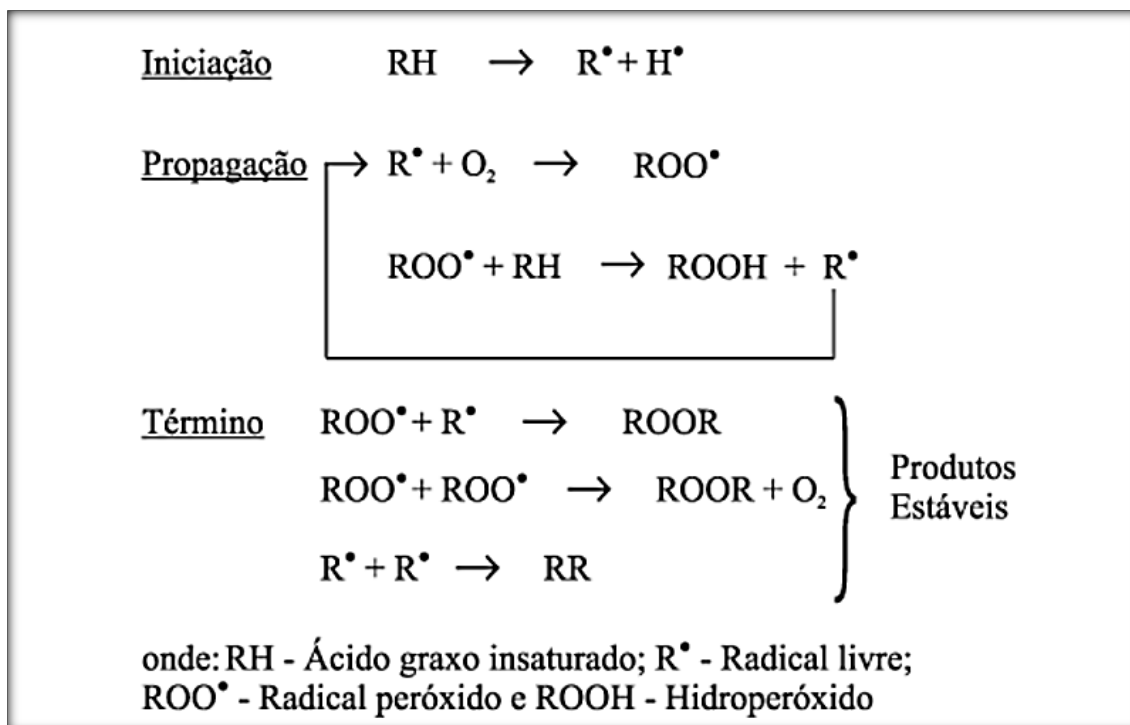
3.6 Antioxidantes naturais e sintéticos

Alimentos ricos em lipídeos são deteriorados por meio de diversas reações que ocorrem durante o aquecimento ou no período de armazenamento e estocagem dos produtos (SOARES *et al.*, 2009).

O principal processo de deterioração são as reações de oxidação que provocam diminuição do valor nutricional e da qualidade sensorial, consequência da perda de ácidos graxos essenciais, vitaminas e do aparecimento de compostos tóxicos provocando a deterioração de *flavor*, sabor e cor dos alimentos (FENNEMA *et al.*, 2010; MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2007).

As reações de oxidação lipídica são determinantes para a qualidade da carne e dos produtos cárneos, pois, afetam diretamente suas características sensoriais. O mecanismo de autooxidação se divide em três etapas: iniciação, propagação e término (Figura 1).

Figura 1 – Esquema geral do mecanismo de autooxidação



Fonte: Adaptado de RAMALHO; JORGE (2006)

As reações de iniciação formam os primeiros radicais livres (R^*) de ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo. Na fase de propagação, os radicais livres compostos susceptíveis ao ataque do O_2 atmosférico, são convertidos em outros radicais (ROO^*) que atraem hidrogênios a partir de outra molécula lipídica produzindo produtos primários de oxidação, os peróxidos e hidroperóxidos. A reação é finalizada quando dois radicais livres combinam-se resultando na formação de produtos estáveis (VENKATARAMAN; SCHAFER; BUETTNER, 2004; RAMALHO; JORGE, 2006). Esse mecanismo de oxidação pode ocorrer em tecidos animais e vegetais, e em produtos ricos em óleos e gorduras (DEL RÊ; JORGE, 2012).

Os antioxidantes, quando presentes em baixas concentrações, podem atrasar ou inibir a oxidação dos lipídios, proteínas e nucleotídeos através da suspensão das reações em cadeias de oxidação (ROY *et al.*, 2015). Radicais livres são espécies químicas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, são independentes e altamente reativos, provocam danos a outras moléculas através da extração de elétrons visando atingir sua estabilidade (SHARIF ALI *et al.*, 2008).

Os antioxidantes sintéticos são utilizados pela indústria alimentícia com o objetivo de prolongar a vida de prateleira dos produtos industrializados, sendo o BHT (butil hidroxitolueno) e o BHA (butil hidroxianisol) antioxidantes comumente utilizados na indústria de alimentos (MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2007). No entanto, devido à preocupação com os danos provocados à saúde, observa-se demanda crescente por produtos que utilizem antioxidantes naturais (SANCHEZ, 2010) que se apresentam como substâncias bioativas extraídas de vegetais e plantas e apresentam baixa toxicidade, quando comparados aos antioxidantes sintéticos (SADEGHI *et al.*, 2015).

Teixiera *et al.* (2013) identificaram forte e moderada atividade antioxidante para os OE de orégano e cravo-da-india, semelhantes às observadas em antioxidantes sintéticos como o BHT.

Ainda que os OEs representem uma alternativa viável para a preservação da qualidade microbiol dos alimentos faz-se necessária a determinação de suas propriedades microbiológica e antioxidante por meio de variáveis como Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração efetiva (CE_{50}) desses metabólitos, estabelecendo correlação entre esses potenciais e a composição química dos mesmos (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

3.7 Aplicação de óleo essencial em produtos cárneos

A indústria de alimentos está em busca de métodos de conservação que utilizem novas técnicas de preservação para atender consumidores que demandam por produtos saborosos, nutritivos e naturais (BAJPAI *et al.*, 2012; VIUDA MARTOS *et al.*, 2010). O risco de doenças e a toxicidade de aditivos químicos são fatores que impulsionam as pesquisas que buscam o desenvolvimento de aditivos naturais (DEVLIEGHERE *et al.* 2004).

Segundo Gutierrez *et al.* (2008), para o controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes presentes em alimentos através do uso de OE faz se necessário o estudo criterioso acerca do espectro de ação do OE frente ao microrganismo, bem como dos efeitos da aplicação sobre a composição do alimento.

Para aplicação de OE em alimentos é necessário avaliar o impacto sensorial. Elevadas concentrações de OE podem ocasionar sabor e aroma residuais indesejáveis pelo consumidor (GUTIERREZ *et al.*, 2008; NAZER *et al.*, 2005). A adição de OE em produtos cárneos consiste em uma alternativa viável, pois as ervas e especiarias são comumente utilizadas para conferir sabor a esse produto.

Em estudo realizado por Skandamis e Nichas (2001), o sabor de filés de carne acrescidos de 1% de OE de orégano foi afetado positivamente durante o período de estocagem. Chouliara *et al.* (2007) verificaram aumento de 3 dias na vida de prateleira em peito de frango acrescido de OE de orégano na concentração de 0,1 %.

Liu *et al* (2009) avaliaram o efeito da aplicação do OE de *Rosmarinus officinalis* L. em linguiça frescal e constataram menor nível de rancificação e menores contagens de microrganismos aeróbios mesófilos no produto. O efeito do OE de manjerona aplicado em linguiça foi avaliado por Bussata *et al.* (2008), os autores observaram efeito antimicrobiano frente à *Escherichia coli* e redução na contagem total de microrganismos.

REFERÊNCIAS

- ADER, P. *et al.* Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 7, p.1056-1067, 2000.
- ADAMI, F. S. *et al.* Análise microbiológica e de nitrito e nitrato em linguiça. **Scientia Plena**, v. 11, n. 5, p. 1–7, 2015.
- AKAH, P. A.; JOHN-AFRICA, L.; NWORU, C. S. Gastro-protective properties of the leaf extracts of *Ocimum gratissimum* L. against experimental ulcers in rat. **International Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 6, p. 461-467, 2007.
- AKINMOLADUN, A. C. *et al.* Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimum*. **Scientific Research and Essay**, v. 2, n. 5, p. 163-166, 2007.
- ALBERNAZ, L. C. *et al.* Investigation of plants extracts in tradicional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116-121, 2010.
- ALBERTI, J; NAVA, A. Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas a granel por supermercados e produzidas artesanalmente no município de Xaxim, SC. **Unoesc & Ciência**, v. 5, n. 1, p. 41-48, 2014.
- ALVARENGA A. L. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.
- ALVARENGA, I. C. A. *et al.* Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.): uma espécie aromática e medicinal em domesticação. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 1, n. 1, p. 9-25, 2009.
- ANDRADE ,V.A. *et al.* Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 1153-1161, 2014.

- ANDRADE, M. A. *et al.* Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ARCILA-LOZANO, C.C. *et al.* El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 54, n. 1, p.100- 11, 2004.
- ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.
- BACUS, J. N. *et al.* Uncured, Natural, and Organic Processed Meat Products (Natural Curing). **Technical ingredient solutions**, LLC, 2010.
- BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 722-734, 2012.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, L. *et al.* A. **As tendências da alimentação**. In: Brasil Foods Trends 2020. FIESP. Instituto de Tecnologia de Alimentos. São Paulo: Gráfica Ideal, 2010.
- BAÚ, T. R. *et al.* Avaliação da qualidade química e microbiológica de salsichas tipo Viena. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 207-219, 2012.
- BAYDAR, H. *et al.* Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 3, p. 169-172, 2004.
- BEZERRA, M.V.P. *et al.* Avaliação microbiológica e físico-química de linguiça toscana no Município de Mossoró, RN. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 2, p. 297-300, 2012.
- BIRZELE, B., DJORDJEVIC, S., KRAMER, J. A. Study of the role of different nitrite concentrations on human pathogenic bacteria in fresh spreadable ham and onion sausage. **Food Control**, v. 16, n. 2, p. 695-699, 2005.
- BLANK, A. F. *et al.* Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 113-116, 2004.
- BRAGA, F. G. *et al.* Antileishmanial and antifungal activity of plants used in tradicional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual Técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico do gênero *Salmonella*/Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- _____. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução normativa n.4, de 31 de março de 2000. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de linguiça e de salsicha. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 05 abr. 2000, Seção 1, p. 6.
- _____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n.12, de 10 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jan. de 2001. Seção 1, p. 45-53.
- BRITO, A. C., PEREIRA, D. A., AMARAL, C. L. F. Influência da Temperatura na Germinação de Sementes de *Ocimum canum* Sims. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 4, p. 397-401, 2006.
- BURT, S. A. Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in foods – A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

- BUSSATA, C. *et al.* Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 207-11, 2008.
- CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005.
- CASTRO, C. E. *et al.* Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 293-297, 2011.
- CAVALCANTI, S. C. H. *et al.* Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two spotted spidermite (*Tetranychus urticae* Koch). **Biores Technology**, v. 101, n. 2, p. 829-832, 2010.
- CHOULIARA, E. *et al.* Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4°C. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 607-617, 2007.
- CHUN, S. S. *et al.* Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.
- CIMANGA, K. *et al.* 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, n. 2, p. 213-220, 2002.
- CORRÊA, R. M. *et al.* Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 80-89, 2010.
- CORTEZ, L. L. *et al.* Coliformes fecais, estafilococos coagulase positiva (ECP), *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em linguiça frescal. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 215-220, 2004.
- COSTA J. G. M. *et al.* Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304-309. 2005.
- COSTA, J. P. R. *et al.* Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e o extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. **Biotemas**, v. 24, n. 4, p. 1-6, 2011.
- COSTA, S. M. O. *et al.* Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 66-67, 2002.
- CRISHTI, S.; KALOO, Z. A.; SULTAN, P. Medicinal importance of genus *Origanum*: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 5, n. 10, p. 170-177, 2013.
- DAGUER, H. *et al.* Qualidade de produtos cárneos fabricados sob Inspeção Federal no Estado do Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 359-364, 2011.
- DAMASCENO, E. I. T. *et al.* Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis* Schaner Verbenaceae, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 78-85, 2011.
- DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.
- DEMEYER, D.; HONIKEL, K.; DE SMET, S. A challenge for the meat processing industry. **Meat Science**, v. 80, n. 4, p. 953-959, 2008.

- DESMARCHELIER, P. *et al.* Managing safety and quality through red meat chain. **Meat Science**, v. 77, n. 1, p. 28-35, 2007.
- DIAS, P. A. *et al.* Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescos comercializados no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Instituto de Biologia**, v. 75, n. 3, p. 359-363, 2008.
- DU, W. X *et al.* Antibacterial effects of allspice, garlic, and oregano essential oils in tomato films determined by overlay and vapor-phase methods. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 7, p. 390-397, 2009.
- DUARTE, M. C. T. *et al.* Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2. p. 305-311, 2005.
- DUBEY, N. K. *et al.* Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). **Fitoterapia**, n. 71, n. 5, p. 567-569, 2000.
- EBRAHIMABADI, A. H. *et al.* Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 452-458, 2010.
- EPHRAIM, K. D., JACKS, T. W., SODIPO, O. A. Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leaf extract on some organs of rabbit. **African Journal Biomedical Research**, v. 6, n. 1, p. 21-25, 2003.
- FENNEMA, O. R. *et al.* **Química de alimentos de Fennema**. 4 ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.
- FERREIRA, H. M. F. *et al.* Avaliação dos níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na cidade de Lavras- MG. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 218-27, 2013.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook- *Salmonella* spp, 2008.
- FRANCO, A. L. P. *et al.* Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (Alfazema), *Ocimum gratissimum* L. (Alfavaca-cravo) e *Curcuma longa* L. (Açafrão). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 208-220, 2007.
- FRANCO, B. D. G. M. Viabilidade de *Escherichia coli* patogênica em linguiça frescal suína. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 3, p. 319-325, 2010.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, 181 p.
- GANG, D. R. *et al.*, An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. **Plant Physiology**, v. 125, n. 2, p. 539-555, 2001.
- GUERREIRO, R. S. *et al.*, Avaliação do teor de nitrito e nitrato em alimentos cárneos comercializados em Salvador. **Revista Internacional de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 5, n. 1, p. 77-91, 2012.
- GUTIERREZ, J. *et al.*, Efficacy of plant essential oil against food-borne pathogens and spoilage bacteria associated with ready to eat vegetables: antimicrobial and sensory screening. **Journal of Food Protection**. v. 71, n. 9, p. 1846-1854, 2008.
- HAMMER, K. A. *et al.*, Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.
- 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, n. 4, p. 273-292, 2005.

- HONIKEL, K. O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, v. 78, n. 1, p. 68-76, 2008.
- HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal Essential Oil Research**, v.15, n. 6, p. 428-433, 2003.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1-24, 2012.
- JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.
- JESUS JUNIOR, C.; RODRIGUES, L. S.; MORAES, V. E. G. Ovinocaprinocultura de corte – a convivência dos extremos. Agroindústria. **BNDES Setorial**, n. 31, p. 281-320, 2010.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. **Diagnostico Microbiologico: texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, 192 p.
- LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 1, p. 13-39, 2012.
- LE LOIR Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.
- LE MOS, A. L. S. C.; YAMADA, E. A.; HAGUIWARA, M. M. H. **Processamento de Embutidos Carneos**. Campinas: ITAL, Centro de Tecnologia de Carnes, 2008. 213 p.
- LE MOS, J. *et al.*, Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 55-58, 2005.
- LEVINSON, W. E.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. Porto Alegre: ARTMED, 2005, 632 P.
- LIMA, I. O. *et al.*, Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.
- LIU, D. *et al.* Effect of various levels of rosemary or Chinese mahogany on the quality of fresh chicken sausage during refrigerated storage. **Food Chemistry**. v. 117, n. 1 p. 106-113, 2009.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2 ed.. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- MARCO, C. A. *et al.* Chemical composition and allelopathyc of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. **Chilean Journal Agriculture Research**, v. 72, n. 1, p. 157-160, 2012.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em produtos alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.
- MARTINS, D. I.; MIDIO, A. F. **Toxicologia dos alimentos**. 2 Ed. São Paulo: Varela, 2000.
- MARTINS, J. R.; ALVARENGA, A. A. Leaf Anatomy of alfavaca-cravo plants cultivated under colored nets. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 82-87, 2008.
- MATASYOH, L. G. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 760-765, 2007.

- MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. Fortaleza: UFC. 2002. 267 p.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Fortaleza: UFC. 2000. 344 p.
- MENDES, S. S. *et al.* Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 4, p. 391-397, 2010.
- MERLINNI, L. S. *et al.* Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal produzidas artesanalmente na região noroeste do Paraná. **Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 5, p. 344-352, 2012.
- MEYERS, M. Oregano and marjoram: an Herb Society of America guide to the genus *Origanum*. **The Herb Society of America**, Kirtland, USA p. 8-9, 2005.
- MORAIS, S. M. *et al.* Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 315-320, 2009.
- MORAIS, S. R. *et al.* Chemical constituents of essential oil from *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) Leaves Cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 857-860, 2012.
- NASCIMENTO T. S. *et al.* Metemoglobinemia: do diagnóstico ao tratamento. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, n. 6, p. 651-664, 2008.
- NASCIMENTO, R. S. *et al.* Linguiças frescas elaboradas com carne de avestruz: característica físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 42, n. 1, p.184-188, 2012.
- NAZER, A. *et al.* Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typihimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**. v. 22, n. 5, p. 391-398, 2005.
- NIELSEN. Análises de mercado. In: Parmigiani, P. O avanço dos industrializados suínos. **Revista Nacional da Carne**, v. 34, n. 398, p. 88-93, 2010.
- NOSTRO, A. *et al.* Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 1, p. 191-195, 2004.
- NWEZE, E. I.; EZE, E. E. Justification for the use of *Ocimum gratissimum* L in herbal medicine and its interaction with disc antibiotics. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 9, n. 1, p. 37-43, 2009.
- NYCHAS, G. J. E.; *et al.* Meat spoilage during distribution. **Meat Science**., v. 78, n. 1-2, p. 77-89, 2008.
- OLIVEIRA, C. E. V. *et al.*, Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 1, p. 308-311, 2010.
- OLIVEIRA, F. P. *et al.* 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, M. J.; ARAÚJO, W. M. C.; BORGIO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em linguiças do tipo frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 736-42, 2005.
- OPALCHENOVA, G.; OBRESHKOVA, D. Comparative studies on the activity of basil - an essential oil from *Ocimum basilicum* L. - against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. **Journal of Microbiology Methods**, v. 54, n. 1, p. 105-110, 2003.

- OUSSALAH, M. *et al.* 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, n. 5, p. 414-420, 2007.
- PATON, A. A synopsis of *Ocimum* L. (Labiatae) in Africa. **Kew Bulletin**, v. 47, n. 3, p. 403-435, 1992.
- PETENUCCI, M. E. *et al.* Nitratos e nitritos na conservação de carnes. **Revista Nacional da Carne**, v. 333, n. 1, p.1-2, 2004.
- QUEIROZ, M. R. A. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia organoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 737- 743, 2014.
- RABELO, M. *et al.* Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 4, p. 521-524, 2003.
- RAHMAN, A.; KANG, S. C.; In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 670 - 675, 2009.
- RALL, V. L. M. *et al.* Pesquisa de Salmonella e das condições sanitárias em frangos e linguiças comercializadas na cidade de Botucatu, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 167-174, 2009.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755- 760, 2006.
- RITTER, R. *et al.* Microbiologia contaminante e patogênica de linguiça (salame) colonial, analisada em quatro períodos distintos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 113, p. 60-66, 2003.
- RODRIGUES, M. R. A. Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO₂. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 3042-47, 2004.
- RODRIGUES, W. *et al.*, Determinação espectrofotométrica do íon nitrito em linguiça tipo frescal. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 2, n. 3, p. 06- 11, 2012.
- ROSA, C. S. *et al.* Avaliação do efeito de extrato de farinha de alfarroba (*Ceratonia siliqua* L.) na estabilidade oxidativa e cor de hambúrgueres congelados. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 34, n. 5, p. 93-98, 2013.
- ROY, P. *et al.* Evaluation of antioxidant, antibacterial, and antidiabetic potential of two traditional medicinal plants of India: *Swertia cordata* and *Swertia chirayita*. **Pharmacognosy Research**. v. 7, n. 1, p. 57-62, 2015.
- SADEGHI, Z. *et al.* Antioxidant activity and total phenolic content of *Boerhavia elegans* (choisy) grown in Baluchestan, Iran. **Avicenna Journal of Phytomedicine**. v. 5, n. 1, p. 1-9, 2015.
- SALVATORI, R. U.; BESSA, M. C.; CARDOSO, M. R. I. Qualidade sanitária de embutidos coletados no Mercado público central de Porto Alegre, **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 771-773, 2003.
- SANCHEZ, A. A. *et al.* Antimicrobial and antioxidante activities of Mexican orégano essential oil (*Lippia graveolens* H. B. K.) with diferente composition when microrncapsulated in Bcyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 585-90, 2010.
- SANTURIO, J. M. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils from orégano, thyme and cinnamon against *Salmonella* entérica sorovars from avian source. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-08, 2007.

- SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.
- SEFIDKON, F. *et al.* The effect of distillation methods an stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1054-1058, 2007.
- SERIO, A. *et al.* Electronic paramagnetic resonance investigation of the activity of *Origanum vulgare* L. essential oil on the *Listeria monocytogenes* membrane. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 149-157, 2010.
- SETZER, W. N. Antimicrobial activity of *Artemisia douglasiana* leaf essential oil. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 192-200, 2004.
- SHARIF ALI, S. *et al.* Indian medicinal herbs as sources of antioxidants-review. **Food Research International**, v. 41, n. 1, p 1-5, 2008.
- SILVA, A. P. M. Avaliação microbiológica da linguiça artesanal bubalina produzida na Ilha do Marajó, Pará, Brasil, **Scientia Plena**, v. 12, n. 6, p. 1-6, 2016.
- SILVA, F. *et al.*, Basil conservation affected by cropping season, harvest time and storage period. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 4, p. 323-328, 2005.
- SILVA, V. A. *et al.* Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 452-455, 2010.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre:UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.
- SINDELAR, J. J. *et al.*, Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 6, p. 388-395, 2007.
- SINDELAR, J. J.; MILKOWSKI, A. L. Sodium Nitrite in Procesed Meat and Poultry Meats: A Review of Curing and Examining the Risk/Benefit of Its Use. **American Meat Science Association White Paper Series**, v. 1, n. 3, p. 1-14, 2011.
- SKANDAMIS, P. N., NYCHAS, G. J. E. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplants salad at various temperatures, pHs, and orégano essential oil concentrations, **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1646-53, 2000.
- SOARES, A. L. *et al.* Lipid oxidation and fatty acid profile related to broiler breast meat color abnormalities. **Brazilian Archvies of Biology and Technology**. v. 52, n. 6, p. 1513-1518, 2009.
- SOARES, B. V.; TAVARES, D. M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.
- SOKMEN, A. *et al.* The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, v. 15, n. 8, p. 627-634, 2004.
- SOUZA, D. S. *et al.* Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* e *Lippia rotundifolia* frente a enterobactérias isoladas de aves, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veerinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 940-944, 2015.

- SOUZA, E. L. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Brazilian Journal of Food Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 387-393, 2009.
- SOUZA, E. L. *et al.* Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.
- SOUZA, E.L.; STANFORD, T. L. M. Orégano (*Origanum vulgare* L. – Lamiace): uma especiaria com potencial fonte de compostos microbianos. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 40-45, 2005.
- SOUZA, M. *et al.* Qualidade higiênico sanitária e prevalência de sorovare *Salmonella* em linguças frescas produzidas artesanalmente e inspecionadas, comercializadas no oeste do Paraná, Brasil. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 81, n. 2, p. 107-112, 2014.
- SOUZA, M. F. *et al.* Influência do sombreamento na produção de fitomassa e óleo essencial em alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 108-110, 2007.
- SPRICIGIO, D. A. *et al.* Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguça frescal suína, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 779-785.
- STIEVEN, A.; SOUZA, C. F. V. Variação das concentrações de nitrato e nitrito em linguça frescal, adicionadas de diferentes concentrações de eritorbato de sódio. **Revista Higiene Alimentar**, v. 26, n. 208-209, p. 180-186, 2012.
- TALON, R. *et al.* Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. **Meat Science**, v. 77, n. 4, p. 570-579, 2007.
- TCHOUMBOUGNANG, F. *et al.* Variability in the chemical compositions of the essential oils of five *Ocimum* species from tropical African area. **Journal Essential Oil Research**, v. 18, n. 2, p. 194-199, 2006.
- TEIXEIRA, B. *et al.* Chemical composition and antibacterial and antioxidante properties of comercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 587-595, 2013.
- TERBLANCHÉ F. C; KORNELIUS G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) - A literature review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 6, p. 471-485, 1996.
- TERRA, A. B.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. **Particularidades na fabricação de salame**. São Paulo: Livraria Varela, 2004.
- TRABULSI, L.R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia: Staphylococcus aureus**. São Paulo: Atheneu, 5 ed. 2005. 760p.
- UEDA-NAKAMURA, T. *et al.* Antileishmanial activity of Eugeniol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99-105, 2006.
- VENKATARAMAN, S.; SCHAFER, R. Q.; BUETTNER, G. R. Detection of lipid radicals using EPR. **Antioxid Redox Signaling**. v. 6, n. 3, p. 631-638, 2004.
- VIEIRA, R. F. *et al.* Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 3, p. 287-304, 2001.
- VIUDA-MARTOS, M. *et al.* Effect of Orange dietary fibre, orégano essential oil and packaging conditions on shelf-life of bologna sausages. **Food Control**. v. 21, n. 4, p. 436-443, 2010.

WALSH, S. E. *et al.* Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 1, p. 240-247, 2003.

YANISHLIEVA, N. V. *et al.* Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 9, p. 776-93, 2006.

4 ARTIGOS

4.1 Artigo 1 – Atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* L., *Lippia organoides* Kunth. e *Origanum vulgare* L.

Este artigo foi elaborado conforme as normas da Revista Ciência Rural

1
2 **Atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de *Ocimum***

3 ***gratissimum* L., *Lippia origanoides* Kunth. e *Origanum vulgare* L.**

4 **Antioxidant and antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum gratissimum* L.,**

5 ***Lippia origanoides* Kunth. e *Origanum vulgare* L.**

6 **Renatta Soares Souza^{1*} Francielly Soares Oliveira¹ Roberta Torres Careli¹**

7 **Patrícia Alves Vasconcelos¹ Francine Souza Alves de Fonseca¹ Ernane Ronie**

8 **Martins¹**

9
10 ¹ Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Montes Claros. Av. Universitária,
11 1000, Bairro Universitário, Montes Claros - MG. 39404-547. E-mail:
12 renatta_3@hotmail.com. Autor correspondência.
13

14 **RESUMO**

15 Objetivou-se avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e a composição
16 química dos óleos essenciais (OEs) de *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca), *Lippia*
17 *origanoides* Kunth. (alecrim-pimenta) e *Origanum vulgare* L. (orégano) frente a
18 estirpes de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella Choleraesuis* ATCC
19 10708 e *Escherichia coli* ATCC 8739. A composição química dos OEs foi determinada
20 por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM),
21 identificando como compostos majoritários para o OE de alecrim-pimenta, o carvacrol,
22 para o OE de orégano, o 4-terpineol, para o OE de alfavaca, o o-cimeno. Para as
23 análises antioxidantes, realizou-se o ensaio com radical DPPH para determinação da
24 CE₅₀ (concentração eficiente 50%) e índice de atividade antioxidante (IAA). O óleo
25 essencial (OE) de alfavaca apresentou a melhor atividade antioxidante dentre os OEs
26 analisados com CE₅₀ de 3,25 µg mL⁻¹ e IAA=12,3. Nas análises antimicrobianas foram
27 determinadas a CIM (Concentração Inibitória Mínima) e a CBM (Concentração

1 Bactericida Mínima) pela técnica de macrodiluição em caldo. O OE de orégano
2 apresentou CIM e CBM de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as estirpes de *S. aureus* e *E. coli* e CIM de
3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e CBM de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *Salmonella*. O OE de alecrim-pimenta apresentou
4 valores de CIM de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as estirpes de *S. aureus* e *E. coli* e de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$
5 para *Salmonella*, os valores de CBM foram de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* e *Salmonella*
6 e de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. coli*. Não foram encontrados valores de CIM e CBM para o OE
7 de alfavaca. Os resultados observados demonstram alto potencial para a aplicação de
8 óleos essenciais como agentes antioxidantes e antimicrobianos em produtos
9 alimentícios.

10 **Palavras-chave:** alecrim-pimenta, alfavaca, orégano, DPPH, Concentração Inibitória
11 Mínima, Concentração Bactericida Mínima.

12

13 **ABSTRACT**

14 The aim of the study was to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity
15 of essential oils (EO) of *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca), *Lippia origanoides* Kunth.
16 (alecrim-pimenta) and *Origanum vulgare* L. (oregano) against strains of *Staphylococcus*
17 *aureus* ATCC 25923, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708 e *Escherichia coli* ATCC
18 8739. The chemical composition of OE was determined by gas chromatography coupled
19 to mass spectrometry (GC-MS), identifying as marjorite compounds: carvacrol for OE
20 of alecrim-pimenta, 4-terpineol for OE of oregano and o-cymene for alfavaca. For the
21 antioxidant analysis, was made through the DPPH assay and determination of EC_{50}
22 (efficient concentration 50%) and antioxidant activity (AAI) The oil essential (EO) of
23 alfavaca presented the best antioxidant activity among de EO analyzed with EC_{50} of
24 $3,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $AAI= 12,3$. The antimicrobial analysis, it were determinated by the
25 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration

1 (MBC) by broth macrodilution method. The EO of oregano showed MIC and MBC of 5
2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to the strains of *S. aureus* and *E. coli* and MIC of the $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ and MBC of
3 the $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *Salmonella*. The EO of alecrim-pimenta showed values of MIC of
4 the $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the strains of *S. aureus* and *E. coli* and $40 \mu\text{g/mL}$ for *Salmonella*,
5 the values of MBC were $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *S. aureus* and *Salmonella* and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *E.*
6 *coli*. There were no MIC and MBC values for the EO of basil. The results showed that
7 there is a high potential of essential oil as antioxidant and antimicrobial for replace
8 chemicals and synthetic additives in food products.

9 **Key words:** alecrim-pimenta, basil, oregano, Minimum Inhibitory Concentration,
10 Minimum Bactericidal Concentration.

11

12 **INTRODUÇÃO**

13 Espécies vegetais de uso medicinal são utilizadas na forma de condimentos com
14 o intuito de realçar o sabor dos alimentos, no entanto, além de conferir características
15 sensoriais, as plantas também apresentam propriedades nutricionais, antioxidantes e
16 antimicrobianas (MILITELLO et al., 2011).

17 Os antioxidantes sintéticos são utilizados pela indústria alimentícia com o
18 objetivo de prolongar a vida de prateleira dos produtos. Contudo, devido à crescente
19 preocupação com os danos provocados à saúde, observa-se demanda crescente por
20 produtos que utilizem antioxidantes naturais, principalmente substâncias bioativas
21 extraídas de plantas. Tais substâncias têm baixa toxicidade quando comparados aos
22 antioxidantes sintéticos (MARIUTTI et al., 2008; SADEGHI et al., 2015). Assim,
23 devido à resistência bacteriana adquirida em função do uso indiscriminado de
24 antibióticos, os produtos de origem vegetal, na forma de extratos e óleos essenciais

1 (OEs), estão sendo considerados como alternativa eficiente devido à ação inibitória
2 sobre diversos microrganismos (GUIMARÃES et al., 2010).

3 *Ocimum gratissimum* L. popularmente conhecida como alfavaca (LORENZI,
4 MATOS, 2002) é largamente utilizada na medicina popular e possui atividade
5 antioxidante e antimicrobiana frente a fungos e bactérias (DAMBOLENA et al, 2010;
6 PRAKASH et al., 2011; PAULA-FREIRE et al, 2013).

7 O orégano, *Origanum vulgare* L., espécie exótica, tem o seu óleo essencial (OE)
8 aplicado como composto antimicrobiano na conservação de alimentos (CHUN et al.,
9 2005; SOUZA et al., 2007) com resultados significativos na inibição do crescimento de
10 fungos e bactérias (BAYDAR et al., 2004; NOSTRO et al., 2004).

11 O alecrim-pimenta (*Lippia origanoides* Kunth.), espécie aromática e medicinal
12 nativa do Brasil (FABRI et al., 2011) pode originar extratos e OE estudados pelo
13 potencial antimicrobiano (SOARES; TAVARES et al., 2013).

14 Ainda que os OEs representem alternativa para a preservação de alimentos, faz-
15 se necessário identificar suas propriedades antioxidantes e antibacterianas, para que seja
16 possível associar essas atividades à composição química dos mesmos (BAKALLI et al.,
17 2008; HYLDGAARD et al., 2012). O objetivo desse trabalho foi caracterizar
18 quimicamente e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos OEs de *Ocimum*
19 *gratissimum* L., *Origanum vulgare* L., *Lippia origanoides* Kunth., frente a estirpes de
20 *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e
21 *Escherichia coli* ATCC 8739.

22

23 MATERIAL E MÉTODOS

24 As folhas de alecrim-pimenta e alfavaca foram coletadas entre 9h00min e
25 10h00min da manhã (MELO et al. 2011) no período de janeiro a março de 2016, no

1 Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, na cidade de
2 Montes Claros/MG (coordenadas 16°40'51,5"S e 43°50'32,1"W, altitude de 640m). A
3 amostra de orégano desidratado foi adquirida comercialmente na cidade de Montes
4 Claros/MG da empresa Comercial Katyra LTDA. A extração do OE foi realizada no
5 Laboratório de Plantas Medicinais do ICA/UFMG pela técnica de hidrodestilação em
6 aparelho tipo *Clevenger*, para o OE de orégano e pela técnica de destilação a vapor em
7 equipamento (Linax D20) em escala piloto para os OEs de alecrim-pimenta e alfavaca.
8 Após a extração, a fração de OE foi pesada em balança analítica e armazenada em
9 frasco âmbar sob refrigeração ($-4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

10 ***Análise química do óleo essencial***

11 A análise da composição química dos OE foi realizada no laboratório de
12 Química Instrumental do ICA-UFMG utilizando cromatógrafo a gás, Agilent
13 Technologies (GC 7890A), acoplado a espectrômetro de massas (MS 5975C) dotado de
14 coluna capilar DB-5 MS (Agilent Technologies, fase estacionária 5% fenil e 95%
15 metilpolissiloxano, 30 m x 250 μm d.i. x 0,25 μm espessura do filme). O hélio
16 (99,9999% de pureza) foi utilizado como gás de arraste, (1mL min^{-1}) e as amostras
17 injetadas (1 μL) no modo split 1:5 com injetor mantido a 220 $^{\circ}\text{C}$. A rampa de
18 aquecimento da coluna iniciou a 60 $^{\circ}\text{C}$ com taxa de 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 240 $^{\circ}\text{C}$, em seguida,
19 com um gradiente de temperatura de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 270 $^{\circ}\text{C}$ mantendo constante por 7
20 min. A interface com o espectrômetro de massas foi mantida a 240 $^{\circ}\text{C}$ e o mesmo
21 operado por impacto de elétrons (70 eV), no modo *full scan*, monitorando uma faixa
22 de massa (40 a 550 m/z). O índice de retenção de todos os compostos foi calculado a
23 partir do tempo de retenção de uma mistura de *n*-alcanos (C8- C32, Sigma USA) 20
24 ppm, split 1:100. Os dados gerados foram analisados utilizando o software MSD
25 Chemstation juntamente com a biblioteca (*National Institute of Standards and*

1 *Technology*, NIST 2002). A abundância relativa (%) dos constituintes foi calculada a
2 partir da área de pico do cromatograma de íons totais (TIC) e organizada de acordo com
3 a ordem de eluição. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos
4 espectros de massas com os da biblioteca (NIST 2.0, 2009) e pelo índice de retenção
5 (IR) relativo, calculado segundo Van Den Dool and Kratz (1963), e comparado com
6 informações da literatura (ADAMS, 2012).

7

8 ***Atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH***

9

10 A atividade antioxidante dos OE foi avaliada por meio do sequestro do radical
11 1,1- difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (SOUZA et al., 2007; LOPES-LUTZ et al., 2008).
12 A solução de DPPH foi preparada em metanol (50 mL, 40 µg mL⁻¹) e posteriormente
13 mantida sob refrigeração ao abrigo da luz. Foram preparadas soluções de OE em
14 metanol em cinco concentrações (1, 5, 10, 20 e 40 µg mL⁻¹). Para a avaliação da
15 atividade antioxidante foi utilizada 1 mL da solução de DPPH (40 µg mL⁻¹) e 3 mL de
16 cada uma das soluções de óleo essencial (1, 5, 10, 20 e 40 µg mL⁻¹). As análises foram
17 realizadas em triplicata utilizando o butil hidroxitolueno (BHT), como controle positivo,
18 nas mesmas concentrações dos OE e o DPPH em metanol como controle
19 negativo. As absorvâncias foram lidas após 60 min, a 515 nm em espectrofotômetro de
20 massas (MS 5975C). Os valores de absorvância para as concentrações testadas foram
21 posteriormente convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA),
22 determinada pela equação:

$$\text{SRL}(\%) = \frac{\text{Abs. controle negativo} - \text{Abs. amostra}}{\text{Abs. controle negativo}} \times 100$$

23 A concentração eficiente 50% (CE₅₀), quantidade de antioxidante necessária
24 para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%, foi calculada a partir de equações

1 obtidas da regressão linear da atividade antioxidante em função da concentração da
2 amostra na reação (SOUZA, 2007).

3 Com o objetivo de padronizar os resultados da atividade antioxidante pelo ensaio
4 de DPPH, o índice de atividade antioxidante (IAA) foi calculado de acordo com Scherer
5 e Godoy (2009):

$$6 \quad IAA = \frac{C_{DPPH}}{CE_{50}}$$

7

8 Onde C_{DPPH} é a concentração da mistura reacional. As amostras foram
9 classificadas como apresentando baixa atividade antioxidante quando $IAA < 0,5$,
10 atividade antioxidante moderada quando $0,5 < IAA < 1,0$, atividade antioxidante forte
11 quando $1,0 < IAA < 2,0$ e muito forte quando $IAA > 2,0$.

12

13 ***Atividade Antimicrobiana***

14 A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração
15 Bactericida Mínima (CBM) frente a cepas de *Staphylooccus* coagulase positiva ATCC
16 25923, *Salmonella* Cholerasuis ATCC 10798 e *Escherichia coli* ATCC 8739 foi
17 realizada pelo método de macrodiluição em caldo, de acordo com a norma dos testes de
18 sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento
19 aeróbio (NCCLS, 2003).

20 Para a determinação da CIM, realizou-se o preparo de soluções em tubos
21 contendo 2,5 mL de Brain Heart Infusion (BHI), Tween 80 e o OE selecionado nas
22 concentrações de 1, 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após o preparo das soluções, 12,5 μL de
23 suspensão bacteriana do microrganismo foi inoculada em cada tubo com as
24 concentrações testadas, o inóculo bacteriano foi obtido por meio da suspensão direta de
25 colônias em água salina esterilizada (0,85 g/100 mL) até a obtenção de concentração
26 final de 10^8 unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) ajustada de acordo com

1 turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Os tubos foram homogeneizados
2 por 2 min em vórtex e incubados a 37 °C por 24 h.

3 Para a determinação da CIM utilizou-se o reagente cloreto de trifeniltetrazólio
4 (TTC). Os tubos que apresentaram coloração vermelha após a adição de 125 µL do
5 reagente indicaram crescimento de microrganismos, aqueles que permanecerem com
6 coloração amarela demonstravam ausência de microrganismos, comprovando a
7 eficiência do óleo como agente antimicrobiano (DUARTE et al., 2005). Para
8 determinação da CBM, alçadas, das suspensões dos tubos que não apresentaram
9 turvação, foram transferidas para placas com Ágar Padrão para contagem (PCA), as
10 quais foram incubadas a 37 °C ± 2 °C por 48 h.

11 **RESULTADO E DISCUSSÃO**

12 *Análise do óleo essencial por cromatografia*

13 Para o OE de alfavaca (Tabela 1) foram identificados dez compostos, dentre os
14 quais, o-cimeno (26,0%), bisaboleno (13,0%), γ -terpineno (12,8%), eugenol (5,4%) e o
15 timol (1,9%). O baixo teor de timol e eugenol encontrados para a alfavaca diferiram dos
16 identificados em outros estudos, os quais relatam o eugenol como principal constituinte
17 do OE (BORGES et al., 2012, BIASI et al., 2009, PEREIRA & MAIA, 2007). Assim,
18 os espécimes coletados indicam que se tratam de quimiotipos distintos daqueles que
19 acumulam eugenol ou que apresentaram variação sazonal ou espacial, não sendo objeto
20 do presente estudo.

21 A amostra de OE de alfavaca analisada no estudo apresentou elevado teor de o-
22 cimeno em sua composição (Tabela 1), valores semelhantes ao obtido por Valente et al.
23 (2013) para o OE de *Oenanthe crocata* L. que relataram como como composto
24 majoritário trans-β-ocimeno (31,3%) e e cis-β-cimeno (12,3%).

1 O OE de orégano (Tabela 1) apresentou como composto majoritário o 4-
2 terpineol (19,5%), timol (13,6%) e o γ -terpineno (11,1%). Resultado semelhante foi
3 observado por Blank et al. (2016) com amostras de orégano secas adquiridas
4 comercialmente em Santa Cruz do Sul-RS, onde os compostos identificados foram α -
5 terpeniol, γ -terpineno, linalol, 4-terpineol e timol.

6 De acordo com Araújo & Longo (2016) e Borges et al. (2012) é possível
7 observar variações nos teores dos principais componentes do OE de orégano e na
8 qualidade e quantidade de compostos ativos. A atividade antibacteriana, antioxidante e a
9 presença de compostos nos OEs podem variar devido a fatores abióticos como clima,
10 forma de cultivo, variedade do orégano e processo de extração do OE (FALCONE et
11 al., 2005, OUSSALAH et al., 2006).

12 Para o OE de alecrim-pimenta (Tabela 1) foram identificados nove compostos,
13 dentre os quais destacaram-se o carvacrol (32,5%), o timol metil éter (10,8%), o o-
14 cimeno (9,8%) e o β -cariofileno (7,6%). Estudos realizados com OE de alecrim-pimenta
15 extraídos da mesma área do ICA-UFMG apresentaram composição química semelhante,
16 tendo o carvacrol (32,7%), p-cimeno (23%), timol metil éter (10,03%) e β -cariofileno
17 (7,98%) como compostos mais abundantes (ALMEIDA et al., 2016). Estudos químicos
18 indicam que timol e carvacrol são componentes majoritários da composição dos OE de
19 *Lippia origanoides* (VICUNÃ et al. 2010; STASHENKO et al., 2010). O OE de
20 alecrim-pimenta rico em carvacrol apresenta boa atividade antibacteriana frente a
21 patógenos e é um agente antioxidante capaz de retardar o processo de oxidação quando
22 aplicado em produtos alimentícios (SARRAZIM et al., 2015).

23

24 ***Atividade antioxidante dos óleos essenciais***

25

1 O OE de alfavaca apresentou atividade antioxidante muito forte, com CE_{50} de
2 $3,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2) e IAA de 12,30, sendo essa atividade superior ao do padrão
3 sintético BHT (Tabela 3). Segundo Tomaino et al. (2005), a intensa atividade
4 antioxidante do OE de alfavaca pode estar associada à presença de eugenol, que não foi
5 observado no presente estudo. No entanto, em estudo realizado por Joshi (2013), o autor
6 constatou maior atividade antioxidante para o OE de alfavaca ($CE_{50} 23,6 \mu\text{g mL}^{-1}$)
7 quando comparado ao eugenol puro ($CE_{50} 27,16 \mu\text{g mL}^{-1}$), indicando que outros
8 compostos contribuem na atividade antioxidante. Pereira & Maia (2007) em avaliação
9 do potencial oxidante, observaram porcentagem de 92,44% de inibição de oxidação
10 lipídica, comprovando o forte potencial do OE de alfavaca como antioxidante natural.

11 O OE de orégano apresentou baixa atividade antioxidante, sendo o IAA de 0,37
12 e a CE_{50} de $106,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2 e 3). Os resultados encontrados divergem de
13 estudos anteriores que relatam alta atividade antioxidante para OE de orégano, o que
14 pode ter ocorrido em função da alteração na composição química, decorrentes do
15 cultivo, processamento ou armazenamento.

16 Vazirian et al. (2014) observaram CE_{50} de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o OE de orégano, a
17 atividade antioxidante apresentada pelo OE foi maior do que a dos antioxidantes padrão
18 utilizados (Vitamina E e butilhidroxianisol). Segundo o autor, a alta atividade
19 antioxidante pode estar associada à concentração de compostos fenólicos no óleo. Henn
20 et al. (2010) observaram CE_{50} de $174,17 \text{mg mL}^{-1}$, classificando o OE de orégano como
21 potente antioxidante frente à inibição de oxidação de ácidos graxos.

22 O valor da CE_{50} para OE de alecrim-pimenta (Tabela 2) foi de $38,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o
23 IAA de 1,04 (Tabela 3), sendo a atividade antioxidante apresentada classificada como
24 forte. Monteiro et al. (2007) associaram a atividade antioxidante do OE de alecrim-

1 pimenta à presença de timol, composto que participa em 19% da sua composição,
2 embora o carvacrol possa contribuir também.

3 ***Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais***

4 Não foi possível verificar valores de CIM e CBM para as estirpes de *Salmonella*,
5 *E. coli* e *S. aureus* para o OE de alfavaca. O resultado negativo para atividade
6 antimicrobiana pode estar associado à ausência ou baixa concentração de eugenol e
7 timol no OE, considerando que esses compostos são frequentemente associados à
8 atividade antimicrobiana em plantas. Estudos anteriores revelam alta atividade
9 antimicrobiana do OE de alfavaca (ANAND et al., 2011; GEROMINI et al., 2012).

10 O OE de orégano apresentou CIM e CBM frente a todas estirpes analisadas. A
11 concentração de OE de orégano capaz de inibir o crescimento e provocar a morte de *S.*
12 *aureus* e *E. coli* foi $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para a estirpe de *Salmonella*, os valores encontrados
13 foram de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a CIM e $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a CBM.

14 Estudos anteriores demonstram que o OE de *Origanum vulgare* L. possui grande
15 espectro de ação antimicrobiana (CHUN et al., 2005; NOSTRO et al., 2004). De acordo
16 com Höferl (2009) o OE de *O. vulgare* apresenta atividade antimicrobiana frente a
17 bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, dentre elas a *E. coli*. Souza et al. (2009)
18 verificaram CIM de $0,6 \mu\text{L mL}^{-1}$ e CBM de $1,25$ e $2,25 \mu\text{L mL}^{-1}$ frente a *S. coagulase*
19 positiva isolados de queijo. Ao testar *S. aureus* ATCC 25923, Pesavento et al. (2015)
20 encontraram CIM e CBM de $0,125 \mu\text{L mL}^{-1}$ e CBM de $0,56 \mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente,
21 para esse mesmo tipo de OE.

22 A atividade inibitória do OE de alecrim-pimenta foi constatada a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$
23 sobre *E. coli* e *S. aureus* e a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ sobre *Salmonella*. Quanto à atividade
24 bactericida, foram encontradas concentrações de OE de alecrim-pimenta de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$
25 frente a *E. coli*. E de $40 \mu\text{L mL}^{-1}$ frente a *S. aureus* e *Salmonella*.

1 Os resultados encontrados corroboram com estudos que apontam a eficiência do
2 OE de alecrim-pimenta como agente antimicrobiano (ANDRADE et al., 2014;
3 QUEIROZ et al. 2014). Castro et al. (2011) estudaram o efeito do OE de alecrim-
4 pimenta frente a *S. aureus* e *E. coli* isoladas de queijo minas artesanal e obtiveram CIM
5 de 13 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e CBM de 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para ambas as estirpes.

6

7 CONCLUSÃO

8 O OE de *Ocimum gratissimum* L. apresentou como composto majoritário o o-
9 cimeno, composto pouco relatado na literatura para a espécie, os OE de *Origanum*
10 *vulgare* L. e *Lippia origanoides* Kunth. apresentaram como composto majoritário o 4-
11 terpeniol e carvacrol, respectivamente. Os OEs de *Lippia origanoides* Kunth. e
12 *Origanum vulgare* L., analisados nesse estudo, apresentaram atividade antioxidante e
13 antimicrobiana relevantes. Para o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. não foi
14 possível detectar atividade antimicrobiana dentre as concentrações analisadas, no
15 entanto, o óleo essencial apresentou a melhor atividade antioxidante dentre os óleos
16 analisados, apresentando atividade antioxidante superior ao padrão utilizado. Os
17 resultados encontrados demonstram alto potencial para a aplicação de óleos essenciais
18 como agentes antioxidantes e antimicrobianos como substituintes de agentes químicos e
19 sintéticos em produtos alimentícios.

20

21 REFERÊNCIAS

22 ADAMS, R.P. **Identification of essential oils componets by gás chromatography/
23 mass spectroscopy**. 4.ed. Allured Bussiness Media, USA, 2012. 804p.

- 1 ALMEIDA, A.C. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia*
2 *origanoides* Cham. (Alecrim-pimenta) na presença de leite bovino. **Pesquisa**
3 **Veterinária Brasileira**, v.36, p.905-11, 2016. Disponível em: <
4 <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2016000900018> >. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi:
5 10.1590/s0100-736x2016000900018.
- 6 ANAND, A.K. et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of
7 three *Ocimum* species from Uttarakhand (India). **International Journal of Pharmacy**
8 **and Pharmaceutical Sciences**, v.3, p. 223-25, 2011.
- 9 ANDRADE, V.A. et al. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the
10 essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, p.1153-
11 1161, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2014001200002>
12 Acesso em: Abr. 22, 2017. doi: 10.1590/S0100-736X2014001200002
- 13 ARAÚJO, M.M., LONGO, P. L. Teste de ação antibacteriana in vitro de óleo essencial
14 comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante de cepas de *Escherichia coli* e
15 *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, p.1-7, 2016.
16 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000702014>> . Acesso em: Abr.
17 22, 2017. doi: 0.1590/1808-1657000702014.
- 18 BAKALLI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical**
19 **Toxicology**,v.46,p.446-475,2008.Disponível em:
20 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17996351>>. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi
21 10.1016/j.fct.2007.09.106
- 22 BAYDAR, H. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from
23 *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food**
24 **Control**,v.15, p.169-172, 2004. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0956-](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00028-8)
25 [7135\(03\)00028-8](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00028-8)>. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi: 10.1016/S0956-7135(03)00028-8.

- 1 BIASI, L. A. et al. Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo
2 essencial da alfavaca quimiotipo eugenol. **Horticultura Brasileira**, v.27, p.35-39,
3 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362009000100007>>. Acesso
4 em: Abr. 22, 2017. doi: 10.1590/S0102-05362009000100007.
- 5 BLANK, D.E. et al. Composição química e citotoxicidade de *Origanum vulgare* L. e
6 *Rosmarinus officinalis* L. **Science and Animal Health**, v.4, p.117-30, 2016. Disponível
7 em: <<http://dx.doi.org/10.15210/sah.v4i2.6569>>. Acesso em: Abr. 17, 2017. doi:
8 10.15210/sah.v4i2.6569.
- 9 BORGES, A.M. et al. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum*
10 *gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.).
11 **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, p.656-656, 2012. Disponível em: <
12 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000400013>>. Acesso em: Maio. 02, 2017.
13 doi: 10.1590/S1516-05722012000400013.
- 14 CARVALHO JUNIOR, W.G.O.;MELO, M.T.P.; MARTINS, E.R Fenologia do
15 alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em área de Cerrado, no norte de Minas Gerais,
16 Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.223-229,2011. Disponível
17 em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000200015>>. Acesso em: Abr. 22,
18 2017. doi: 10.1590/S1516-05722011000200015.
- 19 CASTRO, C.E. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia*
20 *sidoides* Cham. (Verbenaceae) contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.
21 **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.293-97,2011. Disponível em:<
22 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000300007>>. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi:
23 10.1590/S1516-05722011000300007.
- 24 CHUN, S. K. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with
25 antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v.40, p.809-

- 1 81, 2005. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.02.018>>. Acesso em
2 Abr. 22, 2017. doi: 10.1016/j.procbio.2004.02.018.
- 3 CRISHTI, S.; KALOO, Z. A.; SULTAN, P. Medicinal importance of genus *Origanum*:
4 A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v.5, p.170-177, 2013.
5 Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/JPP>>. Acesso em: Abr. 22, 2017 .
6 doi: 10.5897/JPP2013.0285.
- 7 DAMBOLENA, J. S. et al. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and
8 *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibition effects on growth and
9 fumonisin production by *Fusarium verticilliodes*. **Innovative Food Science and**
10 **Emerging Technologies**, v.11, p.410-414, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.005>>. Acesso em: Abr. 22,
11 2017. Doi: 10.1016/j.ifset.2009.08.005.
- 12
13 DUARTE, M. C.T. et al. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of**
14 **Ethnopharmacology**, v.97, p.305-311, 2005. Disponível em: <
15 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.016>>. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi:
16 10.1016/j.jep.2004.11.016.
- 17 FABRI, R.L. et al. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia*
18 species by bioautography. **Journal of Medical Food**. v.14, p.840–6, 2011. Disponível
19 em: <<https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0141>>. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi:
20 10.1089/jmf.2010.0141.
- 21 FALCONE, P. et al. A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a
22 natural preservative. **Journal of Food Protection**, v.68, p.1664-1670, 2005.
- 23 FRANCO, A. L.P. et al. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana
24 dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (ALFAZEMA),
25 *Ocimum gratissimum* L. (ALFAVACACRAVO) E *Curcuma longa* L. (AÇAFRÃO).

- 1 **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, p.209-220, 2007. Disponível em: <
2 <https://doi.org/10.5216/ref.v4i2.3063>>. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi:
3 10.5216/ref.v4i2.3063.
- 4 GEROMINI, K.V.N. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas
5 medicinais. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR.**, v.15, p.127-
6 131, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.25110/arqvet.v15i2.2012.4215>>. Acesso
7 em: Abr. 22, 2017. doi: 10.25110/arqvet.v15i2.2012.4215.
- 8 GUIMARÃES, D.O. et al. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a
9 descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, p.667-679,
10 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>>. Acesso
11 em: Abr. 22, 2017. doi: 10.1590/S0100-40422010000300035.
- 12 HENN, J.D. et al. Oregano essential oil as food additive for piglets: antimicrobial
13 and antioxidant potential. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.1761-1767, 2010.
14 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010000800019>>. Acesso em:
15 Abr. 22, 2017. doi: 10.1590/S1516-35982010000800019.
- 16 HÖFERL, M. et al. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and
17 their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v.21,
18 p.459-464, 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2009.9700218>>.
19 Acesso em: Abr. 22, 2017. doi: 10.1080/10412905.2009.9700218.
- 20 HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation:
21 mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in**
22 **Microbiology**, v.3, p.1-24, 2012. Disponível em: <
23 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>>. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi:
24 10.3389/fmicb.2012.00012.

- 1 JOSHI, R.K. Chemical composition, In vitro antimicrobial and antioxidant activities of
2 the essential oils of *Ocimum gratissimum*, *O. sanctum* and their major constituents.
3 **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.75, p.457-62, 2013. Disponível em:
4 <[https://doi.org/ 10.4103/0250-474X.119834](https://doi.org/10.4103/0250-474X.119834)>. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi:
5 10.4103/0250-474X.119834.
- 6 KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential
7 oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p.813-829, 2003. Disponível em: <
8 <http://dx.doi.org/10.2174/0929867033457719>>. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi:
9 10.2174/0929867033457719.
- 10 KULISIC, T.; RADONIC, A.; MILOS, M. Antioxidant properties of thyme (*Thymus*
11 *vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils. **Italian Journal of**
12 **Food Science**, v.17, p.315-24, 2005.
- 13 LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and
14 antioxidant activities of *Artemisia* essential oil. **Phytochemistry**, v.69, p.1732-1738,
15 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.014>>. Acesso em:
16 Maio, 01, 2017. Doi: 10.1016/j.phytochem.2008.02.014.
- 17 LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. 2
18 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.
- 19 MARIUTTI, L. R. B. et al. Free radical scavenging activity of ethanolic extracts from
20 herbs and spices commercialized in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and**
21 **Technology**, v.51, p.1225-32, 2008. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1590/S1516-](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132008000600018)
22 [89132008000600018](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132008000600018)>. Acesso em: Maio, 01, 2017. doi: 10.1590/S1516-
23 [89132008000600018](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132008000600018).

- 1 MATASYOH, L.G. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the
2 essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. **African Journal of**
3 **Biotechnology**, v.6, p. 760-765, 2007.
- 4 MELO, M.T.P., et al. Teor de óleo essencial de alecrim-pimenta em função do horário
5 de colheita. **Ciência Rural**, v.41,p.1166-69, 2011.
- 6 MILITELLO, M. et al. Chemical composition and antibacterial potential of *Artemisia*
7 *arborescens* L. essential oil. **Current Microbiology**, v.62, p.1274-1281, 2011. Acesso
8 em: Maio, 01, 2017. doi: 10.1007/s00284-010-9855-3.
- 9 MONTEIRO, M.V.B. et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and
10 antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Leaves. **Journal of**
11 **Ethnopharmacology**, v.111, p.378-82, 2007. Disponível em: <
12 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.036> >. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi:
13 10.1016/j.jep.2006.11.036.
- 14 NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS
15 (NCCLS). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por**
16 **Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada**. 6ª ed. Norma
17 NCCLS M7-A6; 2003.
- 18 NOSTRO A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant *staphylococci* to oregano
19 essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v.230, p.191-195,
20 2004. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00890-5.
- 21 OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the
22 growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v.73, p.236-
23 244, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.11.019> >. Acesso
24 em: Abr. 22, 2017. doi: 10.1016/j.meatsci.2005.11.019.

- 1 PATON, A. A synopsis of *Ocimum* L. (Labiatae) in Africa. **Kew Bulletin**, v.47, p.403-
2 435, 1992. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/4110571>>. Acesso em: Maio,
3 01, 2017. doi: 10.2307/4110571.
- 4 PAULA-FREIRE, L.I.G. et al. Evaluation of the Antinociceptive activity of *Ocimum*
5 *gratissimum* L. (Lamiaceae) essential oil and its isolated active principles in mice.
6 **Phytotherapy Research**, v.27, p.1220-1224, 2013. Disponível em: <
7 <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.4845>>. Acesso em: Maio, 01, 2017. doi: 10.1002/ptr.4845.
- 8 PEREIRA, C. A.M.; MAIA, J.F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo
9 essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciência e**
10 **Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.624 - 632, 2007. Disponível em:
11 <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000300030>>. Acesso em: Maio, 01, 2017.
12 doi: 10.1590/S0101-20612007000300030.
- 13 PESAVENTO, G. et al. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus
14 essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef
15 meatballs. **Food Control**, v.54, p.188-99, 2015. Disponível em: <
16 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.045>>. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi:
17 10.1016/j.foodcont.2015.01.045.
- 18 PRAKASH, B. et al. Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L.
19 essential oil as an antioxidant and safe plant based antimicrobial against fungal and
20 aflatoxin B1 contamination of spices. **Food Research International**, v.44, p.385-390,
21 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.002>>. Acesso em: Abr.
22 22, 2017. doi:10.1016/j.foodres.2010.10.002.
- 23 QUEIROZ, M.R.A. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial
24 de *Lippia organoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem
25 animal. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.16, p.737-43, 2014. Acesso em:

- 1 Abr.22,2017.doi:10.1590/1983-084X/130_083.
- 2 SADEGHI, Z. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of *Boerhavia*
3 *elegans* (choisy) grown in Baluchestan, Iran. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v.5,
4 p.1-9, 2015.
- 5 SARRAZIM, S.L.F. et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and
6 antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Lipids in**
7 **Health and Disease**, v.14, p. 145-152, 2015. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi:
8 10.1186/s12944-015-0146-.
- 9 SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-
10 picrylhydrazyl method, **Food Chemistry**, v.112, p.654-58, 2009. Disponível em:
11 <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>>. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi:
12 10.1016/j.foodchem.2008.06.026.
- 13 SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química
14 na atividade frente a *Salmonella* Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30,
15 p.136-141, 2010.Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1590/S0101-](http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000500021)
16 [20612010000500021](http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000500021)>. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi: 10.1590/S0101-
17 [20612010000500021](http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000500021).
- 18 SOARES, B.V.; TAVARES, D.M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial
19 bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v.3, p.
20 109-123, 2013. Acesso em: Abr. 22, 2017. doi: 10.18561/2179-
21 5746/biotaamazonia.v3n1p109-123.
- 22 SOUZA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas
23 medicinais. **Química Nova**, v.30, p.351-355, 2007. Disponível em: <
24 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>>. Acesso em: Abr. 22, 2017.
25 doi: 10.1590/S0100-40422007000200021.

- 1 SOUZA, E.L. et al. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and
2 acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Brazilian**
3 **Journal of Microbiology**, v.4, p.387-393, 2009. Disponível em: <
4 <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822009000200032>>. Acesso em: Abr, 22, 2017.
5 doi: 10.1590/S1517-83822009000200032.
- 6 STASHENKO, E.E. et al. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on
7 essential oil GC/MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**,
8 v.33, p.93-103, 2010. Acesso em: Abr, 22, 2017. doi: 10.1002/jssc.200900452.
- 9 TOMAINO, A. et al. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical
10 composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v.89, p.549 - 554,
11 2005. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.011>>. Acesso em:
12 Abr, 22, 2017. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.03.011.
- 13 UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil
14 from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, p.99-105. 2006. Acesso
15 em: Abr. 22, 2017. doi:10.1016/j.parint.2005.10.006.
- 16 VALENTE, J. et al. Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenathe*
17 *crocata* L. essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v.62, p.349-354, 2013.
18 Acesso em: Abr. 22, 2017. doi: 10.1016/j.fct.2013.08.083.
- 19 VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. A generalization of the retention index system
20 including linear temperature programmed gas—liquid partition
21 chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.11, p.463-471, 1963. Disponível
22 em: < [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)>. Acesso em: Abr. 22, 2017.
23 doi: 10.1016/S0021-9673(01)80947-X.

1 VAZIRIAN, M. et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Origanum*
2 *vulgare* subsp. *vulgare* essential oil from Iran. **Research Journal of Pharmacognosy**,
3 v.2, p.41-46, 2014.

4 VICUNÃ, G.C. et al. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and
5 their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v.81, p.
6 343-349, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.10.008>>. Acesso
7 em: Abr. 22, 2017. doi: 10.1016/j.fitote.2009.10.008.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1 Tabela 1- Composição química dos óleos essenciais, extraído das folhas de *Ocimum*
 2 *gratissimum* L. (alfavaca) *Origanum vulgare* L. (orégano) e *Lippia origanoides*
 3 Kunth.(alecrim-pimenta).

Composto	TR _(min)	IR _{cal}	IR _{lit}	<i>Ocimum gratissimum L.</i>	<i>Origanum vulgare L.</i>	<i>Lippia origanoides Kunth.</i>
TIC (%)						
o-Cimeno	8,3	1024	1022	26,0	2,5	9,8
γ-Terpineno	9,4	1057	1054	12,8	11,1	6,7
Timol metil éter	16,3	1228	1232	-	-	10,8
Timol	18,9	1289	1289	1,9	13,6	5,0
Carvacrol	19,4	1300	1298	-	-	32,5
β-Cariofileno	24,3	1416	1417	7,2	-	7,6
α-Bergamoteno	24,9	1430	1432	-	-	1,5
β-Bisaboleno	27,9	1505	1506	13,0	-	3,7
Sabineno	6,6	973	969		2,7	-
α-Terpineno	8,0	1017	1014	2,6	6,4	-
p-Cimeno	8,3	1024	1020	-	2,5	-
4-Terpineol	14,4	1182	1174	-	19,5	-
Terpineol	14,9	1195	1186	-	4,5	-
Acetato linalol	17,2	1249	1254	-	2,7	-
β-Thujene	5,4	925	924	4,3	-	-
β-Pineno	7,1	989	974	1,9	-	-
Eugenol	21,5	1349	1356	5,4	-	-
α-Farneceno	27,9	1504	1505	9,3	-	-
Identificados				84,4	65,5	77,6
Desconhecidos*				15,6	34,5	22,4
Total				100	100	100

4

5 Desconhecidos (*):TR: tempo de retenção. IR_{cal} índice de retenção calculado segundo

6 Van Den Dool and Kratz (1963). IR_{Lit} índice de retenção da literatura. TIC (%): área

7 obtida do cromatograma de íons totais. (-): composto não detectado.

8

9

10

1 Tabela 2- Atividade antioxidante de óleos essenciais em ensaio do DPPH.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Capacidade de Sequestro de Radicais			
	BHT	<i>Ocimum gratissimum</i> L	<i>Origanum vulgare</i> L.	<i>Lippia origanoides</i> Kunth.
1	10,96	23,76	09,16	08,18
5	28,61	52,56	08,79	22,86
10	66,20	82,93	15,47	26,08
20	85,34	83,45	18,92	40,31
40	88,84	92,17	23,45	47,23
CE ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	12,01	3,25	106,10	38,44

2 *Ocimum gratissimum* L.: alfavaca, *Origanum vulgare*: orégano, *Lippia origanoides*

3 Kunth.: alecrim-pimenta; BHT: Butil hidroxitolueno; CE₅₀ = Concentração eficiente
4 capaz de reduzir 50% o DPPH.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

- 1 Tabela 3 - Índice de atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* L.,
 2 *Origanum vulgare* L. e *Lippia origanoides* Kunth.

	Equações	IAA
BHT	$y = 1,8759x + 27,477$	3,33
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	$y = 0,9064x + 15,154$	12,30
<i>Origanum vulgare</i>	$y = 1,4232x + 45,341$	0,37
<i>Lippia origanoides</i> Kunth.	$y = 0,3833X + 9,3318$	1,04

- 3 BHT: Butil hidroxitolueno. *Ocimum gratissimum* L., *Origanum vulgare* L.: orégano
 4 *Lippia origanoides* Kunt: alecrim-pimenta; alfavaca; IAA: índice de atividade
 5 antioxidante.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

1

4.2 Artigo 2 : Análise microbiológica e oxidação lipídica de linguiça frescal de frango formulada com adição de óleo essencial

Este artigo foi elaborado conforme as normas da Revista Ciência Rural

1 **Análise microbiológica e oxidação lipídica de linguiça frescal de frango formulada**
2 **com adição de óleo essencial**

3
4 **Microbiological analysis and lipid oxidation of fresh chicken sausage formulated**
5 **with the addition of essential oil**

6
7 **Renatta Soares Souza¹ Francielly Soares Oliveira¹ Roberta Torres Careli¹ Luana**
8 **Leão Lemos¹ Francine Souza Alves de Fonseca¹ Ernane Ronie Martins¹**

9
10 ¹ Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Montes Claros. Av. Universitária,
11 1000, Bairro Universitário, Montes Claros - MG. 39404-547. E-mail:
12 renatta_3@hotmail.com. Autor correspondência.
13

14
15
16 **RESUMO**

17 O objetivo do trabalho foi verificar o potencial antimicrobiano e a oxidação
18 lipídica da linguiça frescal de frango produzida com óleo essencial (OE) de *Origanum*
19 *vulgare* L. e *Lippia origanoides* Kunth. A linguiça frescal foi produzida utilizando-se
20 seis tratamentos: OE de orégano 40 µg mL⁻¹ (T1) e 10 µg mL⁻¹ (T2), OE de alecrim-
21 pimenta 40 µg mL⁻¹ L (T3) e 10 µg mL⁻¹ (T4), mistura 10 µg mL⁻¹ dos óleos essenciais
22 (OEs) de alecrim-pimenta e orégano (T5) e o controle (T6). As amostras foram
23 mantidas sob refrigeração (7 °C± 1°C) e realizou-se a determinação do efeito
24 antimicrobiano dos OEs por meio das análises de coliformes a 45 °C, *Staphylococcus*
25 coagulase positiva e *Salmonella* sp. As análises físico-químicas de determinação do pH,
26 oxidação lipídica pelo método de reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a análise
27 dos voláteis via HS-CG/EM foram realizadas com o intuito de verificar a permanência
28 dos OEs e a estabilidade do produto final. Para as análises microbiológicas, os
29 tratamentos T1, T2 e T3 foram eficientes na redução de coliformes a 45 °C, não foi

1 observado desenvolvimento de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostra e o
2 tratamento T3 inibiu o desenvolvimento de *Salmonella* sp. durante todo o experimento.
3 Houve controle na população de bactérias patogênicas e não foram observadas
4 variações de pH. Para as análises físico-químicas, observou-se permanência dos
5 compostos majoritários dos OEs de alecrim-pimenta e orégano pela análise de HS-
6 CG/EM. Todos os OEs foram eficientes no controle da oxidação lipídica e os principais
7 marcadores químicos foram detectados nos voláteis liberados pela linguiça após o
8 armazenamento. Foi possível verificar a viabilidade da inclusão do OE de alecrim-
9 pimenta e orégano nas formulações de linguiça frescal de frango.

10 Palavras-chave: alecrim-pimenta, orégano, linguiça frescal, oxidação lipídica.

11 **ABSTRACT**

12 The aim of this work was to verify the antimicrobial potential and lipid oxidation
13 of fresh chicken sausage produced with essential oil (EO) of *Origanum vulgare* L. and
14 *Lippia origanoides* Kunth. The fresh sausage was produced in six treatments: EO of
15 oregano 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (T1) and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (T2), OE of alecrim-pimenta 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (T3)
16 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (T4), 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of OE of alecrim-pimenta and orégano (T5) and
17 control (T6). The samples remained refrigerated ($7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) and the antimicrobial
18 effect of EO was determined by coliform analyzes at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, *Staphylococcus* coagulase
19 positive and *Salmonella* sp. Physical-chemical analyses of pH, lipid oxidation by the
20 thiobarbituric acid reaction (TBARS) and the analysis of the volatiles via HS-CG /MS
21 were realized with the purpose of verifying the permanence of the oils and the stability
22 on the final product. The treatments T1, T2 and T3 were efficient in the reduction of
23 coliforms. The treatment T3 inhibited the development of *Salmonella* sp during the
24 whole experiment. It was possible to verify the permanence of the major compounds of

1 OE of alecrim-pimenta and oregano by HS-GC / MS analysis. It was possible to verify
2 the availability of the inclusion of EO of alecrim-pimenta and oregano in fresh chicken
3 sausage formulations. There was control in the population of pathogenic bacteria and no
4 variations of pH were observed. All of the EO were efficient in the control of lipid
5 oxidation and the main chemical markers were detected in the volatiles released by
6 sausage after storage.

7 **Key words:** orégano, alecrim-pimenta, fresh sausage, lipid oxidation.

8

9 **INTRODUÇÃO**

10 A carne é excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos,
11 devido à elevada atividade de água (A_w) e à presença de substâncias nitrogenadas e
12 minerais (MOSCHONAS et al., 2011). Esses fatores favorecem a contaminação por
13 patógenos e, por isso, são necessárias medidas de profilaxia e segurança desde o abate
14 do animal até o armazenamento do produto final (DELHALLE et al., 2009,
15 CASTELLANO et al., 2009).

16 A linguiça, produto cárneo industrializado, tem grande consumo no Brasil,
17 apresentando processo produtivo no qual são empregados aparelhos simples e de baixo
18 custo (NASCIMENTO et al., 2012, BRASIL, 2000). A linguiça do tipo frescal é
19 largamente comercializada no país, devido ao sabor característico e preço acessível
20 (OLIVEIRA; ARAÚJO; BORGIO, 2005). A excessiva manipulação durante a produção
21 e a ausência de tratamento térmico faz com que a linguiça possa veicular
22 microrganismos patogênicos ou deterioradores comprometendo a qualidade
23 microbiológica do produto final (SILVA et al., 2016).

1 As doenças transmitidas por alimentos (DTAs), consideradas como grave
2 problema de saúde pública, são provocadas por agentes contaminantes que utilizam a
3 água ou os alimentos para adentrarem o organismo (FAO/WHO, 2014, HAVELAAR et
4 l., 2010) e estão associadas a diversos fatores, dentre eles: matérias primas
5 contaminadas, manipulação excessiva, falta de assepsia durante o preparo e controle
6 ineficaz de tempo e temperatura durante a produção de alimentos (ZANDONADI et al.
7 2007, GREIG; RAVEL, 2009). Bactérias, fungos e protozoários são os principais
8 agentes causadores de DTAs, sendo as bactérias responsáveis pelo maior número de
9 surtos (MIRANDA & BARRETO, 2012).

10 Os sais de cura, nitrato e nitrito, comumente empregados na indústria
11 alimentícia, como aditivos em embutidos, atuam como conservante frente à deterioração
12 do produto, também apresentam função antioxidante e de realçador de sabor
13 (PETENUCCI, et al., 2004; FERREIRA, MOREIRA, FREITAS, 2013).

14 O nitrito, quando ingerido em excesso, atua impedindo que a hemoglobina
15 exerça a função de transporte do oxigênio pelo organismo, outro malefício relacionado à
16 saúde pode estar associado ao potencial de formação de N-nitrosaminas carcinogênicas
17 a partir de nitritos e aminas secundárias formadas no estômago (GUERREIRO, SÁ,
18 RODRIGUES et al., 2012; ARAÚJO & RODRIGUES, 2008; DUTRA, RATH,
19 REYES, 2007).

20 Com vistas a conservar o alimento e aumentar a segurança alimentar, pesquisas
21 vêm sendo desenvolvidas com produtos naturais, dentre eles, destacam-se os óleos
22 essenciais (OEs), caracterizados como metabolitos secundários de plantas e de baixa
23 toxicidade (SILVA & BASTOS, 2007).

1 O objetivo do estudo foi formular linguiça frescal de frango adicionada dos
2 óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Lippia origanoides* Kunt.e avaliar a
3 atividade antimicrobiana e antioxidante dos mesmos.

4 **MATERIAL E MÉTODOS**

5 **Formulação da linguiça frescal**

6 Os lotes experimentais de linguiça frescal de frango foram elaborados no
7 Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. A
8 matéria-prima utilizada para a fabricação foi a carne de peito de frango (88,5%)
9 adquirida comercialmente, previamente desossada e isenta de gordura e pele aparente. O
10 peito de frango foi cortado em cubos e adicionado de toucinho dessalgado (10%) e sem
11 pele na proporção de 9 partes de frango para 1 de toucinho. Em seguida, a carne foi
12 moída em picador de carne (Marca Skymesen, modelo PSEE-98THD-N) e
13 posteriormente adicionada em bandejas para adição de sal marinho (1,5%) e dos OE.

14 A extração dos OEs foi realizada no Laboratório de Plantas Medicinais do
15 ICA/UFMG pela técnica de hidrodestilação em aparelho tipo *Clevenger*. Após a
16 extração, a fração de OE foi pesada em balança analítica e armazenada em frasco âmbar
17 sob refrigeração.

18 Foram avaliados seis tratamentos: OE de orégano adicionado na concentração de
19 $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ (T1) e de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (T2), procedeu-se da mesma forma para o OE de
20 alecrim-pimenta na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ (T3) e de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (T4). O quinto
21 tratamento foi elaborado pela adição de OE de orégano e alecrim-pimenta na
22 concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, para verificar a ocorrência do efeito antimicrobiano e
23 antioxidante sinérgico através da aplicação dos dois OE. O sexto tratamento, o controle,
24 foi elaborado sem a adição de OE e com aplicação de sal (T6).

1 Após a incorporação dos OE a massa obtida foi devidamente fechada,
2 identificada e refrigerada ($7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 1 h. Posteriormente foram embutidas em
3 tripa suína de médio calibre (30 mm), divididas em porções de 500 g para as análises
4 posteriores, acondicionadas em sacos plásticos, fechadas à vácuo e refrigeradas a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm$
5 $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h até o momento das análises.

6 **Análise microbiológica da linguiça frescal**

7 As amostras dos seis tratamentos foram submetidas às análises microbiológicas
8 previstas na Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, para linguiças frescas
9 (BRASIL, 2001): frente à *Salmonella* sp., *Staphylococcus* coagulase positiva e
10 coliformes a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. As análises foram realizadas segundo a metodologia do Ministério
11 da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) previstas na Instrução Normativa nº
12 62 de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003).

13 As amostras da linguiça frescal de frango foram submetidas a análises
14 microbiológicas nos tempos 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento. Foram pesados
15 assepticamente $25\text{ g} \pm 0,2$ da amostra e transferidas para sacos de polietileno
16 esterilizados. As amostras foram homogeneizadas por 1 min em *stomacher* com 225 mL
17 de água peptonada 0,1% (p/v). Diluições decimais seriadas e sucessivas foram
18 realizadas em 9 mL de água peptonada 0,1% para determinação das bactérias avaliadas.

19 *Determinação de Coliformes a 45 °C*

20 A contagem de coliformes a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi realizada utilizando-se a técnica do
21 Número Mais Provável (NMP) em séries de três tubos, com a realização de testes
22 presuntivo em Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e confirmativo em caldo
23 *Escherichia coli* (EC). Para a determinação do NMP foram retiradas três alíquotas de 1
24 mL de cada diluição e inoculadas em três tubos contendo 10 mL de caldo Lauril sulfato

1 Tryptose (LST), com tubo de Durham invertido. Através da técnica foram obtidas três
2 séries de três tubos que permaneceram incubados a 35 °C por 24 h. Após esse período,
3 uma alçada dos tubos que apresentaram turvação do meio e produção de gás foi
4 transferida para tubos com Caldo EC, para determinação de coliformes a 45 °C, que
5 permanecerão incubados a 45 °C por 24 h. Tubos com o meio de cultura turvo e com
6 produção de gás carbônico foram considerados positivos e a determinação do NMP por
7 grama de amostra realizada através da tabela de NMP.

8 *Contagem e identificação de Staphylococcus coagulase positiva*

9

10 Para enumeração, isolamento de colônias e identificação de *Staphylococcus*
11 coagulase positiva, foi empregado o plaqueamento de 0,1 mL das diluições decimais
12 seriadas, de cada amostra, em placas contendo Agar Baird–Parker suplementado com
13 gema de ovo e telurito, com incubação a 37 °C por 48 h.

14 Após a incubação, pelo menos cinco colônias típicas de cada amostra foram
15 isoladas e transferidas para tubos contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e
16 incubadas por 37 °C por 24 h.

17 A partir das colônias típicas isoladas foi realizado o teste de coagulase positiva,
18 onde foram transferidos 0,2 mL de cada cultura obtida no meio BHI para tubos
19 contendo 0,5 mL de Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) e plasma de coelho.
20 Em seguida os tubos foram incubados a 37°C por 24 h com observação da formação de
21 coágulos por 6 h.

22 *Detecção de Salmonella sp.*

23 Para a identificação de *Salmonella* sp. inicialmente foi realizada a etapa de pré-
24 enriquecimento onde 25 g da amostra foi transferida para frasco contendo 225 mL de

1 Água Peptonada Tamponada, o material permaneceu em repouso por 60 ± 5 min e,
2 quando necessário, o pH foi ajustado em $6,8 \pm 0,2$ com uso de NaOH ou HCl 1N.

3 Posteriormente o frasco foi incubado a 37°C por 24 h. Em seguida, uma alíquota
4 de 0,1 mL foi transferida para tubo contendo 10 mL de Caldo Rappaport-vassiliadis
5 modificado (RV) e outra alíquota de 1 mL transferida para tubo contendo 10 mL de
6 Caldo Tetrionato. A incubação do RV foi realizada a $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h em banho
7 com circulação forçada e a incubação do TSC a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

8 Após o período de incubação, os tubos foram homogeneizados em *vórtex* e uma
9 alçada do caldo de enriquecimento Tetrionato foi transferida para Ágar Xilose Lisina
10 Desoxicolato (XLD), Ágar Bismuto Sulfito (BS) e Ágar Hectoen-enteric (HE) por meio
11 da técnica de estrias por esgotamento; o mesmo procedimento foi realizado para o caldo
12 RV. As placas foram incubadas invertidas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

13 Após esse período foi observada a ocorrência de colônias típicas de *Salmonella*
14 nos meios de plaqueamento. As colônias típicas foram isoladas e inoculadas em tubos
15 contendo o meio Rugai modificado por Pessoa e Silva (1972) para identificação com
16 base nas características bioquímicas do microrganismo.

17 *Determinação de pH*

18

19 Para a determinação de pH, 10 g de amostra foi retirada de porções de
20 aproximadamente três gomos de linguiça, acrescidas de 100 mL de água destilada e
21 homogeneizadas em *stomacher* por 1 minuto. O valor de pH foi determinado em
22 triplicata em potenciômetro digital (Digimed®), previamente calibrado a pH 4 e 7
23 (AOAC, 2005).

24 **Oxidação lipídica**

1 *Reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

2 A análise foi realizada em triplicata nos tempos 0, 7, 14 e 21 conforme Raharjo,
3 Sofos e Schmidt (1992) com modificações. Amostra de 5 g foi pesada e misturada à
4 solução aquosa de 18 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5 % (v/v), 0,5 mL de solução
5 alcoólica de BHT e 2 ml de sulfanilamida a 1,5%, a mistura foi homogeneizada e
6 permaneceu em repouso por 10 min. Após a homogeneização, o sobrenadante foi
7 recuperado e filtrado em papel filtro e armazenado em balão volumétrico de 25 mL,
8 cujo volume foi completado até o menisco com a solução de TCA a 5% (v/v).

9 Foram retirados 2 mL de cada balão volumétrico e adicionadas em tubo de rosca
10 juntamente com 2 mL de TBA (0,08 MM) em ácido acético (50%). Os tubos foram
11 fechados e colocados em banho maria a 80°C por 30 min. Os tubos foram resfriados até
12 a temperatura ambiente e realizou-se a leitura de absorbância a 531 nm em
13 espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC) . Os resultados foram expressos em
14 miligramas de malonaldeído por kg de amostra (mg MDA/kg amostra).

15 **Controle do óleo essencial na linguiça após 21 dias**

16 As linguiças preparadas tiveram os seus compostos voláteis extraídos por
17 *headspace* (HS) e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de
18 massas (CG-EM). Os frascos de *headspace* (20 mL) contendo o produto (1g) foram
19 transferidos para o amostrador automático (HS combi-PAL) homogeneizados (500 rpm)
20 e incubados a 75 °C por 5 min, posteriormente as substâncias voláteis foram extraídas
21 por *headspace* estático. O volume de injeção foi definido (1000 µL) e a seringa
22 previamente aquecida (75 °C) foram adaptados de Aguiar et al. (2014).

23 Para análise de identificação dos voláteis foi utilizado o sistema Agilent
24 Technologies (7890A) acoplado ao espectrômetro de massas (MS 5975C) dotado de

1 coluna capilar de sílica fundida DB-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e hélio (fluxo 1
2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) como gás de arraste. A programação da temperatura foi de 60 $^{\circ}\text{C}$ a 240 $^{\circ}\text{C}$,
3 com um incremento de 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. O sistema foi operado no modo *scan*
4 (monitoramento) com impacto eletrônico a 70 eV, em uma faixa de 45 a 550 (m/z).

5 Os dados gerados foram analisados utilizando o software MSD Chemstation
6 juntamente com a biblioteca NIST, 2009 (*National Institute of Standards and*
7 *Technology*). Os íons totais referentes aos compostos detectados foram utilizados na
8 identificação dos compostos juntamente com a comparação do espectro de massas com
9 o da biblioteca NIST (2.0, 2009) e comparado com informações da literatura (ADAMS,
10 2012).

11

12 *Análise dos resultados*

13 Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as
14 diferenças entre médias determinadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de
15 5%, utilizando-se o programa estatístico R, versão 2.12.2.

16

17 **RESULTADO E DISCUSSÃO**

18 De acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n $^{\circ}$ 12 do Ministério
19 da Saúde (BRASIL, 2001), os padrões microbiológicos para linguiças frescas são
20 definidos como: o limite máximo de 5×10^3 UFC/g para coliformes a 45 $^{\circ}\text{C}$, 5×10^3
21 UFC/g para *Staphylococcus* coagulase positiva, 3×10^3 UFC/g para *Clostridium* sulfito
22 redutor e ausência de *Salmonella* sp. em 25g de alimento.

23 Observou-se diferença ($P < 0,05$) nas contagens de coliformes a 45 $^{\circ}\text{C}$ das
24 amostras avaliadas ao longo do tempo de armazenamento e quanto aos tratamentos com

1 OEs (Tabela 1). Na análise de coliformes a 45 °C (Tabela 1) houve diferença
2 significativa entre os dias de avaliação e os tratamentos com OE. No primeiro dia de
3 avaliação todas as amostras de linguiça elaboradas com diferentes formulações de OE
4 apresentaram contagem de médias de coliformes a 45 °C iguais ($P > 0,05$). No sétimo dia
5 de avaliação, os tratamentos T1, T2 e T3, diferiram estatisticamente e apresentaram
6 redução de 3 log NMP/g e 2 log NMP/g respectivamente, em relação ao tratamento
7 controle que atingiu a contaminação máxima preconizada pela legislação (> 1100
8 NMP/g). No vigésimo primeiro dia os tratamentos T1, T2 e T3 foram eficientes na
9 redução de coliformes apresentando resultado em consonância com a legislação.

10 Em alimentos processados, o alto nível de coliformes indica tratamento
11 inadequado, prévia contaminação da matéria-prima, ou pós processamento ocorrida pelo
12 contato com equipamentos ou falta de higiene durante a manipulação (MESQUITA,
13 2006; CHOUMAN, 2010). Alberti e Nava (2014) e Silva et al. (2016), em avaliação da
14 qualidade higiênico sanitária de linguiças frescas comerciais e artesanais
15 comercializadas, verificaram que 100% das amostras estavam contaminadas por
16 coliformes termotolerantes (> 1.100 NMP/g).

17 Para a contagem de *S. coagulase* positiva, obteve-se em todas as amostras
18 analisadas, resultados em acordo com a legislação vigente (5×10^3 UFC/g). Não foram
19 identificadas, entre as amostras analisadas ocorrência de *Staphylococcus coagulase*
20 positiva. Os resultados corroboram com os encontrados por Neres et al. (2014) que
21 avaliaram diferentes formulações de linguiça fresca e observaram ausência de *S. aureus*
22 e coliformes a 45 °C nas amostras.

23 Para a análise de *Salmonella*, o tratamento T3 foi capaz de inibir o
24 desenvolvimento do microrganismo até o vigésimo primeiro dia de armazenamento. O

1 tratamento T1 foi eficaz para a conservação até o décimo quarto dia de análise. Nas
2 demais concentrações e no controle foram identificados ocorrência de *Salmonella* a
3 partir do sétimo dia de armazenamento.

4 Zweifel e Stephan (2012) relataram uma série de surtos de salmonelose nos
5 Estados Unidos, Reino Unido, Dinamarca, Holanda e Alemanha, oriundo do consumo
6 de alimentos em que na fase final de produção foram adicionadas especiarias sem prévia
7 análise microbiológica.

8 Barbosa et al. (2015), em estudo com linguiça frescal de frango adicionada de
9 OE de manjeriço, nas concentração de 0,03 e 0,3%, não observaram desenvolvimento
10 de *Salmonella* no período de 15 dias de armazenamento. Na análise de coliformes,
11 foram observados o crescimento de 6 log NMP/g no tratamento controle e o OE foi
12 eficiente na inibição de coliformes, desde o primeiro até o último dia de
13 armazenamento.

14 Barbosa et al. (2015) relatam que o OE de orégano na concentração de 1%,
15 aplicado em linguiça de frango previamente contaminada com *Salmonella* Enteritidis
16 ATCC 13076, foi eficiente na redução na contaminação em 2 log no período de 24 h.

17 O crescimento de microrganismos pode ser influenciado por diversos fatores,
18 dentre eles o pH, a forma de processamento, embalagem e a temperatura de
19 armazenamento, quanto maiores os valores de pH, maior é a probabilidade do
20 desenvolvimento de microrganismos (CASTELLANO et al., 2009; MILANI et al.,
21 2003).

22 Houve aumento do pH ao longo do período de armazenamento com valores
23 entre 6,82 e 7,27, apresentando valores acima daqueles citados pela literatura como
24 normais, que são de 5,94 a 6,10 para peito de frango e de 6,4 a 6,7 para coxa de frango

1 (OLIVO & SHIMOKOMAKI, 2006; VAN LAACK et al., 2000). Houve diferença
2 significativa ($P < 0,05$) nos valores de pH entre os dias de avaliação, no entanto, não foi
3 observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos com OE e o controle.

4 Georgantelis (2007), na avaliação de linguiça frescal suína armazenada em
5 bandejas de isopor, revestidas com plástico PVC, observou aumento crescente no valor
6 de pH de 5,8 para 6,2 no período de 20 dias de armazenamento, o acréscimo no valor de
7 pH foi atribuído ao desenvolvimento de microrganismos.

8 A oxidação lipídica produz compostos indesejáveis e perceptíveis
9 sensorialmente, provocando redução da vida de prateleira e diminuição do valor
10 nutricional dos produtos. A análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
11 (TBARS) baseia-se na reação entre o ácido com o malonaldeído (MDA), composto
12 resultante da degradação dos hidroperóxidos. Valores entre 1,00 e 2,00 mg kg⁻¹ são
13 perceptíveis sensorialmente e provocam sabor indesejável no produto (NOVELLO;
14 POLLONIO, 2013). A avaliação de TBARS (Tabela 2) não apresentou diferença
15 significativa ($P > 0,05$) entre os dias de avaliação, no entanto, foi observada diferença
16 significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos com OE e o tratamento controle,
17 demonstrando que a aplicação de todos os OE foi eficiente para diminuir o nível de
18 oxidação nas linguiças.

19 Al-Hijazeen et al. (2016) avaliaram a estabilidade da carne de frango adicionada
20 de OE de orégano armazenada no período de 7 dias. As concentrações de 100, 300 e
21 400 pm de OE de orégano foram capazes de reduzir a oxidação em relação ao
22 tratamento controle e a carne adicionada de conservante químico, na concentração de 5
23 ppm. Fasseas et al. (2007) relataram redução no nível de oxidação em carne adicionada
24 de OE de orégano na concentração de 3% durante 12 dias de armazenamento.

1 Para a análise dos voláteis da linguiça analisados (Tabela 3) foi possível
2 identificar, após os 21 dias de armazenamento, os compostos de α terpineno, terpeniol e
3 timol para os OE de orégano nas concentrações de 10 e 40 $\mu\text{g/mL}$. Waller et al. (2016)
4 identificaram timol e α -terpineno como compostos majoritários para o óleo extraído de
5 *O. vulgare* L., e carvacrol e γ -terpineno para o OE adquirido comercialmente.

6 CONCLUSÃO

7 A adição dos OEs de orégano nas concentrações de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ e o
8 OE de alecrim-pimenta na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, na linguiça frescal de frango,
9 foram eficientes na redução de bactérias patogênicas permitindo que as amostras
10 apresentassem aptas para o consumo após o período de armazenamento. Todos os OEs e
11 as concentrações analisadas foram eficientes para evitar a oxidação lipídica no produto.
12 Os principais marcadores químicos dos OEs continuaram presentes nas amostras
13 mesmo aos 21 dias de armazenamento. Assim, há viabilidade da inclusão do OE de
14 alecrim-pimenta e orégano nas formulações de linguiça frescal de frango, com vistas à
15 redução da carga microbiana e da atividade antioxidante.

16 REFERÊNCIAS

- 17 ADAMS, R.P. **Identification of essential oils components by gas chromatography**
18 **mass spectroscopy**. 4.ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2012.
19 804p.
- 20 AGUIAR, M.C.S. et al. Volatile compounds from fruits of *Butia capitata* at different
21 stages of maturity and storage. **Food Research International**, v.62, p.1095- 1099,
22 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.039>>. Acesso em: Abr.
23 15, 2017. doi: 10.1016/j.foodres.2014.05.039.

- 1 ALBERTI, J; NAVA, A. Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal
2 comercializadas a granel por supermercados e produzidas artesanalmente no município
3 de Xaxim, SC. **Unoesc & Ciência**, v.5, p.41-48, 2014.
- 4 AL-HIJAZEEN, M. et al. Effect of Oregano Essential Oil (*Origanum vulgare* subsp.
5 hirtum) on the Storage Stability and Quality Parameters of Ground Chicken Breast
6 Meat. **Antioxidants**, v.5, p.2-11, 2016. Acesso em: Abr, 15, 2017. doi:
7 10.3390/antiox5020018..
- 8 ARAÚJO, P.F.; RODRIGUES, R.S. Nitratos, nitritos, nitrosaminas e seus efeitos sobre
9 o organismo humano. **Revista Higiene Alimentar**, v.22, p.54-58, 2008.
- 10 Association Of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of
11 Analysis of the AOAC. 18 th ed. Gaithersburg, M.D, USA.
- 12 BARBOSA, L.N. et al. Essential oils from herbs against foodborne pathogens in
13 chicken sausage. **Journal of Oleo Science**, v.64, p.117-24, 2015. Acesso em: Abr. 15,
14 2017. doi: 10.5650/jos.ess14163.
- 15 BRASIL. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos
16 analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem
17 animal e água. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p.14,
18 18 set. 2003.
- 19 _____. Instrução Normativa n.4, de 31 de março de 2000. Aprova os regulamentos
20 técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de
21 linguiça e de salsicha. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília,
22 DF, p.6, 05 abr. 2000.
- 23 _____. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 12, de 2 de janeiro de 2001.
24 Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário**
25 **Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

- 1 BRUM, F.B. et al. Aplicação de ácido fólico em produto cárneo tipo hambúrguer.
2 Revista do **Instituto Adolfo Lutz**, v.70, p.47-52, 2011.
- 3 CASTELLANO, P. et al. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as
4 bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, v.79, p.483-
5 99, 2009. Acesso em: Abr, 15, 2017. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.10.00.
- 6 CHOUMAN, K. et al. Qualidade microbiológica de alimentos servidos em restaurantes
7 self-service. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.69, p. 261-6, 2010.
- 8 DELHALLE, L. et al. *Salmonella* surveillance and control post-harvest in the Belgian
9 pork meat chain. **Food Microbiology**, v.26, p.265-71, 2009. Acesso em: Abr. 15, 2017.
10 doi: 10.1016/j.fm.2008.12.009.
- 11 DUTRA, C.B; RATH, S; REYES, F.G. Nitrosaminas voláteis em alimentos. **Alimentos**
12 **e Nutrição**, v.18, p.111- 120, 2007.
- 13 FAO/WHO. Food Safety. Fact Sheet N° 399. 2014. Disponível em: <
14 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>> . Acesso em: Abril, 15, 2017.
- 15 FASSEAS, M. K. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential
16 oils. **Food Chemistry**, v.106, p.1188-1194, 2007. Disponível em: <
17 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.060>>. Acesso em: Abr. 15, 2017. Doi:
18 10.1016/j.foodchem.2007.07.060.
- 19 FERREIRA, H.M.F.; MOREIRA, E.A.; FREITAS, D.F. Avaliação dos níveis de nitrato
20 e nitrito em salsichas comercializadas na cidade de Lavras-MG. **Revista da**
21 **Universidade Vale do Rio Verde**, v.11, p.218-27, 2013. Disponível em: <
22 <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v11i2.209217>>. Acesso em: Abr. 15, 2017. Doi:
23 10.5892/ruvrd.v11i2.209217.
- 24 GEORGANTELIS, D. et al. Effect of Rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on
25 microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C.

- 1 **Meat Science**, v.76, p. 172-181, 2007. Disponível em: <
2 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.026>>. Acesso em: Abr. 15, 2017. doi:
3 10.1016/j.meatsci.2006.10.026.
- 4 GREIG, J.D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally
5 for source attribution. **Food Microbiology**, v.130, p.77-87, 2009.
- 6 GUERREIRO, R.S.; SÁ, M.T.; RODRIGUES, L.A.P. Avaliação do teor de nitrito e
7 nitrato em alimentos cárneos comercializados em Salvador. **Revista Internacional de**
8 **Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.5, p.77-91, 2012.
- 9 HAVELAAR, A.H. et al. Future challenges to microbial food safety. **International**
10 **Journal of Food Microbiology**, v.139, p.79-94, 2010.
- 11 MILANI, L.I.G. et al. Bioproteção de linguiça de frango. **Revista Ciência e Tecnologia**
12 **de Alimentos**, v.23, p.161-166, 2003. Disponível em:
13 <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612003000200010>>. Acesso em: 15 Abr. 2017.
14 doi: 10.1590/S0101-20612003000200010.
- 15 MELO FILHO, A.B.; BISCONTINI, T.M.B.; ANDRADE, S.A.C. Níveis de nitrito e
16 nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. **Ciência e**
17 **Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.390-392, 2004.
- 18 MESQUITA, M.O. et al. Qualidade microbiológica no processamento do frango
19 assado em Unidade de Alimentação e Nutrição. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**,
20 v.26, p.198-203, 2006.
- 21 MIRANDA, P.C.; BARETO, N.S.E. Avaliação Higiênico Sanitária de diferentes
22 estabelecimentos de comercialização da carne de sol no município de Cruz das Almas-
23 Bahia, **Revista Caatinga**, v. 25, p.166- 172, 2012.
- 24 MOSCHONAS, G. et al. The effect of heart shrink treatment and storage temperature
25 on the time of onset of “blown pack” spoilage. **Meat Science**, v.87, p.115-118, 2011.

- 1 NASCIMENTO, R.S. et al. Linguiças frescais elaboradas com carne de avestruz:
2 característica físico-químicas. **Ciência rural**, v.42, p.184-188, 2012.
- 3 NERES, S. L. et al. Linguiças frescais elaboradas com carne de avestruz: característica
4 físico-químicas. **Ciência rural**, v.16, p.273-278, 2014.
- 5 NOVELLO, D.; POLLONIO, M.A.R. Teores de colesterol e oxidação lipídica em
6 hambúrguer bovino com adição de linhaça dourada e derivados. **Pesquisa**
7 **agropecuária brasileira**, v.48, p.805-808, 2013. Disponível em: <
8 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000700015>>. Acesso em: Abr, 15, 2017.
9 doi: 10.1590/S0100-204X2013000700015..
- 10 OLIVO, R., SHIMOKOMAKI, M. Carne PSE. In: Shimokomaki, M.; Olivo, R.; Terra,
11 N.N.; Franco, B.D.G.M. **Atualidades em ciência e tecnologia de carnes**. (2006) São
12 Paulo: Varela.
- 13 OLIVEIRA, M.J.; ARAÚJO, W.M.; BORGIO, L.A. Quantificação de nitrito e nitrato
14 em linguças do tipo frescal. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v.25, p.736-42, 2005.
- 15 PETENUCCI, M.E. et al. Nitratos e nitritos na conservação de carnes. **Revista Nacional**
16 **da Carne**, v.333, p.52-55, 2004.
- 17 QUILO, S. et al. Microbial, instrumental color and sensory characteristics of inoculated
18 groun beef produced using potassium lactate, sodium metasilicate or peroxyacetic acid as
19 multiple antimicrobial interventions. **Meat Science**, v.84, p. 470-76, 2010. Disponível
20 em: <<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.09.018>>. Acesso em: Abr. 15, 2017.
21 doi:10.1016/j.meatsci.2009.09.018.
- 22 RAHARJO, S.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Improved speed, specificity, and limit of
23 determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid – C18 method for
24 measuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,
25 v.40, p.2182-2185, 1992. Acesso em Abr. 15, 2017. doi: 10.1021/jf00023a027.

- 1 SILVA, A.P.M. et al. Avaliação microbiológica da linguiça artesanal bubalina
2 produzida na Ilha do Marajó, Pará, Brasil. **Scientia Plena**, v.12, n.6, 2016. Disponível
3 em: <<http://dx.doi.org/10.14808/sci.plena.2016.069916>>. Acesso em: Abr. 15, 2017.
4 doi: 10.14808/sci.plena.2016.069916.
- 5 SILVA, D.M.H.; BASTOS, C.N. Atividade fúngica de óleos essenciais de espécies de
6 Piper sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*.
7 **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.143-145, 2007. Disponível em: <
8 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000200008>>. Acesso em: Abr. 15, 2017. doi:
9 10.1590/S0100-41582007000200008.
- 10 SOARES, B.V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial
11 bioativos e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v.3, p.
12 109-123, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v3n1p109-123>> Acesso em: Abr, 15, 2017. doi:
13 <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v3n1p109-123>.
- 14 VAN LAACK, R.L. et al. Characteristics of pale, soft, exudative broiler breast meat.
15 **Poultry Science**, v.79, p.1057-1061, 2000.
- 16 WALLER, S.B. et al. Efeitos dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* Linn.
17 e *Origanum vulgare* Linn. de diferentes origens em *Sporothrix brasiliensis* e
18 complexo *Sporothrix schenckii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**
19 **Zootecnia**, v.68, p.991-999, 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8962>>. Acesso em: Abr. 15, 2017. doi: 10.1590/1678-4162-8962..
- 20 ZANDONADI, R.P. et al. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de auto
21 serviço. **Revista Nutrição**, v.20, p.19-26, 2007. Disponível em:<
22 <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732007000100002>>. Acesso em: Abr, 15, 2017. doi:
23 10.1590/S1415-52732007000100002.

1 ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Spices and herbs as source of *Salmonella*-related
 2 foodborne diseases. **Food Research International**, v.45, p.765-769, 2012. Disponível
 3 em: < <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.024>>. Acesso em: Abr. 15, 2017. Doi:
 4 10.1016/j.foodres.2011.02.024.

5

6 Tabela 1 - Contagens de coliformes a 45 °C durante o armazenamento de amostras de
 7 linguiças frescal de frango adicionadas de óleo essencial de *Ocimum vulgare* L. e *Lippia*
 8 *origanoides* Kunth.

Dias de Avaliação	Coliformes (log NMP.g ⁻¹)			
	1	7	14	21
T1	1.3617278 ^a	0.9637878 ^a	1.361728 ^a	1.497214 ^a
T2	0.4771213 ^a	1.331878 ^a	>3.041393 ^b	2.291726 ^{ab}
T3	1.0413927 ^a	1.568576 ^a	>3.041393 ^b	2.416073 ^{ab}
T4	0.7923917 ^a	>3.041393 ^b	>3.041393 ^b	>3.041393 ^b
T5	0.4771213 ^a	>3.041393 ^b	>3.041393 ^b	>3.041393 ^b
T6	1.0413927 ^a	>3.041393 ^b	>3.041393 ^b	>3.041393 ^b

9 ^aMédias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si
 10 (p<0,05). ^AMédias na mesma linha seguidas pela mesma letra não diferem significativamente
 11 entre si (p<0,05). Médias ± desvio padrão de análises em triplicata. T1: OE de orégano 40 µg
 12 mL⁻¹ , T2: orégano 10 µg mL⁻¹ , T3: alecrim-pimenta 40 µg mL⁻¹ , T4: alecrim-pimenta 10 µg
 13 mL⁻¹ , T5: alecrim-pimenta e orégano na concentração de 10 µg mL⁻¹ , T6: controle.

14

15

16

1 Tabela 2 - Valores médios do índice de TBARS na linguiça frescal de frango tratadas
 2 com óleo essencial durante o período de armazenamento.

Tratamento	mg MDA/kg amostra
T1	0.2716±0,02 ^a
T2	0.1825±0,02 ^a
T3	0.2166±0,02 ^a
T4	0.1683±0,03 ^b
T5	0.1575±0,01 ^a
T6	1.2908±0,26 ^b

3 MDA: miligramas de malonaldeído por kg de amostra

4 *Médias na mesma linha não acompanhadas de mesma letra são significativamente diferentes
 5 pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

6 T1: OE de orégano 40 µg mL⁻¹ , T2: orégano 10 µg mL⁻¹ , T3: alecrim-pimenta 40 µg mL⁻¹ ,
 7 T4: alecrim-pimenta 10 µg mL⁻¹ , T5: alecrim-pimenta e orégano na concentração de 10 µg mL⁻¹
 8 , T6: controle.

9

10

11

12

13

14

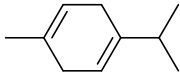
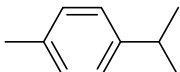
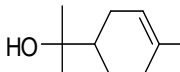
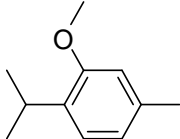
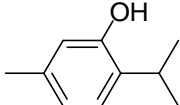
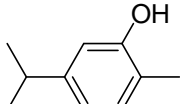
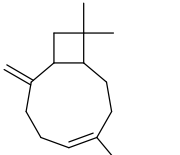
15

16

17

18

1 Tabela 3 – Voláteis da linguça frescal de frango acrescida de óleo essencial de *Origanum*
 2 *vulgare* e *Lippia origanoides* e analisados por HSCG-EM.

Nº	Compostos	^a EM	^a FM	Íons característicos (<i>m/z</i>)	Amostras
1	α – Terpineno		C ₁₀ H ₁₆	136(M ⁺ 28),121(19), 94(13), 93(100),92(13),91(45),79 (23), 77(32), 69(6), 65(6)	T1, T2, T3, T5
2	Cimeno		C ₁₀ H ₁₄	134(29), 120(10), 119(100), 117(14),115(7),103(4),91 (20), 79(3), 68(3), 65(5)	T3, T4, T5
3	Terpineol		C ₁₀ H ₁₈ O	136(59),121(65),107(20), 105(12),95(12),94(23),93 (100),92(27),91(37), 79(36)	T1, T2, T5
4	Timol metil éter		C ₁₁ H ₁₆ O	164(M ⁺ 28),150(11),149(100), 134(7),119(11),117(8),115(7) , 91(14), 77(5), 65(2)	T3, T4, T5
5	Timol		C ₁₀ H ₁₄ O	150(M ⁺ 31),136(10),135(100), 121(3), 115(14), 107(6), 105(4), 91(14), 77(5), 65(3)	T1, T2, T3, T4, T5
6	Carvacrol		C ₁₀ H ₁₄ O	150(34), 136(10), 135(100), 133(3),121(3),117(5),115(8), 107(8),91(15),77(7)	T3, T4, T5
7	Cariofileno		C ₁₅ H ₂₄	204(M ⁺ 20),189(43),175(15),1 21(35),120(46),119(50),109(20),107(53),106(35),105(72)	T3, T4, T5

3 ^aEM: Estrutura molecular e ^b FM: Fórmula molecular, informações obtida da biblioteca NITS
 4 2.0. T1: OE de orégano 40 µg mL⁻¹ , T2: orégano 10 µg mL⁻¹ , T3: alecrim-pimenta 40 µg mL⁻¹
 5 , T4: alecrim-pimenta 10 µg mL⁻¹ , T5: alecrim-pimenta e orégano na concentração de 10 µg
 6 mL⁻¹ , T6: controle.

7

8

9

10

11

12

13

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas análises *in vitro* foram identificados como compostos majoritários: o-cimeno, 4-terpeniol e carvacrol, para os óleos essenciais (OEs) de alfavaca, orégano e alecrim-pimenta, respectivamente. Os OEs de orégano e alecrim-pimenta apresentaram atividade antioxidante e antimicrobiana relevantes, demonstrando alto potencial para a aplicação desses OEs como agentes antioxidantes e antimicrobianos na linguiça frescal. Não foi possível detectar dentre as concentrações testadas valores para a atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) de alfavaca, no entanto, o OE de alfavaca apresentou a melhor atividade antioxidante dentre os OEs analisados ($CE_{50}=3,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $IAA=12,3$).

Após a aplicação na linguiça frescal, o OE de orégano nas concentrações de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi eficiente na redução de coliformes a $45 \text{ }^\circ\text{C}$. O OE de alecrim-pimenta na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi eficiente na redução de coliformes a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ e efetivo contra o desenvolvimento de *Salmonella* sp. durante todo o experimento. Não foi observado desenvolvimento de *Staphylococcus* coagulase positiva em nenhum dos tratamentos.

Os compostos majoritários previamente detectados nos OEs permaneceram nas amostras de linguiça frescal e foram identificados pela análise de *headspace* (HS-CG/EM) no último dia de armazenamento. Não foram observadas variações de pH em função dos tratamentos utilizados. Todos os OEs foram eficientes no controle da oxidação lipídica.

Os resultados encontrados demonstram o potencial para a aplicação dos óleos essenciais de orégano e alecrim-pimenta em linguiça frescal de frango. Estudos posteriores são necessários para elucidar a aceitação sensorial e a viabilidade da produção da matriz alimentar adicionada de óleos essenciais.